

Università degli Studi del Piemonte Orientale “A. Avogadro”
Facoltà di Medicina e Chirurgia
XVII ciclo del Corso di Dottorato in Medicina Molecolare
Anno Accademico 2004-2005

**“ Ruolo del fattore di crescita epatocitario HGF e
del recettore Met nella fisiologia e patologia
umana”**

Relatore
Prof.ssa Maria Prat

Coordinatore
Prof. Umberto Dianzani

Candidata
Marilena Sala

Indice analitico

Introduzione

1. Il sistema HGF/Met	pag. 3
1.a - Il fattore di crescita epatocitario HGF	
1.b - Il recettore di HGF: Met	
1.c - Trasduzione del segnale	
1.d - Fisiologia del sistema HGF/Met	
2. HGF/Met nel sistema cardiovascolare: fisiologia e patologia	11
2.a - cellule staminali	
2.b - piastrine	
3. Il sistema HGF/Met nella patologia tumorale	17
3.a - Sarcoma di Kaposi	
4. Anticorpi	23
4.a - anticorpi monoclonali	
4.b - anticorpi monoclonali agonisti di Met	
4.c - anticorpo monoclonale AR-3	
5. Scopo del lavoro	26

Parte sperimentale

1. <u>Sistema HGF/Met nelle piastrine.</u>	27
“Met identification on human platelets: Role of hepatocyte growth factor in the modulation of platelet activation”	
2. <u>Sistema HGF/Met in cellule staminali.</u>	33
“Hepatocyte Growth Factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation”	

3. <u>Il sistema dei cardiomiociti.</u>	45
“Effetti biologici indotti da anticorpi monoclonali agonisti del recettore Met in cardiomiociti: sopravvivenza, motilità, proliferazione”	
4. <u>Ruolo di HGF/Met nel Sarcoma di Kaposi.</u>	58
“Agonist Met antibodies define the signaling threshold required for a full mitogen and invasive program of Kaposi’s sarcoma cells”	
<u>Discussione finale</u>	67
<u>Bibliografia</u>	72

Introduzione

Il sistema HGF/Met

Il Fattore di Crescita Epatocitario HGF ed il suo recettore Met, sono molecole comparse tardivamente durante l'evoluzione, esse sono tipicamente espresse a partire dai vertebrati. Fin dai primi momenti dello sviluppo embrionale HGF e Met rivestono un ruolo fondamentale per il corretto sviluppo di embrione ed organi, inoltre la coppia ligando recettore è responsabile di numerosi processi di omeostasi e rigenerazione tissutale nell'organismo adulto (Birchmeier and Gherardi, 1998).

Il fattore di crescita epatocitario, HGF

Il fattore di crescita epatocitario, HGF, è una proteina eterodimerica costituita da una sub-unità α e da una sub-unità β legate tra loro da ponte disolfuro. La struttura di HGF presenta un'elevato grado di omologia di struttura con proteine della classe delle serina-proteasi responsabili del processo di coagulazione del sangue, in particolare HGF condivide il 38% di omologia strutturale con la molecola del plasminogeno (Donate et al., 1994).

La sub-unità α ha un peso di circa 60 kDa, all'estremità N-terminale presenta un motivo strutturale "hairpin loop", omologo al pro-peptide del plasminogeno; seguono quattro domini "kringle". I primi due (NK1 e NK2) insieme all'"hairpin loop" costituiscono il sito di legame al dominio extracellulare del recettore di HGF (Trusolino et al., 1998).

La sub-unità β , del peso di 32-36 kDa, presenta un'elevata omologia con il dominio catalitico delle serina-proteasi; HGF tuttavia non presenta attività enzimatica, poiché i residui serinici ed istidinici, peculiari della triade catalitica delle serina-proteasi, sono sostituiti da residui di glutammina e tirosina rispettivamente (vedi review Tamagnone and Comoglio, 1998; Trusolino et al.,

1998). E' stata quindi proposta una evoluzione comune dei geni delle serina proteasi e di HGF a partire da un comune gene ancestrale (Donate et al., 1994).

Le due sub-unità si originano dal taglio proteolitico di un precursore monocatenario di 92 kDa, secreto da cellule di origine mesenchimale. Il pro-HGF è un molecola biologicamente inattiva, non è in grado di sollecitare risposte biologiche nelle cellule bersaglio, esso è in grado di legare il suo recettore tirosin chinasi Met, componenti della matrice extracellulare, proteoglicani di membrana: eparansolfato. Questo meccanismo ha la funzione di mantenere costante la concentrazione di HGF in circolo e la quota di pro-HGF legato alle diverse componenti cellulari ed extracellulari, costituisce una riserva di citochina facilmente recuperabile in casi di danni tissutali. Essa infatti viene rilasciata in circolo e maturata in forma attiva, capace di interagire con cellule bersaglio e scatenare le opportune risposte biologiche.

La maturazione del pro-HGF ad HGF attivo è mediata da una serie di enzimi presenti nel siero e nell'ambiente extracellulare. Le proteasi capaci di attivare il fattore di crescita sono quattro: gli attivatori del plasminogeno uPA (Urokinase type plasminogen activator) e tPA (tissue type plasminogen activator), una serina proteasi omologa del fattore XII della coagulazione e lo stesso fattore XII della coagulazione (vedi review Birchmeier et al., 2003)

L'attivazione di HGF avviene in condizioni fisiologiche in seguito a danni tissutali (Miyazawa et al., 1994); la produzione localizzata nei siti di danno tissutale di HGF attivo è probabilmente mediata dall'azione dell'attivatore di HGF presente nel siero e dal fattore XII. La convertasi serica a sua volta viene attivata dalla trombina, presente durante i fenomeni coagulativi che hanno luogo nel sito di danno. Gli attivatori del plasminogeno invece sembrano essere responsabili della maturazione dell'HGF presente sulla membrana di cellule bersaglio e l'attivazione avviene in situazioni non traumatiche o lesive, ma avrebbe funzione di regolazione dell'entità di attivazione extracellulare di pro-HGF (Naldini et al., 1992).

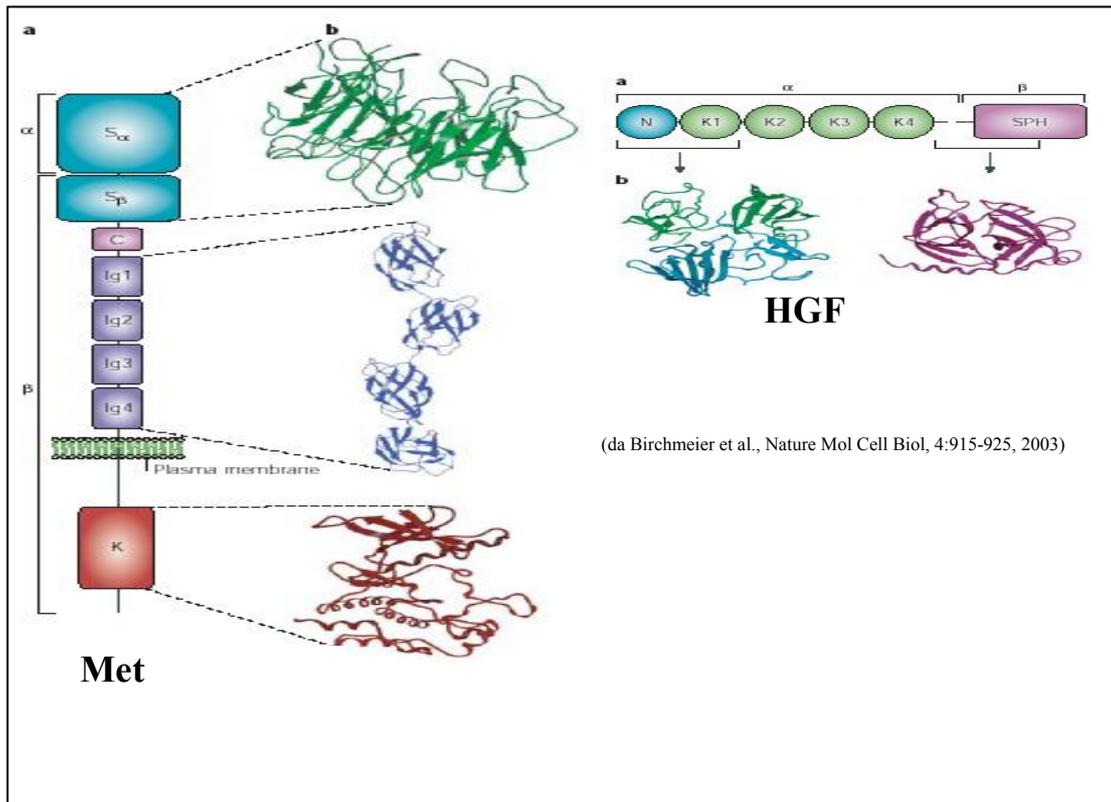
Il recettore per HGF: Met

Il recettore tirosin chinasi Met è una proteina di circa 190 kDa, costituita da due catene α e β , rispettivamente di 50 kDa e 145 kDa, legate da ponte disolfuro e codificate dallo stesso gene, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7.

Il recettore è costituito da tre domini topografici:

- a) la regione extracellulare, formata da entrambe le sub-unità, in cui si trova il sito di legame con lo specifico ligando HGF;
- b) il dominio transmembrana, che ancora la proteina alla membrana cellulare, è costituito dalla sola catena β , ed è formato da residui aminoacidici apolari organizzati in α -elica;
- c) il dominio citoplasmatico della catena beta, costituito da una regione iuxtamembrana, coinvolta nei meccanismi di regolazione dell'attività catalitica del recettore (Vigna et al., 2000; Gandino et al., 1994), un dominio chinasi, e una coda C-terminale responsabile dell'interazione con i trasduttori. Nel dominio chinasi risiedono i residui Y¹²³⁴ e Y¹²³⁵ che, in seguito a stimolazione da parte del ligando, si fosforilano; essi sono essenziali per la completa attivazione catalitica del recettore (Weidner et al., 1995). Questo evento porta alla fosforilazione di altri due residui tirosinici (Y¹²⁴⁹ e Y¹²⁵⁶) presenti nel dominio C-terminale, che in questa forma agiscono da sito di ancoraggio di molecole intracellulari capaci di trasdurre il segnale innescato dal ligando all'interno della cellula, fino al nucleo. Il sito di ancoraggio di Met è caratteristico della sua sottofamiglia poiché alla stessa sequenza aminoacidica è in grado di legare più molecole trasduttrici (Furge et al., 2000; Weidner et al., 1995; Ponzetto et al., 1994).

Il recettore Met è principalmente espresso da cellule di origine epiteliale (Di Renzo et al., 1991; Prat et al., 1991). Inizialmente la proteina viene sintetizzata sotto forma di unico precursore monocatenario di 170 kDa; successive modificazioni post-traduzionali, quali maturazione della glicosilazione, taglio proteolitico, generano la forma matura di 190 kDa espressa in membrana (Crepaldi et al., 1994). Il recettore viene anche espresso da altri tipi cellulari quali: cellule endoteliali (Bussolino et al., 1992), mioblasti (Anastasi et al., 1997), cellule ematopoietiche e nervose (Di Renzo et al. 1992; Maina and Kleine, 1999).



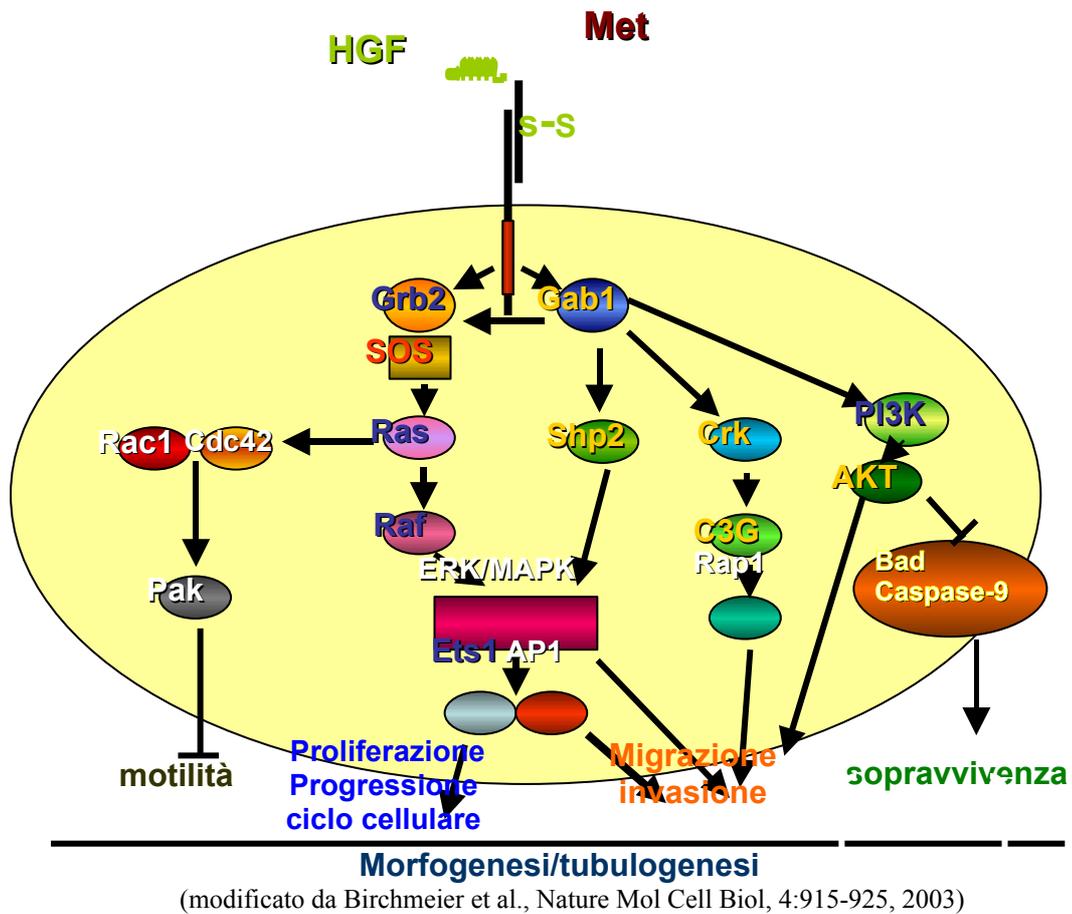
Trasduzione del segnale

Il legame di HGF a Met induce un evento di autofosforilazione dei residui tirosinici posti nella regione C-terminale o “docking site”, corta sequenza aminoacidica in grado di legare e attivare diversi e numerosi effettori intracellulari, aventi domini SH2 nella loro struttura molecolare (Cantley et al., 1991). Al “docking site” di Met sono reclutati principalmente le molecole Gab1, PI3 kinase, PLC γ , il complesso Grb2-SOS, c-Cbl, BAG1 (Bardelli et al., 1996; Wiedner et al., 1996; Ponzetto et al., 1994; Graziani et al., 1993; Villa Moruzzi et al., 1993; Graziani et al., 1991).

Tra le vie di traduzione attivate dalla coppia HGF/Met, quelle del sistema Ras e della “PI3 kinase” sembrano avere un ruolo preponderante. L’attivazione della PI3 kinase è necessaria per evocare risposte di tipo motorio e morfogenico, nonché di protezione da apoptosi (Xiao et al., 2000; Ridley et al., 1995). Il sistema Ras, attivato dal reclutamento del complesso Grb2- SOS, è principalmente coinvolto nelle risposte di tipo proliferativo (Ponzetto et al.,

1996). Studi in vitro hanno dimostrato come l'attivazione non regolata del sistema Grb2/Ras/MAPK da parte del recettore Met sia sufficiente per trasformazione in senso tumorigenico, mentre il processo metastatico richieda la contemporanea attivazione anche della cascata trasduzionale mediata da PI3 kinase (Trusolino and Comoglio, 2002).

Il sito di ancoraggio dei trasduttori intracellulari di Met svolge un ruolo importante nel determinare un corretto quadro responsivo a stimoli provenienti dall'ambiente extracellulare. I fattori che concorrono a definire come ciò si verifica sono: differenze di affinità dei vari effettori, variazioni delle loro concentrazioni locali, variazioni nei livelli di fosforilazione del recettore (Leof et al., 2000; Kholodenko et al., 2000). E' stato ipotizzato che subito dopo il legame di HGF al recettore solo gli effettori ad alta affinità siano reclutati, e quindi solo alcune vie di traduzione vengano attivate. Quando il livello di fosforilazione del recettore aumenta, cioè quando il numero di recettori attivati è elevato, si possono formare complessi anche con effettori a bassa affinità per il recettore. In questo modo vie trasduzionali addizionali possono aggiungersi e imporsi su quelle già innescate, guidando la risposta biologica attraverso fasi sequenziali.



Fisiologia del sistema HGF/Met

Studi condotti su modelli murini hanno dimostrato il ruolo essenziale di HGF e Met durante lo sviluppo embrionale, essi attivano e regolano processi di crescita, sopravvivenza di cellule epiteliali e migrazione di precursori muscolari. Il fattore HGF e il recettore Met sono importanti nei meccanismi di impianto e accrescimento placentare, nell'organogenesi di fegato, polmone, rene, cuore, mammella (vedi review Birchmeier et al. 2003). Il sistema HGF/Met regola lo sviluppo e la formazione dei muscoli scheletrici. Studi su modelli murini hanno evidenziato che le cellule progenitrici muscolari, di tipo epiteliale, presenti nel dermomiotomo, esprimono il gene c-Met, mentre cellule, di tipo mesenchimale, adiacenti alla struttura, sono positive per l'espressione di HGF. L'espressione

delle due molecole induce nelle cellule progenitrici muscolari, residenti nel dermomiotomo, un fenomeno di delaminazione e migrazione in regioni lontane, dove si differenziano in cellule muscolari scheletriche dando origine a muscoli come: diaframma, lingua, muscoli degli arti (Bladt et al., 1995). HGF e Met sono inoltre importanti nei processi di condrogenesi ed osteogenesi, nonché di ematopoiesi, angiogenesi e chemioattrazione assonica (vedi review Birchmeier et al., 2003).

Nell'organismo adulto il fattore di crescita HGF e il recettore Met sono responsabili dell'omeostasi dell'organismo adulto, sono coinvolti in processi di riparazione tissutale e rigenerazione d'organo. Numerosi studi hanno infatti documentato che i livelli di espressione sia di HGF che di Met aumentano in seguito a danni tissutali. In particolare in casi di danni epatici, danni a carico di rene o cuore, i livelli di HGF aumentano sia *in situ* che a livello plasmatico (vedi review Birchmeier et al., 2003). Questo suggerisce che nell'organismo adulto il sistema HGF/Met agisca come un meccanismo di difesa, attivato in seguito a danni, per promuovere un efficace processo di riparazione e protezione. Alcune molecole, come l'interleuchina-1 e 6, le prostaglandine E, coinvolte nei processi infiammatori successivi a danni tissutali, sono in grado di attivare la trascrizione genica di HGF (Makino et al., 2004; Zhang et al., 2000). Attualmente sono in fase di studio l'applicazione terapeutica di HGF mediante espressione transgenica o somministrazione ectopica di HGF nel fegato e nel cuore (Birchmeier et al., 2003; Jin et al., 2003; Nakamura et al., 2000; Roos et al., 1995).

L'interazione HGF/Met è in grado di evocare nelle cellule bersaglio il programma di crescita invasiva, importante nei processi di sviluppo embrionale e di riparo tissutale. Esso quando non è regolato, risulta essere anche il meccanismo alla base del potenziale oncogenico e metastatico di Met e HGF. In condizioni fisiologiche questo processo è altamente e finemente regolato, nei tumori invece si osserva una deregolazione dell'interazione HGF/Met, in particolare sono stati documentati meccanismi di alterata attivazione del recettore. Questi meccanismi sono diversi, in generale possiamo distinguere in meccanismi di attivazione ligando-dipendenti e ligando-indipendenti, in i casi essi determinano la costitutiva fosforilazione e attivazione di Met.

Il sistema HGF/Met nel sistema cardiovascolare:

fisiologia e patologia

Di grande importanza e attualità sono le malattie cardiovascolari che oggi sono 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 ed 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, l'inadeguata ossigenazione e apporto di glucosio al tessuto, determina un processo progressivo di perdita di cardiomiociti che costituisce il reale danno al miocardio successivo a eventi di ischemia e di infarto acuto del miocardio.

Negli stadi iniziali la perdita di cardiomiociti viene compensata da ipertrofia, che può evolversi in cardiomiopatia dilatativa ed in tempi successivi in insufficienza cardiaca (vedi review Seidman et al., 2001). Diversi studi hanno indicato che la morte cellulare nel miocardio è generata sia da eventi di apoptosi che di necrosi. I due processi differiscono tra loro per diverse caratteristiche morfologiche e di regolazione (vedi reviews Gill et al., 2002; Krijnen et al., 2002). La necrosi è stata definita anche "morte cellulare passiva", per indicare che essa non richiede energia cellulare per progredire, a differenza dell'apoptosi definita "morte cellulare attiva" che invece richiede ATP per funzionare (Sloviter et al., 2002). Durante la necrosi le cellule vanno incontro ad una rapida perdita dell'omeostasi, e successiva rottura della membrana plasmatica e frammentazione degli organelli citoplasmatici. La rottura della membrana plasmatica causa il rilascio di detriti cellulari che possono innescare delle risposte infiammatorie nell'area circostante (vedi review Krijnen et al., 2002). Il meccanismo di apoptosi invece non evoca tali risposte, poiché è caratterizzato da eventi di condensazione cellulare e nucleare, con formazione di corpi apoptotici che rapidamente vengono fagocitati da cellule adiacenti. A differenza della necrosi l'apoptosi è un meccanismo

finemente regolato che richiede energia, per questo è definito meccanismo di “morte cellulare programmata e attiva” (vedi review Krijnen et al., 2002).

Per queste caratteristiche l'apoptosi ha un ruolo chiave in eventi fondamentali per la vita stessa, quali lo sviluppo embrionale, l'omeostasi, il rimodellamento, la sopravvivenza e le difese dei tessuti adulti (vedi review Crow et al., 2004).

In particolare l'apoptosi è mediata da due diverse vie di attivazione note come via estrinseca e via intrinseca. La prima viene mediata dai così detti “death receptors”, Fas e TNF- α R, attraverso l'attivazione delle procaspasi 8 e 3 nelle forme enzimatiche attive. A differenza della via estrinseca che trasduce specifici stimoli proapoptotici attraverso recettori di membrana, la via intrinseca integra un ampio spettro di stimoli extracellulari e intracellulari definiti stimoli di stress cellulare. Stimoli extracellulari sono mancanza di nutrienti, di fattori di crescita e sopravvivenza, ipossia, stimoli chimici e radiazioni, quelli intracellulari: stress ossidativi, danni al DNA, alterazioni strutturali (“misfolding”) di proteine. Tutti questi stimoli convergono su di un unico bersaglio, il mitocondrio attraverso la perdita di funzionalità dell'organello, il rilascio di proteine apoptogeniche, e l'attivazione delle caspasi (vedi review Crow et al., 2004).

L'alterazione della regolazione dell'apoptosi, risultante o in un' scarsa attività apoptotica, o in un eccesso di morte cellulare, sono alla base di diverse patologie umane. Ad esempio una scarsa attività apoptotica può favorire e contribuire ai processi di carcinogenesi, mentre un'eccessiva perdita di cellule per apoptosi è causa di numerose malattie degenerative e potrebbe essere alla base della patogenesi di malattie e alterazioni della funzionalità cardiaca in seguito a eventi di collasso, infarto del miocardio, attacco cardiaco. In particolare è stato osservato che cellule del muscolo cardiaco vanno incontro ad apoptosi in seguito a diversi e molteplici stimoli quali ipossia, ischemia e ri-perfusione, acidosi, stress ossidativo, deprivazione di siero, di glucosio ed inibizione metabolica, nonché trattamento con antracicline (vedi review Crow et al., 2004).

Parallelamente numerosi studi sono stati condotti sia *in vivo* che *in vitro* in cui si è analizzato il ruolo di fattori di crescita nel miocardio come IGF-I, VEGF ed HGF. In particolare attualmente sempre più attenzione viene riservata al fattore di crescita HGF nelle patologie cardiovascolari (Morishita et al., 1998), poiché HGF

ed il suo recettore Met, svolgono un ruolo importante nell'embriogenesi del miocardio (Rappolee et al., 1996). E' stato inoltre documentato che i geni di HGF e Met vengono ri-espresi 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 immunohistochemica per HGF le cellule dell'endotelio, le cellule interstiziali e i macrofagi circolanti, mentre i cardiomiociti e l'endotelio capillare sono fortemente positivi 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 (Kitta et al., 2003; 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; Duan et al., 2003; Aoki et al., 2000; Sakakura et al., 2000).

Cellule staminali

Di notevole rilevanza scientifica è stata la documentazione della presenza di cellule staminali cardiache nel miocardio adulto. Queste cellule sono in numero estremamente esiguo, ma aumentano nel caso di danno cardiaco (Beltrami et al., 2003). In sistemi sperimentali queste cellule hanno dimostrato di essere in grado di autorinnovarsi, di essere clonogeniche, multipotenti e di essere 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 (Forte et al., 2006; Duan et al., 2003; Makino et al., 1999).

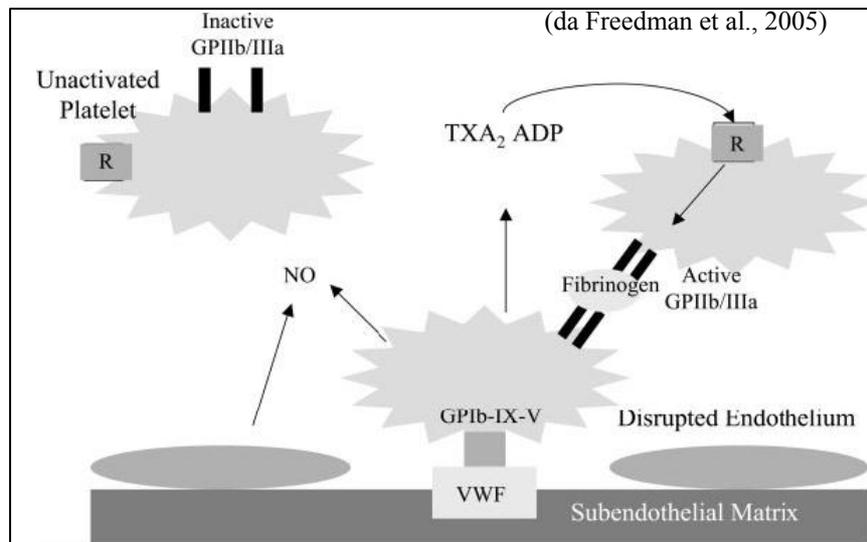
La plasticità di queste cellule è determinata da meccanismi e fattori non ancora del tutto noti, che potrebbero rivelare possibili utilizzi delle cellule staminali mesenchimali in processi di rinnovo cellulare, sostituzione di cellule danneggiate, e riparo dell'architettura tissutale. In questo contesto di notevole interesse è l'identificazione di fattori di crescita che selettivamente possano promuovere proliferazione, migrazione e differenziamento di cellule staminali adulte per aprire sempre più ad un'eventualità di terapia cellulare in casi di danni d'organo (Herzog et al., 2003; Bianco et al., 2001).

Sia le cellule staminali cardiache (CSC) che le cellule staminali mesenchimali (MSC) esprimono il recettore Met e il ligando HGF (Linke et al., 2005; Neuss et al., 2004).

In modelli sperimentali di ischemia miocardica, cellule staminali derivate dal midollo osseo, inoculate nel cuore danneggiato, hanno contribuito alla rigenerazione della porzione infartuata (Orlic et al., 2001). Altri studi in vivo, hanno documentato che l'inoculo di cellule staminali mesenchimali, iperesprimenti HGF, nel sito di danno, permettevano un miglior attecchimento delle cellule trapiantate e aumentavano la capacità di rigenerazione dell'area danneggiata, delle abilità nel ripristino delle funzionalità cardiache e un incremento dei processi di neoangiogenesi (Duan et al., 2003). Risultati simili sono stati ottenuti in cuori di cane infartuati utilizzando cellule staminali cardiache, inoculate in presenza di elevate concentrazioni locali di HGF. Questo ha facilitato e migliorato le capacità transdifferenziative di queste cellule in senso cardiomiocitario, incrementandone anche le capacità rigenerative e conferendone capacità contrattile (Linke et al., 2005).

Piastrine

Le piastrine sono elementi corpuscolati del sangue specializzate nella regolazione dei processi emostatici. Le piastrine originano dalla frammentazione dei megacariociti. Le piastrine sono prive del nucleo, ma conservano nel loro citoplasma alcune molecole di mRNA per la sintesi proteica, un sistema citoscheletrico molto sviluppato e alcuni sistemi enzimatici e effettori



trasduzionali. Le piastrine possono aderire alla parete dei vasi in seguito a danno oppure in condizioni di elevata pressione sanguigna. Esse sono in grado di formare aggregati e sono le principali responsabili della formazione di trombi e placche ateromatose. Il legame e l'adesione delle piastrine alla parete dei vasi sono promossi da interazioni ad alta affinità tra recettori espressi sulla membrana piastrinica (integrine) e ligandi espressi dal sottoendotelio esposto, quali collagene e fattore di vonWillebrand (vWf). In particolare il legame con le molecole di collagene avviene attraverso i recettori GP VI e GP Ia/IIb, mentre il legame al fattore di vonWillebrand è mediato dal complesso della glicoproteina GP Ib/V/IX. Queste interazioni sono gli eventi iniziali dell'attivazione piastrinica, a cui fanno seguito un cambio di forma, rilascio del contenuto dei granuli: fattori pro-aggreganti che hanno il compito di attivare piastrine adiacenti, e modificazione strutturale dell'integrina α (IIb) β 3 (GPIIb/IIIa) che determina la formazione del trombo piastrinico vero e proprio (vedi le review Steinhubl and Moliterno, 2005; Freedman, 2005).

Attualmente in letteratura è riportato che alcuni 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 (Selheim et al., 2002; Grabarek et al., 1994; Vassbotn et al., 1994).

Il sistema HGF/Met nella patologia tumorale

La complessa risposta cellulare evocata dal sistema HGF/Met nota con il nome di crescita invasiva, importante nella regolazione e progressione di eventi fisiologici, quando non correttamente regolata è causa di eventi tumorigenici e metastatici. Ad oggi sono numerose le evidenze che documentano come un'attivazione non regolata di questa risposta evocata da HGF/Met sia correlata ad eventi sia tumorigenici che metastatici ed il ruolo di HGF e Met nella patologia tumorale umana è stato ampiamente studiato ed è attualmente condiviso e accettato. In generale possiamo distinguere meccanismi di attivazione del recettore ligando-indipendenti e meccanismi ligando-dipendenti. Più dettagliatamente si distinguono meccanismi quali:

1. riarrangiamento genico
2. iperespressione del recettore
3. mutazioni puntiformi di tipo germinale e somatico
4. espressione ectopica in cellule di origine stromale con attivazione di circuiti autocrini

L'attività oncogenica di Met è stata documentata per la prima volta nella linea cellulare di osteosarcoma HOS (Cooper et al., 1984), a causa di un meccanismo di riarrangiamento genico che aveva generato il gene di fusione TPR-MET, codificante per una proteina chimerica costituita dalla regione N-terminale della proteina TPR, e la sequenza citosolica del recettore Met, contenente la regione chinasi e C-terminale del recettore. Questa proteina è costitutivamente fosforilata ed ha un elevato potenziale oncogenico sia *in vivo* che *in vitro* (Tulasne et al., 2002).

In numerosi carcinomi umani la principale causa di deregolata attività di Met è determinata da iperespressione del recettore, causata o da meccanismi di amplificazione genica o da meccanismi di trascrizione alterati. Nel caso di carcinoma differenziato papillare della tiroide e carcinoma gastroenterico, è stata documentata un'iperespressione di Met, causata da eventi di amplificazione genica o di deregolazione dell'attività trascrizionale o dei meccanismi post-traduzionali. Un aumento della espressione di Met sulla superficie cellulare sembra favorire eventi di dimerizzazione tra due o più molecole di recettore, permettendone l'attivazione in assenza di ligando. Tuttavia a volte si osserva

iperespressione del recettore ma non una sua costitutiva attivazione (vedi review Birchmeier et al., 2003; Tulasne et al., 2002).

Alterazioni dei meccanismi di modificazione post-traduzionale possono determinare la presenza sulla superficie di membrana di un recettore Met monocatenario, questa conformazione tridimensionale sembra mimare dal punto di vista molecolare la conformazione di Met in presenza di HGF. Questo causa una fosforilazione della chinasi anche in assenza del ligando, stimolando costitutivamente la traduzione del segnale di Met.

Molto frequente infine è l'attivazione costitutiva di Met causata dall'inesco di circuiti autocrini, generati dalla espressione ectopica di una delle due molecole. E' noto che sia cellule di tipo epiteliale sia cellule di tipo mesenchimale possono esprimere HGF o Met rispettivamente. In particolare si osserva questo tipo di attivazione del potenziale oncogeno di Met in forme di osteosarcomi, sarcomi, mielomi (vedi review Birchmeier et al., 2003)

Il Sarcoma di Kaposi

Il Sarcoma di Kaposi (KS) è un sarcoma multiplo emorragico: l'eziologia della neoplasia non è del tutto definita. Sono conosciute diverse forme cliniche ed epidemiologiche della malattia che presentano tutte caratteristiche comuni istopatologiche: neoangiogenesi, edema, infiltrazioni di cellule del sistema immunitario, presenza di cellule endoteliali (EC) con elevata attività mitotica, cellule sanguigne con capacità di extravasazione e formazione e crescita di cellule di forma fusata ("spindle cells") dette anche cellule del Sarcoma di Kaposi (KSC), considerate i veri e propri elementi tumorali (vedi review Ensoli et al., 2001).

Da un punto di vista epidemiologico possiamo distinguere due categorie di Sarcoma di Kaposi: una forma associata ad infezione da HIV-1 e una non associata ad HIV-1.

La forma di KS HIV-1 non associata può essere ulteriormente distinta in altre tre forme cliniche: una forma classica che colpisce soprattutto soggetti maschi anziani dell'area dell'Est Europa e del Mediterraneo; una forma endemica

presente in Africa che colpisce soggetti HIV-1 negativi ed una forma acquisita in soggetti trapiantati sottoposti a terapia immunosoppressiva.

La forma HIV-1 associata è particolarmente diffusa tra soggetti maschi sia omosessuali che eterosessuali. Tra le donne inoltre l'incidenza di KS è maggiore in soggetti con partner bisessuali piuttosto che eterosessuali. Queste evidenze unitamente all'osservazione che il rischio di Sarcoma di Kaposi è più alto in pazienti che hanno contratto HIV-1 per via sessuale, rispetto a quelli che lo hanno contratto per via parenterale, suggerisce che un altro elemento importante nell'eziologia del sarcoma sia un virus erpetico, sessualmente trasmesso quale il virus HHV-8.

L'osservazione che la distribuzione geografica delle forme di Sarcoma di Kaposi non associato ad HIV-1 corrisponde approssimativamente alla distribuzione geografica dell'infezione da HHV-8 supporta ulteriormente l'azione del fattore virale nell'eziologia del sarcoma. L'infezione da HHV-8 è più frequente in Africa (30-60%) e nei paesi mediterranei (Grecia e Italia, 4-35%), meno frequente o quasi assente nell'area del Nord e Centro Europa e negli Stati Uniti, dove invece si registrano il maggior numero di casi di KS HIV-1 associati (vedi reviews Barillari and Ensoli, 2002; Ensoli et al., 2001).

Gli stadi iniziali del Sarcoma di Kaposi sono caratterizzati da una forte risposta infiammatoria localizzata che precede la formazione di "spindle cells" e suggerisce un'origine reattiva piuttosto che maligna di questo sarcoma.

Da un punto di vista clinico si distinguono tre stadi di evoluzione della patologia: stadio iniziale o delle macchie: presenza di macchie rosso-bluastre; a livello microscopico si osserva un quadro infiammatorio: infiltrazioni di cellule immunitarie, in particolare linfociti CD8, plasmacellule e macrofagi, secernenti citochine infiammatorie come TNF- α , γ -IFN, IL-1 β e IL-6, vasi sanguigni dilatati ed irregolari. Non si osservano ancora elementi trasformati. Cellule provenienti da lesioni precoci di KS iniettate in topi nudi non originano tumori o metastasi (Ensoli et al., 2001)

stadio tardivo: si distinguono due fasi: una fase detta stadio delle placche ed una più tardiva detta stadio nodulare. Nello stadio della placche le lesioni aumentano di dimensioni e sono rilevate; microscopicamente iniziano a comparire cellule

fusate, sono sempre presenti infiltrati di cellule immunitarie, e citochine infiammatorie che stimolano cellule endoteliali e “spindle cells” a secernere fattori di crescita (bFGF, VEGF, HGF, PDGF) induttori di processi angiogenetici, proliferazione cellulare e capaci di riattivare il ciclo litico di HHV-8 in cellule polimorfonucleate del sangue periferico (PBMC) (Ensoli et al., 2001); le lesioni neoplastiche vere e proprie compaiono solo nello stadio nodulare, nelle lesioni sono presenti solo più cellule di tipo fusato, caratteristiche della patologia, altamente proliferanti, secernenti citochine infiammatorie, fattori di crescita e esprimenti *in vivo* alti livelli di un gene tardivo di HHV-8, il gene LANA (Ensoli et al., 2001).

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'importanza del sistema HGF/Met nella patogenesi del Sarcoma di Kaposi. Cellule isolate dalle lesioni, così come linee stabilizzate da esse, esprimono il recettore Met, spesso sono stati documentati eventi di espressione ectopica di HGF (Montaldo et al., 2000; Maier et al., 1996; Polverini et al., 1995). La contemporanea espressione di recettore e ligando determina la formazione di un circuito autocrino di attivazione recettoriale che mantiene costitutivamente fosforilato il recettore, stimolando una sostenuta proliferazione delle cellule di Sarcoma di Kaposi (Naidu et al., 1994). L'espressione ectopica di HGF in cellule di KS sembra essere indotta dalla contemporanea riattivazione del virus HHV-8 in queste cellule. Geni virali precoci stimolano l'attivazione trascrizionale di HGF in cellule di origine endoteliale che normalmente non sono programmate a farlo. Un fenomeno analogo è stato osservato in linee cellulari di una particolare forma di mieloma, PEL. Queste cellule risultano positive alla presenza del genoma di HHV-8, l'espressione di geni precoci di HHV-8 determina l'induzione di iperespressione di Met ed espressione ectopica di HGF creando un sistema di attivazione costitutiva di Met per autocrinia (Capello et al., 2000).

Studi condotti su una linea cellulare stabile di sarcoma di Kaposi (KS-immortalized cells: KS-IMM), esprimenti il recettore Met, ma non HGF, se trattate con il fattore di crescita erano in grado di attivare tutte le caratteristiche risposte biologiche mediate dall'interazione HGF/Met quali, migrazione, proliferazione ed invasività (Montaldo et al., 2000).

Anticorpi

Gli anticorpi (Ab) sono le molecole effettrici dell'immunità umorale, vengono anche chiamati immunoglobuline (Ig) per distinguerli dalle altre proteine presenti nella frazione γ -globulinica del siero. Sono proteine prodotte da plasmacellule, che si sono differenziate da linfociti B attivati.

Le Ig presentano una struttura simmetrica peculiare, generalmente rappresentata da una struttura ad Y, costituita da quattro catene polipeptidiche a due a due uguali: due catene di circa 55 kDa, definite catene pesanti (H), e due catene di circa 22 kDa, definite catene leggere (L). Le quattro catene sono unite tra da loro da ponti disolfuro (S-S) che formano un legame covalente tra le catene peptidiche e da una combinazione di interazioni non covalenti come legami ionici, idrogeno e idrofobici che ne stabilizzano la struttura. Il numero e la posizione dei legami disolfuro intercatena sono diversi nelle differenti classi e sottoclassi immunoglobuliniche. I ponti disolfuro formano anche legami intercatena che definiscono e stabilizzano il dominio immunoglobulinico, che è costituito da circa 110 aminoacidi (dominio "Ig-like").

I primi 110 aminoacidi all'estremità N-terminale delle catene pesanti e delle catene leggere sono molto variabili in anticorpi con diversa specificità antigenica e costituiscono le regioni variabili, che concorrono a formare il sito anticorpale responsabile dell'interazione con l'antigene. All'interno delle regioni variabili sono presenti zone in cui si concentrano le differenze di sequenza, dette *zone ipervariabili* o CDR ("complementarity determining regions" o regioni che determinano la complementarità) che di fatto costituiscono il *sito combinatorio* specifico per l'antigene.

Gli anticorpi sono utilizzati nella ricerca, nell'industria e in campo medico, come agenti diagnostici e terapeutici, e le loro potenzialità sono aumentate con l'avvento delle nuove tecnologie di biologia molecolare che ne permettono la riformattazione.

Anticorpi monoclonali (MAbs)

Questo tipo di anticorpi viene prodotto da linee cellulari ibride (*ibridomi*) che rilasciano l'anticorpo nel mezzo di coltura. Gli ibridomi sono ottenuti dalla fusione di cellule di mieloma murino (ad esempio NS1 o P3.X63.Ag8.653) con cellule spleniche di topi immunizzati più volte contro un determinato antigene. Gli ibridomi riassumono le caratteristiche fondamentali proprie delle cellule di origine: sono infatti in grado di secernere anticorpi (linfociti B) e di crescere indefinitamente in coltura (cellule di mieloma).

Una volta avvenuta la fusione è possibile isolare i singoli ibridomi in terreno selettivo (HAT, contenente ipoxantina, aminopterina e timidina) non permissivo per la crescita di cellule di mieloma che mancano dell'enzima HPRT (ipoxantina fosforibosil transferasi).

E' possibile produrre elevati livelli di anticorpi monoclonali anche in vitro. In particolare l'elevata domanda di mAbs nell'ambito della ricerca ha fatto emergere l'esigenza di un nuovo sistema di produzione che riducesse l'uso di animali e facilitasse il processo di estrazione e purificazione. Nel laboratorio di Istologia è stato quindi introdotto il metodo CELLline™ della BD Biosciences. Si tratta di un dispositivo di coltura per cellule in sospensione, come gli ibridomi, costituito da tre scomparti che contengono rispettivamente terreno di crescita, cellule e gas in equilibrio con l'ambiente. Il fatto che le cellule siano in un compartimento proprio, ma in comunicazione con il serbatoio dei nutrienti da una parte e che possano scambiare ossigeno e anidride carbonica con l'altro serbatoio, fa sì che esse possano crescere ad alte concentrazioni e quindi produrre anticorpi in elevate quantità.

Questi anticorpi presentano però dei limiti: è infatti possibile utilizzarli solo in vitro, in quanto un loro utilizzo terapeutico nell'uomo scatena una risposta immunitaria, essendo l'anticorpo di origine murina, detta risposta HAMA (human anti-mouse antibody).

Per ovviare a questo problema i mAb murini sono stati "*umanizzati*" (Hudson et al, 2003), sostituendo la porzione Fc di topo con quello umano mediante tecniche di ingegneria genetica, attraverso la manipolazione del DNA che codifica per la molecola anticorpale. Si tratta quindi di molecole chimeriche uomo-topo (*anticorpi monoclonali ricombinanti*), in cui la specificità antigenica, determinata

dalla regione variabile, è di origine murina, mentre l'isotipo, determinato dalla regione costante, deriva dall'uomo. Inoltre, attraverso la fusione con altre proteine, è possibile dotare le immunoglobuline di nuove proprietà: la fusione tra Fab ed enzimi può fornire gli anticorpi di nuovi meccanismi effettori, come enzimi che attivino i pro-farmaci nei tumori (McDonagh et al., 2003).

Anticorpi monoclonali diretti contro recettori rappresentano degli strumenti versatili e molto utili per fini di ricerca e terapia. Possono essere utilizzati per studiare la struttura proteica, e se agonisti del recettore possono dimostrarsi validi strumenti per dissezionare le vie di trasduzione del segnale e le risposte biologiche evocate dall'attivazione del recettore, e quindi risultare ottimi strumenti a disposizione dei ricercatori sia a livello biologico che medico. Alcuni mAbs sono già utilizzati con successo nella terapia tumorale (Mellstedt et al., 2003). Tra i tanti si può ricordare il Trastuzumab (Herceptin™), specifico per il recettore ErbB-2. L'anticorpo Trastuzumab, agendo probabilmente come antagonista di questa tirosina chinasi recettoriale, ne blocca l'internalizzazione, impedendo l'inizio della via di segnalazione (Vogel et al., 2001).

Attualmente sono in commercio disponibili a fini di ricerca anche anticorpi monoclonali specifici per il recettore di HGF. Il laboratorio in cui ho svolto la tesi dottorato, in particolare, ne ha prodotti (DO-24 e DN-30), che riconoscono e legano il dominio extracellulare di Met in due distinte regioni e che si sono dimostrati rispettivamente agonisti totali o parziali del recettore (Prat et al., 1998).

Anticorpi agonisti di Met

Gli anticorpi monoclonali DO-24, DN-30, NO-23, specifici per il recettore Met, riconoscono epitopi di natura proteica presenti sulla forma nativa del dominio extracellulare della catena β del recettore. Ogni anticorpo riconosce inoltre domini diversi, infatti è possibile osservare effetti additivi e non sono mai stati osservati effetti di competizione o cross-reattività in vivo ed in vitro (Prat et al., 1998).

L'anticorpo monoclonale DO-24 è un agonista completo del recettore, in grado di indurre tutti gli effetti di HGF, quali motilità, proliferazione, sopravvivenza,

invasività, morfogenesi e angiogenesi (Prat et al., 1998). Questo anticorpo è stato anche utilizzato per studiare in immunistochemica il profilo di espressione del recettore Met nei tessuti normali e neoplastici.

L'anticorpo DN-30 invece è stato identificato come agonista parziale di Met, sia in sistemi cellulari epiteliali che di origine mesenchimale, esso è in grado infatti di evocare solo risposte di tipo motorio, attivando il recettore in modo transiente e a bassi livelli (Prat et al., 1998; Bardelli et al., 2005).

Infine l'anticorpo monoclonale NO-23, è attualmente in fase di validazione, ma si è dimostrato in diversi modelli cellulari un agonista parziale di Met.

L'anticorpo monoclonale AR-3

L'anticorpo monoclonale AR-3 è stato utilizzato come controllo negativo nello studi degli effetti biologici di mAb agonisti di Met in cardiomiociti. Esso è stato ottenuto a seguito della fusione di cellule di mieloma P3.X63.Ag8.653 con cellule spleniche di un topo (ceppo Balb/c) immunizzato con cellule vive di carcinoma epidermoide umano (A 431) e selezionato per la sua capacità di legarsi a linee cellulari di carcinoma umano, ma non a linfociti umani isolati da sangue periferico. Studi successivi hanno dimostrato la sua efficacia nel discriminare tra cellule neoplastiche gastriche, pancreatiche, del colon, ovariche ed endometriali e le loro controparti normali. In particolare il mAb AR-3 si lega specificamente ad un epitopo che è stato denominato CAR-3 (Prat et al., 1985). Questo epitopo è espresso su di una mucina presente alla superficie cellulare, che viene anche rilasciata nei liquidi biologici e nel surnatante di coltura ed è risultato essere di natura saccaridica legato tramite un legame O- glicosidico al core proteico (Prat et al., 1989).

Scopo del lavoro

Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato è stato rivolto ad indagare il ruolo della coppia ligando-recettore HGF/Met in modelli fisiologici e patologici. In particolare i sistemi studiati sono stati:

1. il sistema delle piastrine, le quali hanno un ruolo chiave sia in processi fisiologici di riparo tissutale che patologici in quanto elementi essenziali nella formazione di trombi e nella manifestazione di lesioni aterosclerotiche;
2. il sistema delle cellule staminali, per capire se e come HGF/Met fossero espressi e il loro ruolo nei processi di differenziazione;
3. il sistema cardiomiociti, per valutare la possibile applicazione terapeutica di molecole anticorpali specifiche per Met, in sostituzione di HGF, molecola altamente instabile e dai costi di produzione elevati. Gli anticorpi monoclonali presentano, infatti notevoli vantaggi, sono facilmente producibili a bassi costi, possono essere facilmente ingegnerizzati con le attuali metodiche di biologia molecolare, e inoltre sono molecola molto più stabili;
4. possibilità di utilizzare anticorpi monoclonali, precedentemente dimostrati essere agonisti completi e parziali del recettore Met, come fattori per studiare e dissezionare le vie di trasduzione del segnale e le risposte biologiche innescate dall'interazione HGF-Met che sono coinvolte nella manifestazione e progressione del Sarcoma di Kaposi.

Parte sperimentale

HGF/Met nel sistema piastrine

Le piastrine hanno un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di riparo tissutale e nella patologia del sistema cardiovascolare, in quanto elementi essenziali nella formazione di trombi e nella manifestazione di lesioni aterosclerotiche. Attualmente è noto che le concentrazioni plasmatiche del fattore di crescita epatocitario HGF aumentano significativamente in seguito a patologie associate alla formazione di trombi. Lo studio condotto ha voluto indagare se il fattore HGF fosse in grado di interagire con il sistema piastrine. In primo luogo è stata documentata l'espressione del recettore Met sulla superficie piastrinica, in seguito è stata studiata l'interazione di HGF con il recettore Met espresso sulla superficie delle piastrine. Gli studi condotti hanno dimostrato che concentrazioni fisiologiche di HGF sono in grado di inibire l'attività piastrinica indotta da trombina in maniera tempo e dose dipendente, agendo attraverso l'inibizione dell'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Questi risultati suggeriscono la possibile funzione del fattore HGF circolante come modulatore negativo dell'aggregazione piastrinica.

(Per la parte sperimentale si allega al testo articolo originale)

Met identification on human platelets: Role of hepatocyte growth factor in the modulation of platelet activation

Daniela Pietrapiana, Marilena Sala, Maria Prat¹, Fabiola Sinigaglia^{*1}

Department of Medical Science, University "A. Avogadro", Via Solaroli, 17, Novara 28100, Italy

Received 4 May 2005; revised 15 June 2005; accepted 21 June 2005

Available online 19 July 2005

Edited by Veli-Pekka Lehto

Abstract Circulating HGF is significantly increased in a number of thrombus-associated disorders. Since platelets play a pivotal role in thrombogenesis, the ability of HGF to interact with human platelets was investigated. This paper shows for the first time that human platelets express HGF receptor, the tyrosine kinase encoded by *c-MET* gene. At physiological concentrations HGF was found to inhibit both glycoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and thrombin-dependent platelet aggregation in a dose- and time-dependent manner. These results suggest that circulating HGF may counteract thrombogenesis by negatively modulating platelet functions.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: Platelets; Aggregation; Met; Hepatocyte growth factor

1. Introduction

The hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic cytokine, which elicits multiple biological responses, namely motility, proliferation, morphogenesis and survival in a cell type-dependent fashion. These phenomena are essential in physiological processes, such as organ formation during embryogenesis and tissue homeostasis in adults; however, when inappropriately activated, they may contribute to tumour development and metastasis [1,2]. HGF shares several structural features with proteins of the blood coagulation cascade: the presence of characteristic "kringle" domains, a zymogen activation site and a C-terminal serine protease-like domain. HGF is secreted by cell of mesenchymal origin as an inactive single chain precursor (pro-HGF) and in this form is found in serum and in the extracellular matrix of several tissues, where it is stored bound to proteoglycans [3]. Upon tissue injury, upregulation of specific convertases induces a local burst of active HGF that limits cell damage and promotes tissue regeneration [4].

HGF receptor (HGF-R) is the *MET* protooncogene encoded transmembrane tyrosine kinase [5,6] and is predomi-

nantly expressed in epithelial and endothelial cells [7,8]. Its activity is dependent on the transphosphorylation of its kinase domain and of a multifunctional docking site [9], which causes the concomitant activation of multiple signal transduction pathways that account for the complex biological responses elicited by HGF [1,2].

Much evidence suggests that the HGF/Met receptor couple is involved in the homeostasis of the cardiovascular system: (i) they play an important role in the early cardiac development, when they are transiently expressed [10], (ii) endogenous and exogenous HGF have a cardioprotective activity in experimental myocardial infarction [11], (iii) HGF is a potent angiogenic factor [12]. Moreover, HGF levels in the plasma of patients with acute myocardial infarction [13] or arterial thrombosis [14] are significantly and precociously increased and a correlation between the increase in circulating HGF and hypertension [15] and atherosclerosis [16] has been reported. The key role played by platelets in the formation of atheromatose plaques and thrombi is established [14,16]. Although HGF was originally purified from human platelets [17] and growing evidence suggest the involvement of HGF in thrombotic events, the expression of Met on the platelet surface and the effects of HGF on platelet function have not yet been investigated. All the above has prompted us to investigate the possible role of HGF/Met in platelet function.

Here we show that platelets express the Met receptor at their surface, and that HGF can inhibit thrombin-induced platelet aggregation, downregulating integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Recombinant human hepatocyte growth factor (HGF) was from PeproTech EC (London, UK). The DO-24 monoclonal antibody is specific for the extracellular domain of the Met receptor [18]. Polyclonal FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies were from DAKO (Glostrup, DK). FITC-conjugated PAC-1 antibody was from Becton Dickinson (San Jose, CA). Monoclonal antibody against Myc (9E10) and thrombin (Thr) from human plasma were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Platelet preparation and aggregation studies

Blood was withdrawn from healthy volunteers who had not taken any drugs for at least two weeks before venipuncture. ACD (130 mM citric acid, 152 mM sodium citrate, and 112 mM glucose) was used as anticoagulant. Platelets, obtained by gel-filtration on Sepharose CL-2B as previously described [19], were used for all experiments. Platelet samples were preconditioned at 37 °C and incubated with HGF

^{*}Corresponding author. Fax: +39 321 620421.

E-mail address: fabiola.sinigaglia@med.unipmn.it (F. Sinigaglia).

¹ These authors contributed equally to the work.

Abbreviations: HGF, hepatocyte growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; SCF, stem cell factor; Thr, thrombin; PBS, phosphate buffered saline

(10^{-9} – 10^{-12} g/ml) for different times (10–180 s) before stimulation or not with 0.02 U/ml thrombin, under continuous stirring. Platelet aggregation was monitored for 5 min in a Crono-log aggregometer as described [19].

2.3. Measurement of Met expression on platelets surface by flow-cytometry

Aliquots of platelet suspension (10^9 platelets/ml) were fixed with 0.5% paraformaldehyde, washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and incubated for 30 min under constant stirring with DO-24 or 9E10 (3 μ g/ml). After extensive washing, samples were incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG secondary antibodies (1:50) for further 30 min in the dark. Platelets were diluted 1:20 with PBS and analyzed on a Becton-Dickinson FACScalibur, acquiring data of 10000 particles per sample.

2.4. Measurement of PAC-1 binding by flow-cytometry

PAC-1 binding to platelets was measured as described by Moro et al. [19]. Platelets added with 100 pg/ml HGF, 0.02 U/ml thrombin, 0.02 U/ml thrombin 30 s after 100 pg/ml HGF, or buffer were treated with FITC-labelled PAC-1 antibody (2.5 μ g/ml) for 10 min at 37 °C and then blocked with 0.5% paraformaldehyde. Flow-cytometry analysis was carried out as described [19].

2.5. Statistical analysis

Values are reported as means \pm S.E.M. The significance of differences was determined with the paired *t*-test. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Met is expressed in human platelets

The expression of Met receptor at the cell surface was investigated on fixed platelets incubated with the DO-24 antibody specific for the Met extracellular domain [18], followed by FITC-conjugated anti-mouse-IgG secondary antibodies. Anti-Myc antibody was used as negative control. The fluorescence intensity in DO-24 treated cells was 11.3-folds higher than that measured in control samples (Fig. 1A). The difference between the mean values of fluorescence intensity measured in DO-24 and anti-Myc-treated cells (46.3 ± 10.9 and 5.3 ± 0.2 , respectively) was statistically significant ($P < 0.01$, $n = 3$) (Fig. 1B). It is thus concluded that Met protein is exposed at the platelet surface.

3.2. HGF inhibits thrombin-dependent platelet aggregation and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation

To evaluate the functionality and the role of Met receptor in human platelets, we next investigated the effect of its ligand HGF on platelet aggregation. Physiological doses of HGF (10^{-10} g/ml) did not elicit any detectable aggregation in platelets (Fig. 2). Therefore, we considered the possibility that HGF could modulate platelet aggregation induced by a physiological agonist such as thrombin. Indeed, HGF strongly inhibited aggregation, when added to platelet suspension 30 s before thrombin (Fig. 2).

HGF inhibited thrombin-dependent aggregation in a dose-dependent manner, with maximal inhibition (% of inhibition: 80.0 ± 28.8) starting from concentrations of 10^{-10} g/ml (Fig. 3A). Lower concentrations of HGF (10^{-11} – 10^{-12} g/ml) were still inhibitory (% of inhibition: 18.0 ± 5.1 and 6.1 ± 3.3 , respectively). These results suggest that HGF affects thrombin-dependent platelet aggregation acting through a high affinity membrane receptor.

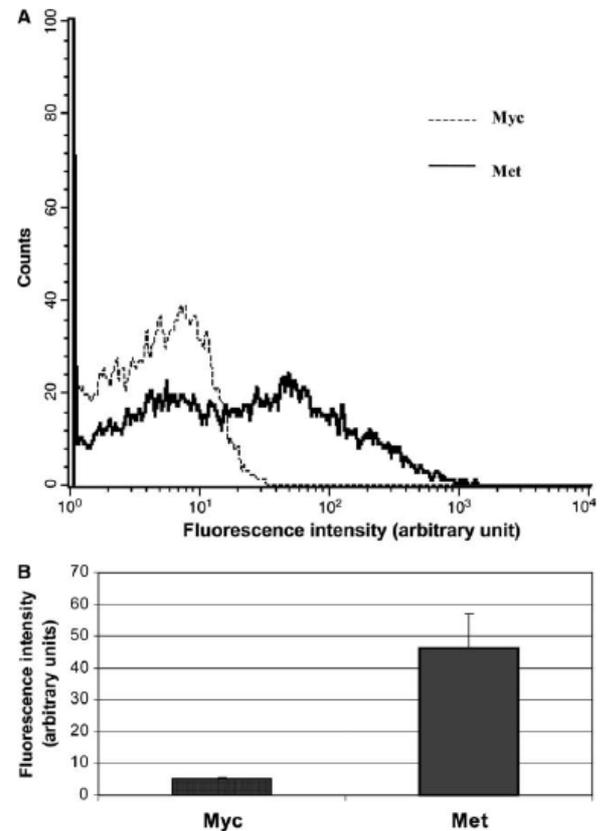


Fig. 1. Detection of Met receptor at the platelet surface by flow-cytometry. (A) Patterns of fluorescence intensity registered in a typical experiment. (B) Histograms derived from three independent experiments.

We then performed time-course experiments, in which HGF (10^{-10} g/ml) was added to platelet samples for different periods of time (10–30–180 s) before thrombin stimulation. The effect of HGF on thrombin-induced platelet aggregation was rapid and transient, with the peak of inhibition (80%) at 30 s (Fig. 3B). Pretreatment with HGF for 10 s caused a slight decrease in platelet aggregation (% of inhibition: $14.9 \pm 3.1\%$), while no inhibition was detected upon HGF preincubation for 3 min.

Platelet aggregation is dependent on agonist-induced activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, undergoing a conformational change, which is instrumental for the subsequent fibrinogen binding [20]. To evaluate a possible involvement of HGF in the $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation pathway, we investigated the activation status of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin by flow-cytometry using the fibrinogen mimetic FITC-PAC-1 monoclonal antibody. Results from 7 independent experiments are reported (Fig. 4). Consistent with its inability to promote platelet aggregation, HGF alone did not induce the activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Platelets preincubated for 30 s with 10^{-10} g/ml HGF before stimulation with thrombin showed a significant decrease in the amount of PAC-1 bound to the cells, when compared with that bound to platelets stimulated with thrombin alone. The mean values of fluorescence intensity detected in thrombin-stimulated platelets were 6.47 ± 1.67 in the absence and 3.13 ± 0.73 in the presence of

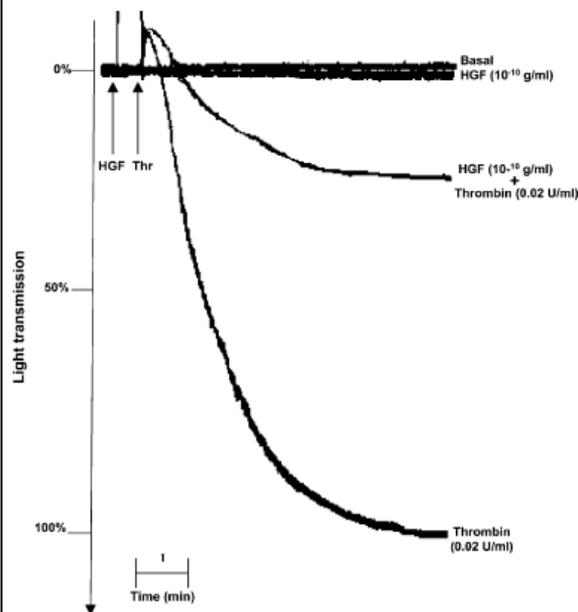


Fig. 2. Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation by HGF. Aggregation traces are from a representative experiment out of the six performed with platelets obtained from different donors.

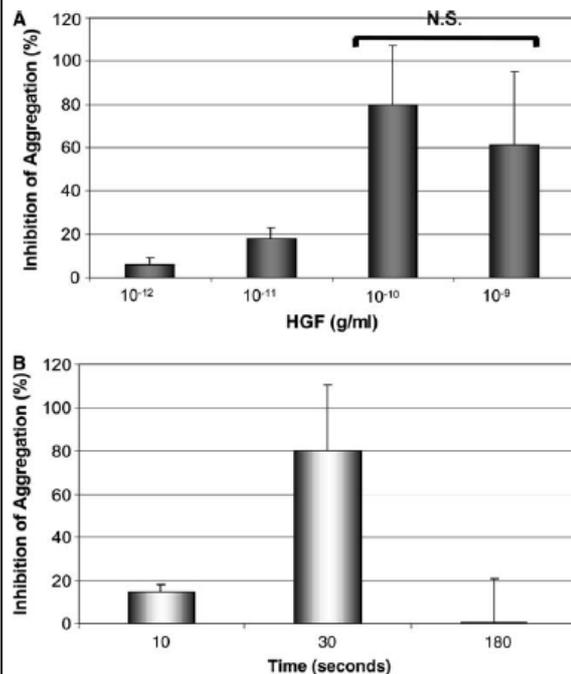


Fig. 3. Dose-dependence (Panel A) and time-course (Panel B) inhibition of thrombin-induced platelet aggregation by HGF. Light transmission was monitored as described in Fig. 2. Data are reported as % inhibition of thrombin-induced aggregation in the absence of HGF and are means \pm S.E.M. of six independent experiments performed with platelets from different donors.

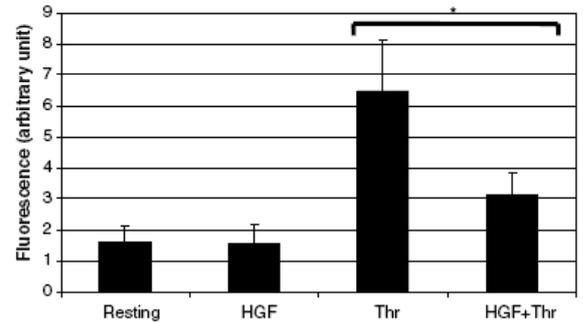


Fig. 4. Inhibition of thrombin-induced activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin by HGF. Binding of the FITC labelled fibrinogen mimetic PAC-1 antibody to platelets. Data are means \pm S.E.M. of seven independent experiments performed with platelets from different donors.

HGF. Therefore these results indicated that HGF caused a 50% reduction of the PAC-1 bound to thrombin-stimulated platelets (*) ($P < 0.05$; $n = 7$).

4. Discussion

In this work, we report for the first time that human platelets express the HGF receptor at their surface, and that HGF plays an active role in negatively regulating platelet function. Indeed, although HGF by itself did not elicit any functional response in platelets, it triggered a dramatic inhibition of thrombin-induced platelet aggregation, preventing $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin conformational activation.

HGF receptor expression was clearly detected at the surface of resting platelets by cytofluorimetry, although we found a certain heterogeneity in the expression levels of Met within platelets. HGF inhibited thrombin-dependent platelet aggregation in a dose-dependent manner, when added to platelets 30 s before agonist stimulation. Strong inhibition was observed at picomolar concentrations (10^{-10} – 10^{-12} g/ml), which are reported to be the optimal doses also in other cell systems, confirming that the high affinity Met receptor was involved in this effect [6]. The effect of HGF on agonist-dependent platelet aggregation was rapid and transient, since platelets incubated with HGF for times longer than 30 s were not inhibited in their thrombin-induced aggregation. The finding that only a moderate decrease (25–30%, as measured by flow cytometry, data not shown) in the cell surface expression of Met receptor was observed upon HGF incubation suggests that a mechanism other than downregulation is responsible for the absence of a biological response at delayed times. Receptor desensitization may be a possibility. Apparently Met receptor is particularly prone to inactivation/desensitization, since once platelets were activated by thrombin, HGF was unable to modulate their response (data not shown).

Although HGF-dependent inhibitory pathway in activated platelets remains to be characterized, our results indicated that HGF inhibits inside-out signalling of the fibrinogen receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ [20]. Indeed the effect of HGF on thrombin-dependent platelet aggregation was found to be a consequence of the inhibition exerted by HGF on thrombin-induced activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Upon stimulation platelets release from their

granules vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) [21,22] which are thus readily disposable to amplify or modulate platelet responses with an autocrine–paracrine mechanism, since these cells can express the cognate receptors [23,24]. Platelets contains also HGF [17], but it is still debated whether this cytokine is actively released upon stimulation.

VEGF, as well as the c-Kit ligand stem cell factor (SCF), were reported to bind and enhance platelet aggregation, but only if cells were previously activated by physiological agonists [24,25]. This finding strongly suggests that the active ligand-binding conformation of these receptors is not exposed at the surface of resting platelets, but their priming is required. By contrast, resting platelets can bind HGF and PDGF and in these cases ligand-receptor interaction results in inhibition of thrombin-induced platelet aggregation [data reported here and 23]. Platelets are easily activated by mechanical and biochemical stimuli; however, all the above growth factors do not have any effect by themselves, they can only modulate either positively or negatively platelet activation triggered by a physiological agonist. The fact that the enhancing factors VEGF and SCF can exert their effect only on pre-activated platelets, while the negatively regulating factors PDGF and HGF can exert their priming effect on resting cells, is rather intriguing and suggest that this may be part of a more general mechanism aimed at controlling platelet activation.

Both HGF and PDGF modulate negatively thrombin-induced platelet aggregation. In vivo they are significantly increased in the thrombus, where they could be involved in controlling platelet activation and limiting thrombus formation. At systemic level HGF and PDGF concentrations are similar [13,26], but, since only HGF is able to inhibit platelet aggregation at these physiological concentrations, PDGF inhibition requiring about 1000 times higher levels, the negative feedback on some eventual platelet systemic activation would depend mostly on HGF, while PDGF could act mainly locally.

HGF is a pleiotropic cytokine, which generally promotes positive cellular responses, such as motility, proliferation, morphogenesis and protection from apoptosis [1]. Its increased plasmatic levels upon organ injury can be interpreted as an adaptive response of the organism to cope with the adverse status, trying to preserve or recover homeostasis. Indeed it is increased in different cardiovascular pathologies, including hypertension [15], arterial thrombosis and atherosclerosis [14,16] and myocardial infarction, where its cardioprotective role has been clearly demonstrated [11]. The negative regulation of platelet activation reported here would anyway result in a protective, and thus beneficial action, of HGF against vascular thrombotic events.

Acknowledgments: Work supported by grants from Regione Piemonte and MIUR–Italy.

References

- [1] Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. and Vande Woude, G.F. (2003) Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915–925.
- [2] Trusolino, L. and Comoglio, P.M. (2002) Scatter factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 289–300.
- [3] Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T. and Gallagher, J.T. (1994) Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J. Biol. Chem.* 269, 11216–11223.
- [4] Miyazawa, K., Shimomura, T. and Kitamura, N. (1996) Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J. Biol. Chem.* 271, 3615–3618.
- [5] Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F. and Aaronson, S.A. (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science* 251, 802–804.
- [6] Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R.P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. and Comoglio, P.M. (1991) Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501–504.
- [7] Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Olivero, M., Bretti, S., Giordano, S., Medico, E., Gaglia, P., Zara, P. and Comoglio, P.M. (1991) Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6, 1997–2003.
- [8] Prat, M., Narsimhan, R.P., Crepaldi, T., Nicotra, M.R., Natali, P.G. and Comoglio, P.M. (1991) The receptor encoded by the human c-Met oncogene is expressed in hepatocytes, in epithelial cells and in solid tumors. *Int. J. Cancer* 49, 323–328.
- [9] Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., Dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P.M. (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261–271.
- [10] Rappolee, D.A., Iyer, A. and Patel, Y. (1996) Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. *Circ. Res.* 78, 1028–1036.
- [11] Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., Matsuda, H. and Nakamura, T. (2000) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.* 106 (12), 1511–1519.
- [12] Bussolino, F., Di Renzo, M.F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A. and Comoglio, P.M. (1992) Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell. Biol.* 119, 629–641.
- [13] Zhu, Y., Hojo, Y., Ikeda, U. and Shimada, K. (2000) Production of hepatocyte growth factor during acute myocardial infarction. *Heart* 83, 450–455.
- [14] Matsumori, A., Ono, K., Furukawa, Y., Okada, M. and Sasayama, S. (1998) Circulating hepatocyte growth factor as an early marker of arterial thrombus formation. *Jpn. Circ. J.* 62 (4), 311–313.
- [15] Komai, N., Ohishi, M., Morishita, R., Moriguchi, A., Kaibe, M., Matsumoto, K., Rakugi, H., Higaki, J. and Ogihara, T. (2002) Serum hepatocyte growth factor concentration is correlated with the forearm vasodilator response in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* 15, 499–506.
- [16] Kawamoto, R., Oka, Y., Yoshida, O. and Takagi, Y. (2003) Significance of serum circulating hepatocyte growth factor in the development of carotid atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 154–159.
- [17] Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Purification characterization of a growth factor from rats platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6489–6493.
- [18] Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P. and Comoglio, P. (1991) C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5954–5962.
- [19] Moro, L., Reineri, S., Piranda, D., Pietrapiana, D., Lova, P., Bretoni, A., Graziani, A., Defilippi, P., Canobbio, I., Torti, M. and Sinigaglia, F. (2005) Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase. *Blood* 105, 115–121.
- [20] Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M. and Brass, L.F. (1985) Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb–IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 260, 11107–11114.

- [21] Webb, N.J., Bottomley, M.J., Watson, C.J. and Brenchley, P.E. (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin. Sci. (Lond)*. 94, 395–404.
- [22] Heldin, C.H. and Westermark, B. (1990) Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.* 1, 555–566.
- [23] Vassbotn, F.S., Havnen, O.K., Heldin, C.H. and Holmsen, H. (1994) Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 13874–13879.
- [24] Selheim, F., Holmsen, H. and Vassbotn, F.S. (2002) Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 512, 107–110.
- [25] Grabarek, J., Groopman, J.E., Lyles, Y.R., Jiang, S., Bennett, L., Zsebo, K. and Avraham, H. (1994) Human kit ligand (stem cell factor) modulates platelet activation in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 21718–21724.
- [26] Tahara, A., Yasuda, M., Itagane, H., Toda, I., Teragaki, M., Akioka, K., Oku, H., Takeuchi, K., Takeda, T. and Bannai, S., et al. (1991) Plasma levels of platelet-derived growth factor in normal subjects and patients with ischemic heart disease. *Am. Heart J.* 122, 986–992.

Il sistema HGF/Met nelle cellule staminali

Il fattore di Crescita Epatocitario (HGF), è una citochina pleiotropica di origine mesenchimale, in grado di evocare risposte di tipo motorio, proliferativo, e di sopravvivenza in diversi tipi cellulari, cellule staminali. Le vie di trasduzione del segnale coinvolte, non sono del tutto ancora note. Gli studi condotti ha voluto indagare il ruolo di HGF in cellule staminali mesenchimali (MSC), ed hanno documentato che la stimolazione con HGF di queste cellule per tempi brevi induce la fosforilazione e attivazione del recettore Met e delle cascate trasduzionali mediate dagli effettori ERK1/2, p38 MAPK, e PI3K/AKT, mentre stimolazioni per tempi lunghi evocavano effetti di riarrangiamento citoscheletrico, migrazione cellulare, e inibiscono la proliferazione, attraverso il blocco del ciclo cellulare al “checkpoint” tra la fase G₁/S.

Trattando le cellule staminali mesenchimali, con la molecola K252A, inibitore delle tirosina chinasi, gli effetti indotti da HGF sono inibiti.

Gli effetti inibitori sulla proliferazione delle MSC viene revertita trattando le cellule con l’inibitore di p38 SB203580, mentre il trattamento con Wortmannina, inibitore specifico di PI3K, blocca le risposte motorie evocate da HGF, suggerendo che la citochina agisce attraverso diverse vie di traduzione per indurre le complesse risposte biologiche nelle cellule staminali mesenchimali.

Trattamenti prolungati con HGF di cellule staminali mesenchimali, hanno documentato l’induzione dell’espressione di marcatori cellulari specifici della linea cardiomiogenica (GATA-4, MEF2C, TEF1, desmina, α -MHC, β -MHC, e nestina), e la contemporanea perdita di espressione degli specifici marcatori staminali nucleostemina, c-kit e CD105.

(Si allega testo originale)

STEM CELLS®

Tissue-Specific Stem Cells

Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration, and Differentiation

GIANCARLO FORTE,^a MARILENA MINIERI,^a PAOLO COSSA,^a DANIELE ANTENUCCI,^a MARILENA SALA,^b
VIOLA GNOCCHI,^b ROBERTA FLACCAVENTO,^a FELICIA CAROTENUTO,^a PAOLO DE VITO,^c
PATRIZIA MORENA BALDINI,^c MARIA PRAT,^b PAOLO DI NARDO^a

^aMolecular and Cellular Cardiology Lab, Department of Internal Medicine, University of Rome "Tor Vergata," Italy. ^bDepartment of Medical Sciences, University "A. Avogadro" of Piemonte Orientale, Novara, Italy. ^cDepartment of Biology, University of Rome "Tor Vergata," Italy

Key Words: Met receptor • Mesenchymal stem cells • Hepatocyte growth factor • p38 • Akt

ABSTRACT

Hepatocyte growth factor (HGF), a pleiotropic cytokine of mesenchymal origin promoting migration, proliferation, and survival in a wide spectrum of cells, can also modulate different biological responses in stem cells, but the mechanisms involved are not completely understood so far. In this context, we show that short-term exposure of mesenchymal stem cells (MSCs) to HGF can induce the activation of its cognate Met receptor and the downstream effectors ERK1/2, p38MAPK, and PI3K/Akt, while long-term exposure to HGF resulted in cytoskeletal rearrangement, cell migration, and marked inhibition of proliferation through the arrest in the G₁-S checkpoint.

When added to MSCs, the K252A tyrosine kinase inhibitor prevented HGF-induced responses. HGF's effect on MSC proliferation was reversed by p38 inhibitor SB203580, while the effects on cell migration were abrogated by PI3K inhibitor Wortmannin, suggesting that HGF acts through different pathways to determine its complex effects on MSCs. Prolonged treatment with HGF induced the expression of cardiac-specific markers (GATA-4, MEF2C, TEFL, desmin, α -MHC, β -MHC, and nestin) with the concomitant loss of the stem cell markers nucleostemin, c-kit, and CD105. *STEM CELLS* 2006;24: 23–33

INTRODUCTION

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) display a great transdifferentiation potential in adult organisms, being able to differentiate in cell lineages different from those of the original tissue [1]. So far, unidentified mechanisms and factors may disclose such a plasticity that could be exploited by the organism to regulate cell turnover, substitute injured cells, and repair

tissue architecture. In this context, a major challenge is represented by the identification of growth factors that selectively promote MSC proliferation, migration, and differentiation, opening great prospects for future stem cell-based tissue engineering [1, 2].

Hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic cytokine of mesenchymal origin, promoting motility, proliferation, inva-

Correspondence: Paolo Di Nardo, M.D., Dipartimento di Medicina Interna, Università di Roma "Tor Vergata," Via Montpellier, 1, 00133 Roma, Italy. Telephone: +39-06-72594215; Fax: +39-06-2024130 or +39-06-72594263; e-mail: dinardo@med.uniroma2.it
Received August 3, 2004; accepted for publication June 20, 2005; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* August 11, 2005.
©AlphaMed Press 1066-3099/2006/\$12.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2004-0176

STEM CELLS 2006;24:23–33 www.StemCells.com

sion, morphogenesis, and survival of a wide spectrum of cells, namely epithelial and endothelial cells [3, 4]. The coordinated integration of these processes plays a pivotal role in organ formation during embryogenesis and tissue homeostasis in adults. HGF directs tubulogenesis during kidney [5] and mammary gland [6] development and angiogenesis [7] and is a chemoattractant for motor neuron axons [8] and myoblast precursors [9, 10] and a survival factor for hepatocytes [11] and placenta [12]. In adults, HGF is involved in kidney and liver regeneration [13]; it displays *in vivo* cytoprotective activity in different cell types of injured organs [14]. Inappropriate activation of the HGF signaling pathway results in tumorigenesis and metastatic spreading of tumor cells [15]. Biological responses elicited by HGF are mediated by its high affinity receptor, the tyrosine kinase encoded by the *met* proto-oncogene [16, 17]. The Met receptor is a disulfide-linked heterodimeric glycoprotein, in which the transmembrane β -chain contains the kinase domain and a unique multifunctional docking site [18], which upon tyrosine phosphorylation, recruits different signal transducers and adaptors, such as Gab-1, SHC, and GRB2 [3, 4, 19]. The latter two couple the Met receptor with the ras-mitogen-activated protein kinase (ras-ERK1/2 MAPK) pathway, while Gab-1 binds PI3-kinase efficiently.

Although biochemical and biological responses induced by HGF on primary cultured cells or established cell lines have been extensively studied, little information is presently available on undifferentiated cells. In human embryonic stem cells, HGF induced differentiation into the three embryonic germ layers [20]. In the presence of Matrigel and FGF-4, HGF induced multipotent adult progenitor cells from bone marrow to differentiate into functional hepatocytes *in vitro*, but its presence seemed to be dispensable [21]. Hemopoietic stem cells purified from bone marrow and primed with HGF *in vitro* were also found to differentiate into a hepatocyte lineage [22, 23]. Moreover, it was recently reported that human MSCs produce HGF and express a functional Met receptor [24]. Finally, Duan and colleagues [25] demonstrated that the overexpression of HGF by MSCs engrafted into ischemic myocardium can improve their incorporation in the organ, reducing infarct size, improving heart functions, and inducing angiogenesis.

The present study was undertaken to investigate (a) the biochemical pathways involved in HGF activity on mouse MSCs isolated from bone marrow in terms of proliferation and migration, and (b) the possible effects on cell differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

MSCs were obtained from 6-week-old female C3H/He mice femurs according to Friedenstein's protocol [26]. Ice-cold phos-

phate-buffered saline (PBS) was flushed into the bone shaft, the pellet was resuspended in 5 ml of 5 mM EDTA for 30 seconds, and then an equal volume of 1.8% NaCl was added (hypotonic lysis). The Lin⁺ fraction was eliminated by a magnetic cell-sorting protocol (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany, <http://www.miltenyibiotec.com>). Briefly, cells obtained from bone marrow were incubated with a cocktail of Biotin-conjugated monoclonal antibodies (CD5, CD45R [B220], CD11b, antiLy-6G [Gr-1], 7-4, and Ter-119) and then separated by anti-Biotin microbeads-conjugated secondary antibody. Aliquots of the two separated cell subpopulations (Lin⁺ and Lin⁻) were then stained with anti-Biotin phycoerythrin-conjugated secondary antibody and analyzed with fluorescence-activated cell sorting (FACS). The Lin⁺ fraction was resuspended in complete Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Cambrex Bio Science, Walkersville, Belgium, <http://www.cambrex.com>) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Cell concentration was adjusted at 0.5×10^6 per cm². After 4–6 days, an adherent population of MSCs appeared. Medium was replenished, floating cells were removed after 7 and 12 days, and the final adherent cell population was used for the experiments. Serum was omitted from the culture medium in the final passage.

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Semiquantitative and Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted by Trizol Reagent (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, <http://www.gibcoBRL.com>).

Reverse transcription (RT) was carried out with 2 μ g of RNA for each sample using RT M-MLV (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) in the presence of random hexamer. Semiquantitative analysis of RNA expression was carried out by RT–polymerase chain reaction (PCR) by comparing the control transcript (GAPDH [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase]) and the transcript of interest when their amplification was in the exponential phase. The primers used are reported in Table 1. PCR products were size-fractionated in 2% agarose gel electrophoresis.

For real-time RT-PCR, each reaction was performed in a final volume of 20 microl of Universal Master Mix without AmpErase Uracyl N-Glycosylase 2X (UMM no UNG, Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>), murine HGF, Met primers, probe 20X (Mm0115182 ml and Mm00434924 ml assays; Applied Biosystems), and 0.5 microl of template cDNA. As active references, 18S RNA (mammalian 18S PDAR; Applied Biosystems) was used. In each experiment, single samples were amplified three times and each experiment was a triplicate. The system used was the 700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). In inhibition

Table 1. Primers used in the study

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
HGF	5'-GGCCTTCGTTTTTGATAAGTC-3'	5'-TTCATGGGGGATCATGGGAAT-3'
α -MET	5'-TTCTTGAATGCTACACCCCA-3'	5'-TCACACCCACTTCATGCCACAT-3'
NST	5'-GGGAAAAGCAGTGTTCATTA-3'	5'-GGGATGGCAATAGTAACC-3'
α -MHC	5'-GGAAAGTGTGAGCGGCCATCAAGG-3'	5'-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTGG-3'
β -MHC	5'-GCCAA CACCAACCTGTCCAAGTTC-3'	5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3'
MEF2C	5'-AGCAAGAATAACGATGCCATC-3'	5'-GAAGGGGTGGTGGTACGGTC-3'
TEF1	5'-AAGCGTCAAGCCCTTTGTG-3'	5'-AAAGGAGCACACTTTGGTGG-3'
MLC 2a	5'-CAGACCTGAAGGAGACCT-3'	5'-GT CAGCGTAAACAGTTGC-3'
MLC 2v	5'-GCCAA GAAGCGGATAGAAGG-3'	5'-CTGTGGTT CAGGGCTCAGTC-3'
ANP	5'-TTGGCTTCAGGGCCATAATTG-3'	5'-AAGAGGGCAGATCTATGGGA-3'
Desmin	5'-TCTACGAGGAGGAGATGGGC-3'	5'-GGACCTGCTGTTCCTGAAGC-3'
GAPDH	5'-CAAGATGGTGAAGGTGGGTGTG-3'	5'-GGGGTAAGCAGTTGTGT CAGGAT-3'

Abbreviations: ANP, atrial natriuretic peptide; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HGF, hepatocyte growth factor; MEF2C, myogenic enhancer factor 2C; MHC, myosin heavy chain; MLC 2a/v, myosin light chain 2 atrial/ventricular; NST, nucleostemin; TEF1, transcriptional enhancer factor 1.

experiments, cells were concomitantly incubated with K252a tyrosine kinase inhibitor (EMD Biosciences, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, <http://www.emdbiosciences.com>).

Stimulation, Immunoprecipitation, and Western Blot Analysis

Quiescent MSCs were incubated for 15 minutes at 37°C in the absence, or presence, of 20 ng/ml of human recombinant HGF (ReliaTech, Braunschweig, Germany, <http://www.reliatech.de>), washed twice with cold PBS, and lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, and 2 mM ortho-vanadate) and a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>). The HGF dose was chosen after preliminary dose-response experiments. Cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 15 minutes and incubated 2 hours with a mixture of DO-24 and DN-30 monoclonal antibodies and rabbit anti-mouse antibodies coupled to Sepharose-protein A (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, U.K., <http://www1.amershambiosciences.com>), as described by Prati et al. [27]. Immunoprecipitates were washed with ice-cold RIPA buffer, solubilized in reducing Laemmli buffer, and resolved on SDS-PAGE, followed by transfer onto polyvinylidene difluoride (PVDF) filters. Filters were blocked with methanol for 10 minutes at 20°C and probed with the appropriate antibodies (anti-phosphotyrosine [UBI, Lake Placid, NY] or anti-Met SP-260 [Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>]) diluted in Tris-buffered saline-5% bovine serum albumin for 2 hours at 22°C.

MSCs were also treated with 20 ng/ml HGF for 10, 30, and 60 minutes and, after washing with cold PBS, lysed in 100 μ l of reducing Laemmli sample buffer; extracts were clarified and protein content quantified by Bradford method (Amresco, Inc., Solon, OH, <http://www.amresco-lac.com>). Thirty micrograms of the clarified extracts was run in 12.5% SDS-PAGE followed

by transfer to a PVDF membrane. Western analysis was carried out using the following primary antibodies: monoclonal antibodies (mAbs) against phosphorylated-ERK1/2 MAPK (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, <http://www.cellsignal.com>), mAbs against phosphorylated-Akt, phosphorylated-p38, p38 (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), polyclonal Abs against Akt1/2, ERK1/2, Met, α HGF (Santa Cruz Biotechnology), polyclonal antibodies (pAbs) against p27^{WAF1}, p21^{WAF1} (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, <http://www.labvision.com>), and mAb against pRB (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com/pharmingen>). After extensive washing, immunocomplexes were detected with horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibodies followed by enhanced chemiluminescence reaction (ECLTM, Amersham).

Proliferation Assay

For cell growth assay, 2.5×10^3 cells were seeded in 96-well microplates, grown for 12 hours in 10% FCS and then starved in 2% FCS for 24 hours. Cells were then switched to 2% serum supplemented, or not supplemented, with 20 ng of HGF per ml, or to 10% serum. Fresh medium plus and minus HGF was replenished. Cells were also incubated in 10% FCS, in the presence of 20 ng HGF per ml. Cells were pulsed with 1 μ Ci per ml [³H]-thymidine and incubated for 3 hours. After trypsin treatment, cells were harvested by centrifugation and treated with 5% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 minutes. The TCA-insoluble fraction was resuspended in 0.1% SDS in 200 mM NaOH, and the samples, after addition of 7 ml Optifluor (Packard Instruments, Downers Grove, IL, www.packardbiolab.com), were counted for radioactivity by a liquid scintillation counter (Tricarb 2180 TR, Packard Instruments). As indicated in some experiments, prior to stimulation, cells were preincubated for 1 hour with specific inhibitors. Statistical analysis of the data was carried out using the Student's *t*-test.

FACS Analysis

To stain isolated nuclei, cells were incubated with 25 μ g/ml of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) in a solution containing 2% Triton X-100. In parallel experiments, MSCs were doubly stained with PI and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Annexin V (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). After 30 minutes of incubation, cells were washed with ice-cold PBS and analyzed in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences Pharmingen).

Wound Healing Assay

For wound healing assay, 5×10^5 cells were grown in a 15-mm culture dish and allowed to reach confluence and further incubated in medium containing 2% FCS for 18 hours. The monolayers were then wounded with a plastic pipette as described [28]. After wounding, cells were washed with PBS and incubated for 24 hours in medium containing 2% FCS, with or without HGF (20 ng/ml), in the presence, or absence, of 30 nM of Met tyrosine kinase inhibitor K252a (Calbiochem-Novabiochem Intl.) added immediately before stimulation with HGF, fixed with 1% glutaraldehyde and stained with hematoxylin and eosin. Images of cell samples were taken with a digital camera.

Transwell Migration Assay

The assay for chemotaxis was performed in Transwell chambers (Corning Costar Italia, Concorezzo, Italy). Briefly, 200 μ l of medium containing MSCs was seeded on the upper side of a porous polycarbonate membrane (pore size: 8 μ m). Five hundred microliters of medium containing, or not containing, HGF in the presence of 2% FCS was added to the lower compartment. The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 48 hours. In inhibition experiments, cells were preincubated with K252a inhibitor for 1 hour. At the end of incubation, the cells at the upper side of the filter were mechanically removed. Cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed for 30 minutes in 1% glutaraldehyde and stained with hematoxylin and eosin. Five to ten random fields were counted for each filter.

Immunofluorescence

MSCs were seeded on chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA, <http://www.nalgenunc.com>) and treated, or not treated, with 20 ng/ml HGF for 24, 48, 72, and 96 hours. Cells were washed in PBS, fixed in paraformaldehyde 4% in PBS containing CaCl₂ for 30 minutes at 4°C and permeabilized with 0.1% Triton X-100. F-actin was labeled with Tetra-rhodamine-conjugated Phalloidin in methanol 50% for 30 minutes. Cells were stained with antibodies for c-kit, CD105, GATA-4 (Santa Cruz Biotechnology), nestin (Chemicon International, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>), and α -myosin heavy chain (monoclonal antibody MF-20 [29]). As secondary antibodies, FITC-conjugated mouse anti-goat and

goat anti-mouse (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, England, <http://www.vectorlabs.com/uk>) were used. Nuclei were stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Incubation with FITC-labeled secondary antibody in the absence of specific primary antibody was used to exclude the occurrence of unspecific signals.

RESULTS

Phenotype of the Cells Purified from Bone Marrow
Cells were negatively selected by magnetic cell sorting on the basis of the expression of Lin surface molecules and positively selected for their ability to adhere to plastic substrate. Before plating on plastic dishes, aliquots of the Lin^{int} and Lin^{int} fractions were analyzed by FACS to assess the preparation quality and the Lin^{int} fraction was found to be 98% pure (data not shown). The cells resulting after plating were c-kit^{int}, CD105^{int}, nucleostemin^{int}, α -smooth muscle actin^{int}, nestin^{int}, Sca-1^{int}, CD34^{int}, and CD45^{int}. They did not express any muscle-specific marker.

MSCs Express Functional HGF and Met Receptor, Both of Which Can Be Upregulated

Recently, Neuss and colleagues demonstrated that human MSCs express HGF and its receptor c-Met [24]. To assess the expression of HGF and c-Met in mouse MSCs from bone marrow, PCR was performed on cDNA obtained from RNA extracts of purified MSCs. MSCs were found to express low levels of mRNAs for HGF and Met, both of which were upregulated upon 48 hours of treatment with HGF (20 ng/ml) (Fig. 1A). In parallel, PCR was performed also on non-reverse-transcribed RNA samples, to exclude the possibility of positive results due to contaminating genomic DNA. Real time RT-PCR performed on cells stimulated with HGF confirmed the upregulation of both HGF and its receptor, Met. Simultaneous treatment with 30 nM tyrosine kinase inhibitor K252a [30] nearly completely abolished the expression of HGF and its receptor (Fig. 1B). Untreated MSCs released in their supernatants low levels of HGF, detectable and quantified in a scatter assay in 32 scatter U/ml, equivalent to 7 ng/ml, when assayed in ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [31]. The receptor was functional, as it could be phosphorylated upon stimulation with 100 ng/ml of HGF for 10 minutes (Fig. 1B). These data suggest that the exogenously added HGF could trigger the activation of both its own receptor and the ligand. MLP29 oval cells [32] were used as positive controls for Met expression.

HGF Activates ERK1/2, p38 MAP Kinases, and Akt
Because HGF activates downstream effectors, such as ERK1/2, p38 MAPKs, and PI3K in several cell types [18, 33], we

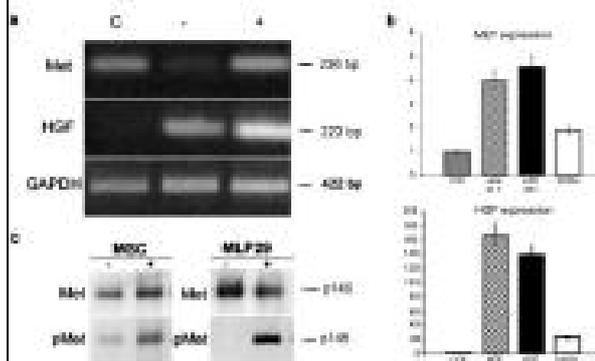


Figure 1. Hepatocyte growth factor (HGF) and Met expression in mouse mesenchymal stem cells (MSCs). (A) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of RNA isolated from quiescent MSCs either untreated (-) or treated (+) with HGF (20 ng/ml) for 48 hours. The Met (top panel) and the HGF (middle panel) major transcripts are detectable in untreated MSCs and upregulated by HGF treatment of 48 hours. RNA from MLP-29 was used as control (C). To verify the quality of RNA, RT-PCR was carried out in parallel with a probe specific for GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (bottom panel). (B) Quantitative PCR using HGF and Met-specific probes was performed on cDNA obtained from RNA extracted from MSCs treated, or not treated, with HGF in the presence, or absence, of tyrosine kinase inhibitor K252a. (C) Western immunoblotting analysis of Met expression (top panel) and HGF-induced activation (bottom panel) in MSCs. Detergent extracts from MSCs, as well as from cells expressing a physiological level of the Met receptor (MLP-29, positive control), were immunoprecipitated with a mixture of DO-24 and DN-30 Met antibodies, separated by SDS-PAGE, transferred onto membrane, and probed with SP-260 Met antibodies (Met) and antiphosphotyrosine antibodies (P-Met). Similar amounts of proteins were used as detected in Western blot with anti-Met antibodies (top panel). All experiments are representative of three replicates.

investigated the potential involvement of these effectors in HGF-stimulated MSCs. Indeed, phosphorylation of ERK 1/2 and p38 MAPKs was time-dependent, peaking within 10 minutes (Figs. 2A, 2C), whereas Akt phosphorylation was prolonged for at least 1 hour (Fig. 2B). These responses were completely abolished by 1 hour of pretreatment with 30 μ M PD98059, 30 μ M SB203580, and 100 nM Wortmannin, specific inhibitors of ERK1/2, p38, and PI3K, respectively. Finally, to strengthen the idea that these responses were specifically dependent on HGF-induced Met-mediated activation, preliminary experiments infecting MSCs with a lentiviral vector [34] carrying a small interfering RNA (siRNA) specific for Met (sequence 5' ACUCUAGAUGUCUCAGACUU 3'), previously reported to downregulate Met expression and HGF-dependent effects in other cell types [35], were performed. Indeed, in these cells, a significant reduction of ERK 1/2 phosphorylation was observed (Tautli et al., personal communication).

www.StemCells.com

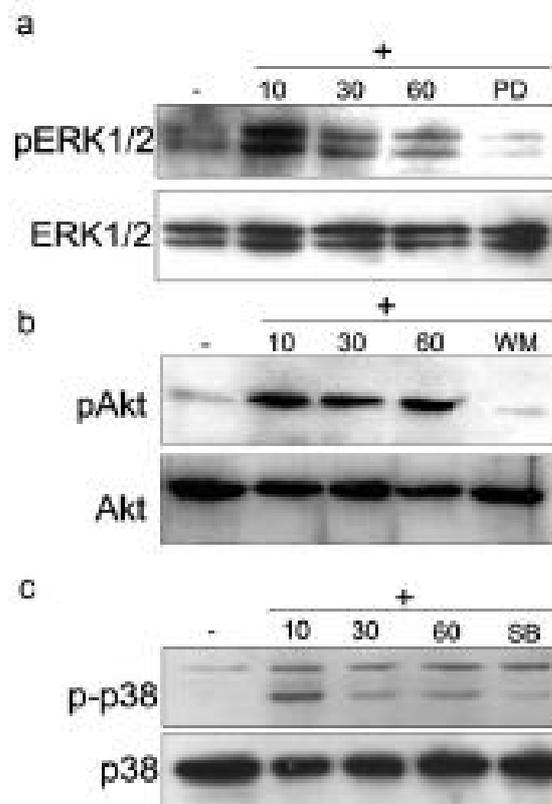


Figure 2. Hepatocyte growth factor (HGF) activates ERK1/2, p38 MAPKs, and Akt. (A) Quiescent mesenchymal stem cells were either left unstimulated (-) or stimulated with HGF at 20 ng/ml for the indicated times. Total cell lysates were resolved in SDS-PAGE, Western blotted, and immunoprobed with antibodies against the active phosphorylated forms of ERK1/2, p38, and Akt (pERK1/2, p38, and pAkt) or against the total proteins (ERK1/2, p38, Akt). Protein phosphorylation induced at 10 minutes of stimulation was inhibited if cells were pretreated for 1 hour with specific inhibitors: PD98059 (30 μ M PD), SB203580 (30 μ M SB), and Wortmannin (100 nM WM), respectively. All experiments are representative of three replicates.

HGF Inhibits MSC Proliferation

HGF is a pleiotropic cytokine promoting multiple biological effects, namely mitogenesis, motogenesis, survival, and morphogenesis in a cell type-specific fashion [4]. Experiments were thus carried out to investigate the effect of HGF on MSC proliferation. Cells were plated at low density in IMDM plus 10% FCS for 24 hours. They were then starved in low FCS-containing medium (2%) for an additional 24 hours, treated or not treated for 1 hour with specific inhibitors for ERK 1/2, p38 MAPKs, and PI3K, and finally switched to 2% FCS supplemented or not supplemented with 20 ng HGF/ml, or to 10% FCS (control). Cells were replenished with respective fresh medium after 24 hours, and cell proliferation was monitored by [3 H]-thymidine uptake in a time-course experiment. The results re-

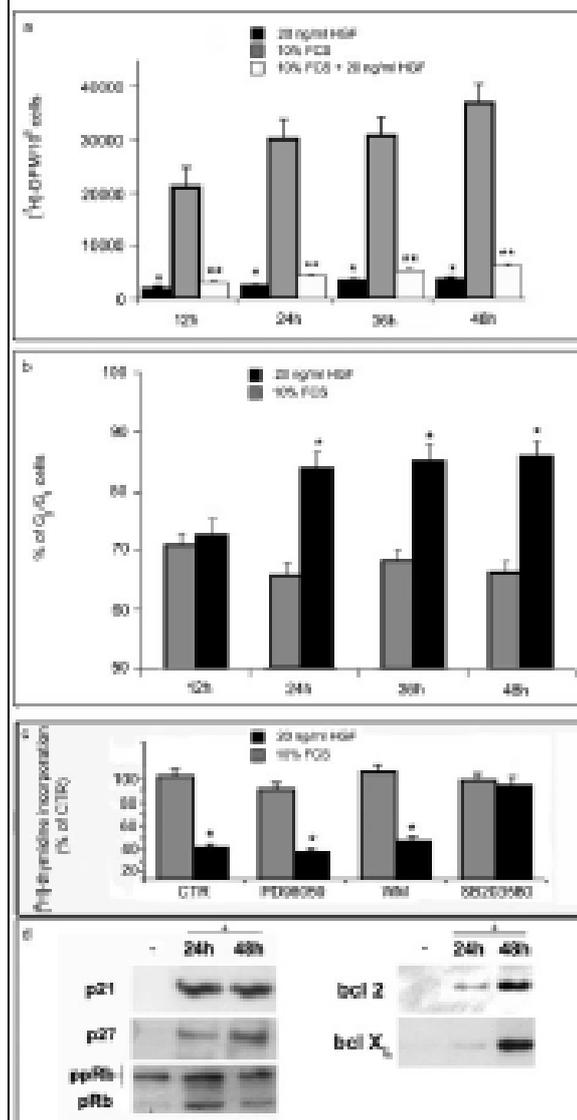


Figure 3. Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on mouse mesenchymal stem cell (MSC) proliferation. (A): Cells (2.5×10^5) were seeded in 96-well microplates, grown for 12 hours in 10% fetal calf serum (FCS), and then starved in 2% serum for 24 hours. Cells were switched to 2% serum supplemented with HGF 20 ng/ml (black), or to 10% serum (gray), or to 10% serum containing HGF 20 ng/ml (white), and incubated for the indicated times, with change of medium every second day. Cells were pulsed with $1 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-thymidine, incubated for 3 hours, and counted for radioactivity by a liquid scintillation counter (Tricarb 2180 TR). (B): Cells prepared as described in Materials and Methods were stained with $25 \mu\text{g/ml}$ of propidium iodide in a solution containing 2% Triton X-100. The number of cells in G₀/G₁ phase was analyzed in a FACScaliber flow cytometer. (C): MSCs were treated, or not treated, with HGF after 1 hour of pretreatment with the indicated inhibitors: PD98059, Wortmannin, and SB203580. Cells were pulsed with $1 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-thymidine, incubated for 3 hours, and counted for radioactivity by a liquid scintillation counter (Tricarb 2180 TR). Each value represents the mean of six replicates \pm SEM. Samples treated with SB203580 were not significantly different from the untreated control samples, indicating that this drug reverted the inhibition exerted by HGF. (D): Western blot analysis of p21^{WAF1}, p27^{IP1}, pRb (left panel) and of bcl-2 and bcl-X_L (right panel) expression in MSCs either untreated or treated with HGF for the indicated times. Bars represent the mean of four independent experiments \pm SEM. *, $p < .001$, compared with MSCs treated with 10% FCS. **, $p < .001$, compared with MSCs treated with 10% FCS. All the experiments are representative of three replicates, unless otherwise stated.

ported in Figure 3A show that HGF did not induce a proliferative response in MSCs, whereas cells treated with 10% FCS grew significantly. The finding that HGF can inhibit the proliferation of distinct cell types [36] prompted us to investigate whether this was also the case for MSCs. Indeed, when quiescent MSCs were cultured in medium containing 20 ng/ml of HGF, cell proliferation induced by 10% FCS was nearly abolished (Fig. 3A). FACS analysis performed on stem cells treated, or not treated, with 20 ng/ml HGF for 12, 24, 36, and 48 hours, and stained with PI shows that HGF induces a significant increase in the G₀/G₁ ratio with respect to control untreated MSCs (Fig. 3B). In a parallel experiment, stem cells were doubly stained with PI and Annexin V to rule out the possibility that HGF treatment could induce cell death by apoptosis or

necrosis. Indeed, no increase in the apoptotic or in the necrotic fractions was detectable in MSCs after HGF treatment (data not shown), and, actually, HGF displayed a faint, but reproducible, antiapoptotic activity. We also investigated which signaling pathway was responsible for the HGF-dependent inhibition of FCS-driven cell proliferation, by using specific inhibitors. As shown in Figure 3C, the block in cell proliferation, which was evident within 9 hours, was completely reverted when MSCs were pretreated with the p38 inhibitor SB203580, whereas no effects were observed using PD98059 and Wortmannin, inhibitors of ERK 1/2 MAPK and PI3K, respectively. HGF induced the expression of p21^{WAF1} and p27^{IP1}, both of which are recognized as universal cell cycle progression inhibitors. Consistently, the HGF-driven accumulation of the hypophosphorylated

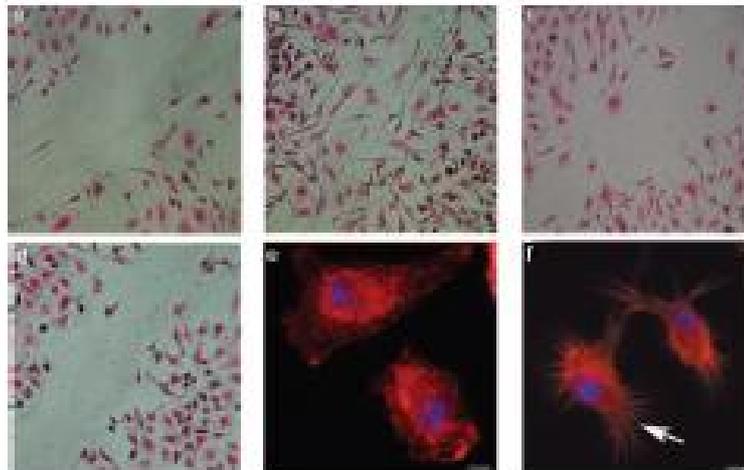


Figure 4. Hepatocyte growth factor (HGF) induces a motogenic response in mouse mesenchymal stem cells (MSCs). A confluent monolayer of MSCs grown in 5% fetal calf serum (FCS) and made quiescent by a 12-hour 2% FCS treatment was 'wounded' with a pipette tip and incubated for 24 hours in the absence (A) or presence of 20 ng/ml HGF (B) or pretreated with PI3K inhibitor Wortmannin (C) or tyrosine kinase inhibitor K252a (D) and then exposed to 20 ng/ml HGF. At the end of the treatment, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde and stained with hematoxylin and eosin. MSCs were also plated on coverslip, and when they reached 80% confluency, they were starved in low serum for 12 hours, untreated (E) or treated with HGF 20 ng/ml (F) for 24 hours, fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and stained for polymerized actin with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated Phalloidin. Arrow indicates microspikes protruding from cell surface. Bar = 7.5 μ m.

forms of Rh, typical of quiescent cells [37], was detected. Finally, HGF treatment induced the expression of bcl-2 and bcl-X_L proteins, which is consistent with the antiapoptotic activity displayed by HGF on MSCs (Fig. 3D).

HGF Activates MSC Migration

HGF is identical to scatter factor, a molecule that was independently identified for its ability to induce motility in epithelial cells [38]. The chemoattractant ability of HGF on human MSCs was recently demonstrated [24]. A conventional scatter assay, in which cell colonies are dispersed, could not be performed, because MSCs are already basally spindle-shaped. A wound healing assay, which is generally considered a simple and reliable test for evaluation of cell motility, was thus carried out. Confluent cell monolayers were cultured in low FCS for 12 hours, wounded, and finally cultured in 2% FCS for 24 hours in the absence or presence of HGF. In the absence of HGF, MSCs displayed barely detectable healing after 24 hours, which is indicative of very low basal motility (Fig. 4A). Cells responded to HGF treatment by filling the wound within 24 hours (Fig. 4B), in a dose-response way (not shown), and this effect was completely abolished by adding 30 nM kinase inhibitor K252a or 100 nM Wortmannin 1 hour before HGF stimulation (Figs. 4C, 4D). This evidence suggested that PI3K/Akt pathway is involved in the scattering effect of HGF. At the molecular level, HGF-dependent migration was accompanied by cytoskeleton remodeling. Indeed, MSC treated with 20 ng/ml HGF for 24 hours, fixed, permeabilized, and decorated with Rhodamine-labeled Phalloidine displayed typical F-actin-rich microspikes (Figs. 4D, 4E), which are peculiar for migrating cells [39]. HGF was also tested in a directional transwell migration assay. In the

absence of ligand, MSCs showed a limited ability to cross the filter, whereas, in the presence of HGF (20 ng/ml) in the lower compartment, the number of cells crossing the filter was significantly increased (Fig. 5). This effect was completely inhibited by concomitant incubation with Wortmannin or the tyrosine kinase inhibitor K252a at concentrations mentioned above.

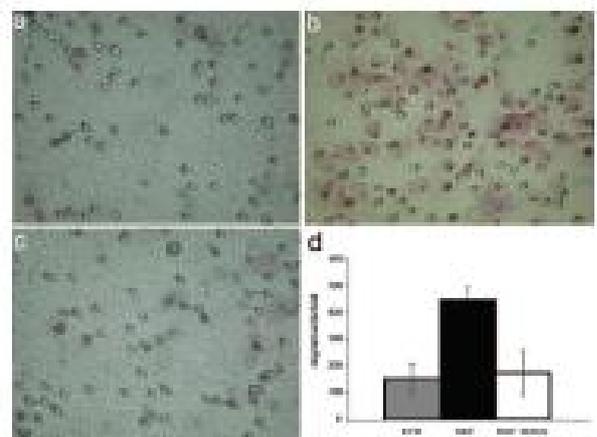


Figure 5. Hepatocyte growth factor (HGF) acts as chemoattractant for mouse mesenchymal stem cells. Cells were untreated (A) or treated with 20 ng/ml HGF (B) or pretreated with tyrosine kinase inhibitor K252a before adding HGF (C) in a transwell directional migration assay. At the end of incubation, the cells at the upper side of the filter were mechanically removed. Cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed for 30 minutes in 1% glutaraldehyde and stained with hematoxylin and eosin. Five to ten random fields were counted for each filter (D).

HGF Prompts MSC Differentiation Toward Cardiac Lineage

HGF is a potent differentiating factor for human embryonic stem cells and rat bone marrow mesenchymal cells [20, 22]. To test this potential effect on mouse MSCs, cells were cultured for several days in the presence of HGF (20 ng/ml) and the outcoming phenotype was thus examined by determining the expression of some muscle-specific genes using RT-PCR. RNA was isolated from cells treated for different periods of time.

After day 2 of treatment, MSCs lost stem cell markers, like nucleostemin, and started to express mRNAs for the muscle-specific transcription factors MEF2C (myocyte enhancer factor 2C) and TEF1 (transcriptional enhancer factor 1) (Fig. 6). Furthermore, at the same time, they expressed transcripts for

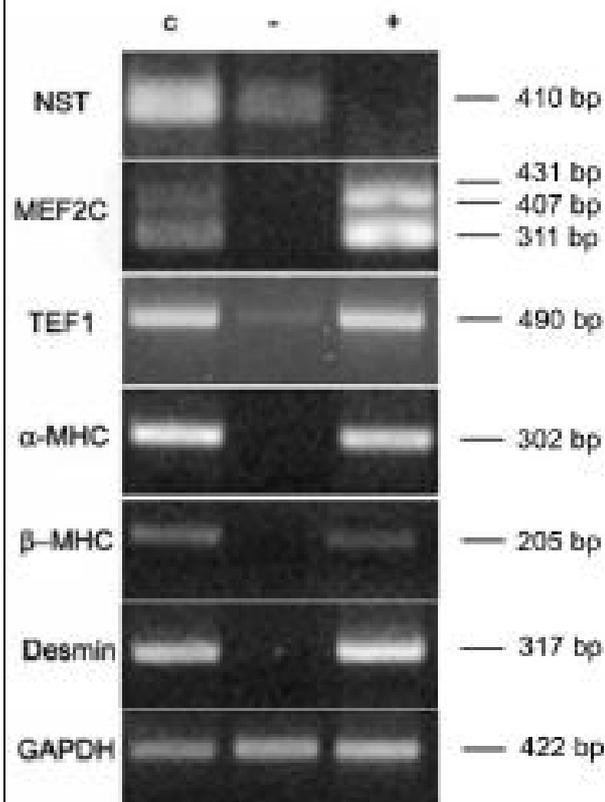


Figure 6. Hepatocyte growth factor (HGF) induces the expression of myocyte-specific transcription factors and structural genes in mesenchymal stem cells. Cells were untreated (-) or treated with 20 ng/ml of HGF (+) for 48 hours. Total RNA was isolated and after DNase I treatment, reverse transcription-polymerase chain reaction was performed with primers specific for nucleostemin (NST), myocyte enhancer factor 2C (MEF2C), transcriptional enhancer factor 1 (TEF1), α -myosin heavy chain (α -MHC), β -myosin heavy chain (β -MHC), desmin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as described in Materials and Methods. HL-1 cells were used as positive controls. All experiments are representative of three replicates.

desmin, α -MHC (α -myosin heavy chain), and β -MHC, while they did not express other muscular markers, such as MLC 2a (myosin light chain 2a), MLC 2v (myosin light chain 2 ventricular), or ANP (atrial natriuretic peptide) (data not shown). Interestingly, α -MHC transcript was detected in a higher amount than β -MHC transcript. HL-1 cardiac cell line [40] was used as a positive control for myogenic differentiation of MSCs. Consistently with the onset of a differentiative program, immunofluorescence analysis (Fig. 7) showed that MSCs were no longer reactive for the stem cell markers c-kit (panels A, B) and CD105 (panels C, D) and they showed a positive staining for GATA-4 (panels M, N), a crucial transcription factor operating during the early phases of cardiac development, the intermediate filament protein nestin (panels E, F), and α -MHC, a component of the cardiac contractile system (panels G, H).

DISCUSSION

In this study, we investigated the effects of HGF on murine MSCs and found that HGF can induce early biochemical effects, such as receptor tyrosine phosphorylation and upregulation, activation of the major signaling pathways, as well as delayed biological responses, namely block of proliferation, cytoskeletal rearrangement, cell migration, and expression of cardiac-specific markers with concomitant loss of stem cell markers. We also show in some experiments that these effects were dependent on HGF stimulation, because they could be inhibited by the natural alkaloid K252a, which was shown to strongly impair the oncogenic properties of Met [30] or in MSCs infected with a lentiviral vector [34] carrying an siRNA specific for Met [35]. Finally, we present evidence that cell migration is PI3K-dependent, whereas inhibition of cell proliferation is p38-dependent.

Adult stem cells are attracting increasing attention because of their potential use in both developmental biology and medical applications, such as tissue and organ repair [1, 2]. It is now widely accepted that they are present in nearly all tissues, where they are probably already committed to a particular lineage, dictated by the microenvironment. In this context, bone marrow is the source of adult stem cells with greater differentiation potential [1], because it can give origin not only to hematopoietic and endothelial stem cells, but also to precursors of other tissues of mesenchymal origin, such as adipose tissue, bone, and cartilage [2], as well as to cells that can transdifferentiate in epithelial components, such as hepatocytes [21–23]. The fate of these stem cells is determined by microenvironment and growth/differentiation/mobilization factors, which can recruit them in different organs and situations, such as after injury.

HGF is a pleiotropic cytokine displaying mitogenic, motogenic, morphogenetic, and antiapoptotic activities in a cell type-specific manner [3], the main target cells being epithelial

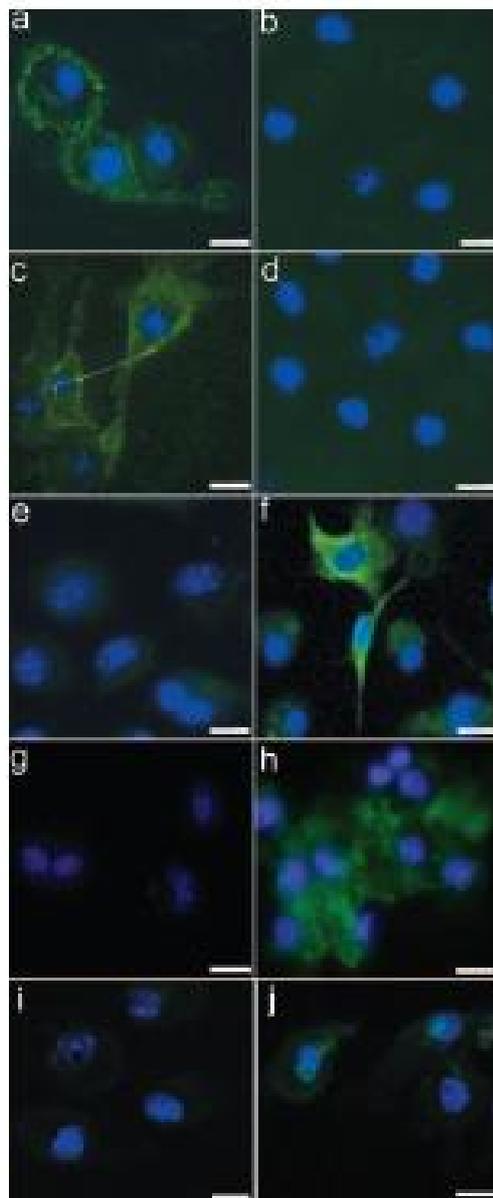


Figure 7. Hepatocyte growth factor (HGF) induces differentiation of mesenchymal stem cells. Cells were plated on coverslip, and when they reached 60% confluence, they were untreated (A, C, E, G, I) or treated with 20 ng/ml of HGF (B, D, F, H, J) for 96 hours. They were then fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and stained with antibodies for c-kit (A, B), CD105 (TGF β III) (C, D), nestin (E, F), MHC (myosin heavy chain) (G, H), and GATA-4 (I, J), followed by the appropriate FITC (fluorescein isothiocyanate)-labeled secondary antibodies. DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) counterstaining was used to visualize nuclei. Bar = 12.5 μ m. In control experiments, in which the primary antibody was omitted, no fluorescent signal was detected. All experiments are representative of three independent replicates.

and endothelial cells, which predominantly express the cognate receptor. Indeed, HGF promotes hepatocytes, keratinocytes, re-

nal tubule cell and endothelial cell proliferation, dissociation of epithelial cell colonies, cell motility, and invasion through extracellular matrix. The coordinated orchestration of these processes plays a major role in organogenesis, such as tubulogenesis and branching morphogenesis, and in tissue and organ homeostasis in adults, such as liver and kidney regeneration [14]. *In vivo*, HGF and Met receptor have been reported to play an important role in the early cardiac development [41], when they are transiently expressed. Recently, Duan and colleagues [25] showed that HGF is able to enhance MSC engraftment in injured heart. In the adult, upon heart injury, HGF plasma levels are rapidly and markedly elevated with cardioprotective significance. Indeed, exogenous HGF has a potent cardioprotective role in experimentally induced myocardial infarction, preventing cardiomyocyte apoptosis, inducing significant angiogenesis, and improving impaired heart functions [7, 42, 43]. These findings show that HGF can induce biological responses in cells other than epithelial.

More recently, a few studies have shown that HGF can induce biological responses also in stem cells [20, 22, 24].

Our results show that mouse MSCs coexpress functional forms of Met receptor as well as of its ligand. Yet, the low levels of HGF found in the culture medium of control samples are not sufficient to activate its own receptor on MSCs; the receptor, however, maintains the biochemical and biological responsiveness to exogenously added ligand. In fact, both the receptor and the ligand can be upregulated upon long-term HGF treatment. Indeed, it was already reported that Met receptor behaves as a delayed early gene, the expression of which in epithelial cells could be upregulated by treatment with serum, phorbol esters, and HGF itself [44]. After full ligand-dependent tyrosine phosphorylation, the Met receptor expressed on MSCs was able within a few minutes to activate the *ras*-ERK1/2 and p38 MAPKs as well as the PI3K/Akt pathways, which are the main transduction pathways activated in other HGF biologically responsive cells [3, 4, 19]. Depending on cell type, these pathways were reported to variably contribute to the different biological responses elicited by HGF. The *ras*-ERK1/2 MAPK pathway was shown to be mostly associated with HGF mitogenic and morphogenic effect, whereas the PI3K/Akt pathway seems to be mainly related to mitogenic and antiapoptotic effects [4, 19, 45].

In our system, HGF activated cell migration in a PI3K-dependent way, because the effect of wound healing could be blocked by the PI3K pharmacological inhibitor Wortmannin.

Surprisingly, HGF inhibited cell proliferation by blocking cells in the G₀-G₁ phase. This response was accompanied by the induction of p21^{WAF1} and p27^{INK1} proteins, which are known as universal cell cycle progression inhibitors, acting through their binding to cyclins-CDK complexes and PCNA [46, 47] and by

the accumulation of the hypophosphorylated forms of pRb. Although HGF is generally recognized as a proliferation factor, it was already reported to inhibit the proliferation of certain cell types [36] as well as human MSCs [24]. No significant apoptosis was detected in the conditions used, and actually the low basal level of apoptosis was even decreased upon treatment with HGF. Consistent with this finding, bcl-2 and bcl-X_L proteins were induced by HGF. The arrest of cell proliferation was dependent on p38 MAPK, because it was abrogated by treatment with its specific inhibitor, SB203580. P38 has been shown to exert a similar role also in FGF-dependent chondrocyte proliferation [45]. Moreover, p38 MAPK pathway has been already implicated in chondrocyte and skeletal muscle differentiation [48–50].

In our model, upon 48 hours of HGF treatment, MSCs started to express mRNAs for MEF2C and TEFL, two transcription factors, and desmin, which are typically detectable during the first stages of muscle differentiation. Moreover, MSCs expressed transcripts for contractile proteins, such as α -MHC and β -MHC. In this transition toward myogenic differentiation, MSCs lost the expression of markers typically associated with the stem cell phenotype, such as CD105 (TGFBR3), c-kit, and osteosteinin; remarkably, after 7 days of exposure to HGF, MSCs expressed nestin, a poorly organized form of MHC, and the transcription factor GATA-4, which is crucially involved in early phases of cardiac development. By contrast, these cells failed to express other muscle markers, such as MLCs or ANP, suggesting that further differentiative steps probably require additional factors. Other treatments were also reported to drive bone marrow cells toward the cardiomyocyte phenotype: for

example, 5-azacytidine was able to induce morphologic, biochemical, and functional cardiomyocytes [51, 52], although the molecular events involved have yet to be identified. PDGF was reported to enhance the generation of bone marrow cell-derived cardiomyocytes in rat hearts [53], but these cells did not integrate with resident myocytes, again suggesting that additional factors are required for their full functionality.

In conclusion, our findings suggest that HGF could be one of the factors involved in the mobilization and commitment of MSCs toward a cardiomyocyte phenotype even if more detailed experiments will be necessary to clarify whether these processes occur *in vivo* as well.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Isabella Scopanti (University of Rome 'La Sapienza'), Andrea Graziani (Università del Piemonte Orientale 'A. Avogadro') for helpful discussion throughout these studies and for critically reading the manuscript. The authors thank also Riccardo Tauri (University of Torino) for kindly providing the lentivirus-siRNA for Met and Syntech srl, Roma, Italy for its technical assistance. This study was supported by grants from Ministero Istruzione, Università e Ricerca (FIRB 2001 and PRIN 2003), 'Compagnia di S. Paolo', Torino, University of Piemonte Orientale 'A. Avogadro', Novara, and Regione Piemonte (Ricerca Scientifica Applicata 2004-CIPE), Italy.

DISCLOSURES

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Herrera EL, Choi L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483–3489.
- 2 Bianco F, Rimondini M, Giarin S et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:189–192.
- 3 Truscillo L, Coniglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signaling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:289–300.
- 4 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E et al. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:515–525.
- 5 Santos OF, Barros EJ, Yang XM et al. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev Biol* 1994;163:525–529.
- 6 Yang Y, Spitzer K, Meyer D et al. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neurotrophin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 1995;131:215–226.
- 7 Bonafant F, Di Russo MF, Ziche M et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992;119:629–641.
- 8 Ebens A, Brown K, Leonardo ED et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 1996;17:1157–1172.
- 9 Black F, Reichmayer D, Isenmann S et al. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1999;398:768–771.
- 10 Mitra F, Casagrande P, Andronico E et al. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor *in vivo* reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1999;117:531–542.
- 11 Schmidt C, Black F, Goudeker S et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1993;373:699–702.
- 12 Uebachs Y, Mizawa O, Mori C et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1999;393:702–705.
- 13 Matsunaka K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: neurotrophic role and potential therapeutic for renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:1023–1030.
- 14 Michalopoulos GK, DeFranco MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60–66.
- 15 Danilovitch-Mingorova A, Zhar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 2002;109:853–867.
- 16 Bonizzi DP, Rubin JS, Falero DL et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251:802–804.

17. Naldini L, Weissman KM, Vigna E et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 1991;10:2867-2876.
18. Pennato C, Bardelli A, Zhan Z et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994;77:261-271.
19. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000;19:3382-3389.
20. Schindler M, Yanika O, Isakovitz-Elder I et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11307-11312.
21. Schwartz RE, Royce M, Keeble L et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302.
22. Oh SH, Miyazaki M, Koschi H et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:300-304.
23. Okamoto K, Saito T, Marui E et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signal in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;264:691-695.
24. Neuss S, Becker E, Welte M et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair and wound healing. *Stem Cells* 2004;22:405-414.
25. Duan HF, Wu CT, Wu DL et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther* 2003;8:467-474.
26. Friedenstein AJ, Goroskja JF, Kolosova NS. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1978;4:267-274.
27. Fan M, Crupaldi T, Gardino L et al. C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 1991;11:3934-3942.
28. Moraldo F, Maffei A, Morini M et al. Expression of functional tyrosine kinases on immortalized Kapov's sarcoma cells. *J Cell Physiol* 2000;184:246-254.
29. Condorelli G, Bortone U, De Angelis L et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10733-10738.
30. Morotti A, Milla S, Accornero P et al. K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 2002;21:4802-4803.
31. Guiso M, Galini F, Zambrini G et al. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for sarcomers and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7644-7648.
32. Medico E, Mongioli AM, Huff J et al. The tyrosine kinase receptors Ret and Sea control 'scattering' and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro. *Mol Biol Cell* 1996;7:495-504.
33. Muller M, Morotti A, Pennato C. Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol Cell Biol* 2002;22:1069-1072.
34. Traill R, Accornero P, Polenzani A et al. RNAi technology and lentiviral delivery as a powerful tool to suppress Tpo-Met-mediated tumorigenesis. *Cancer Gene Ther* 2003;12:436-451.
35. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3:347-361.
36. Shiota G, Rhoads DB, Wang TC et al. Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:373-377.
37. Nicosia AB 3rd, Chen X, Swain M et al. Effects of p21/Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: p21 is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 1998;18:529-543.
38. Stoker M, Ghossein E, Ferryman M et al. Scatter factor is a fibroblast-derived mediator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987;327:239-242.
39. Talbot TE, Derksen PW, de Boer OJ et al. Hepatocyte growth factor triggers signaling cascades mediating vascular smooth muscle cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;18:80-86.
40. Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;17:2879-2884.
41. Rappolee DA, Leyer A, Patel Y. Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. *Circ Res* 1996;78:1020-1026.
42. Aoki M, Morishita R, Taniyama Y et al. Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc. *Gene Ther* 2000;7:417-427.
43. Iyama Y, Woo YI, Bish LT et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor attenuates postinfarction heart failure. *Circulation* 2003;9:230-236.
44. Boccardo C, Gardino G, Gambaretta G et al. Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem* 1994;269:12846-12851.
45. Glorioso S, Maffei A, Williams TA et al. Different point mutations in the met oncogene stick distinct biological properties. *FASEB J* 2000;14:389-400.
46. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1995;13:1501-1512.
47. Cooper O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2002;13:65-70.
48. Raouf A, Laplante E, Marudhuni A et al. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem* 2004;279:1747-1756.
49. Stanton LA, Sabari S, Sampath AV et al. p38 MAP kinase signaling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem J* 2004;371:23-32.
50. Basu-Raja B, Manco-Carretero P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of myoDin-6. *Mol Biol Cell* 2004;15:2013-2020.
51. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
52. Grassi G, Maccauro P, Meyer R et al. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U17. *Carcinogenesis* 2000;24:1625-1633.
53. Kayvanfar M, Tang L, Zagroda I et al. Placental-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res* 2004;94:E39-E45.

Sistema cardiomiociti

Le patologie ischemiche cardiache sono caratterizzate da una progressiva perdita di cellule cardiache, la quale inizialmente viene compensata da ipertrofia, che talvolta può evolvere in cardiomiopatia dilatativa e causare arresto cardiaco.

Diversi studi hanno dimostrato che la morte dei cardiomiociti è causata sia da eventi apoptotici che da eventi di necrosi. In particolare trattamenti chemioterapici antitumorali con antracicline provocano la morte per apoptosi dei cardiomiociti. Alcuni fattori di crescita sono in grado di proteggere da apoptosi i queste cellule sia in vivo che in vitro e perciò potrebbero essere utilizzati come strumenti terapeutici in questo tipo di patologie. Molte evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo importante di HGF e del suo recettore Met nel cuore: sono infatti fondamentali nell'organogenesi cardiaca, e le espressioni sia di HGF che di Met sono aumentate nel cuore in seguito a danni ischemici. Inoltre HGF si è rivelato un fattore cardioprotettivo in modelli animali sottoposti a ischemia e riperfusione. Tuttavia la molecola di HGF nella forma biologicamente attiva è altamente instabile ed i costi di produzione sono assai elevati, questo costituisce un limite nel suo possibile impiego. Considerato però, che tutte le risposte biologiche indotte da HGF sono mediate dal suo recettore, ci siamo proposti di valutare l'impiego di anticorpi monoclonali, precedentemente dimostrati essere agonisti del recettore Met, come fattori anti-apoptotici per i cardiomiociti, in sostituzione di HGF. Queste molecole presentano caratteristiche di stabilità nel tempo, facilità e bassi costi di produzione, inoltre con le attuali conoscenze e tecnologie di biologia molecolare possono essere facilmente riformattati in base alle esigenze applicative.

“Effetti biologici indotti da anticorpi monoclonali agonisti del recettore Met in cardiomiociti: sopravvivenza, motilità, proliferazione”

Gli anticorpi agonisti di Met contrastano l'azione apoptotica della doxorubicina e della deprivazione di siero in cardiomiociti H9c2

Trattando cardiomioblasti di ratto H9c2 con doxorubicina per tempi brevi si induce il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno e l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi a causa dell'alterazione dello stato redox della catena respiratoria mitocondriale. Questa condizione mima in vitro il danno generato da episodi di ischemia/riperfusion e infarto acuto del miocardio in vivo.

Nel nostro lavoro sono stati adottati protocolli sperimentali tesi a mimare queste condizioni patologiche al fine di valutare le proprietà cardioprotettive di due anticorpi agonisti di Met DO-24 e NO-23.

Trattando cellule H9c2 con 10 μ M doxorubicina per un'ora e successivamente ripristinando le normali condizioni di coltura in terreno fresco contenente 10% siero fetale addizionato di HGF (50 ng/ml) oppure MAbs agonisti o di controllo (20 nM), si è osservato che l'anticorpo DO-24 è in grado di ridurre l'azione del farmaco del 18 % circa, aumentando la sopravvivenza cellulare di circa il 50% rispetto ad HGF stesso. L'anticorpo NO-23 invece risulta meno efficiente riducendo di poco l'azione del chemioterapico cardiotossico.

Indicazioni comparabili sono state ottenute negli esperimenti di induzione di apoptosi mediante deprivazione di siero. Anche in questo caso l'azione anti-apoptotica di DO-24 è decisamente più forte rispetto a NO-23 (67% vs 44%), e di poco superiore anche ad HGF (60%). (Fig. 1a,b,c; Tab.A).

Analisi ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare su cellule H9c2 deprivate di siero per 24 ore, e trattate con HGF o i MAbs agonisti, ottenuta in citofluorimetria a flusso previa marcatura delle cellule con propidio ioduro, ha dimostrato che sia DO-24 che NO-23

riducono la percentuale di cellule apoptotiche. E' stato inoltre osservato che i campioni trattati con NO-23, presentavano un accumulo di cellule nella fase G0/G1, analogamente ai campioni trattati con HGF. Mentre le cellule trattate con DO-24 risultavano distribuite nel ciclo in modo simile al controllo (cellule non trattate). (Fig. 2)

Saggi attivazione caspasi 9

Poiché caspasi 9 è un'importante molecola effettrice della via intrinseca dell'apoptosi, abbiamo valutato la sua cinetica di attivazione in cellule H9c2 private di siero. Successivamente è stata studiata l'azione degli anticorpi agonisti di Met sulla sua attivazione. Saggi colorimetrici dell'attivazione della caspasi 9 hanno dimostrato che la massima attivazione è riscontrabile 6 ore dopo lo stimolo di apoptosi dato dalla mancanza di siero. La presenza nel medium di HGF o MAb agonisti, riduce l'attivazione della caspasi 9. In particolare DO-24 inibisce l'attivazione di caspasi 9 a livelli simili a quelli rilevati trattando con HGF. Le percentuali di inibizione concordano con i dati ottenuti nei saggi di sopravvivenza cellulare MTT, dove l'anticorpo DO-24 ha dimostrato un'efficienza di inibizione del processo apoptotico pari ad HGF, riconfermando i dati biochimici finora ottenuti. (Fig. 3)

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 l'anticorpo DO-24 allo stesso livello, e, ad 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. (Fig.4)

I saggi di attivazione di caspasi 9 hanno dimostrato che gli anticorpi agonisti agiscono sull'attivazione dell'enzima, perciò abbiamo valutato il coinvolgimento di Akt, ERK 1/2, BAD, Bcl-2, nell'inibizione di caspasi 9. A tal fine circa 30 µg di estratto totale di cellule H9c2 incubate per 6 ore in assenza di siero e trattate con HGF, Mabs agonisti o di controllo sono stati analizzati in Western blot diretto mediante immunodecorazione con anticorpi diretti contro le forme fosforilate di Akt, ERK1/2 e BAD, anticorpi proteina specifici per valutare il livello di espressione di Bcl2 (dati in preparazione).

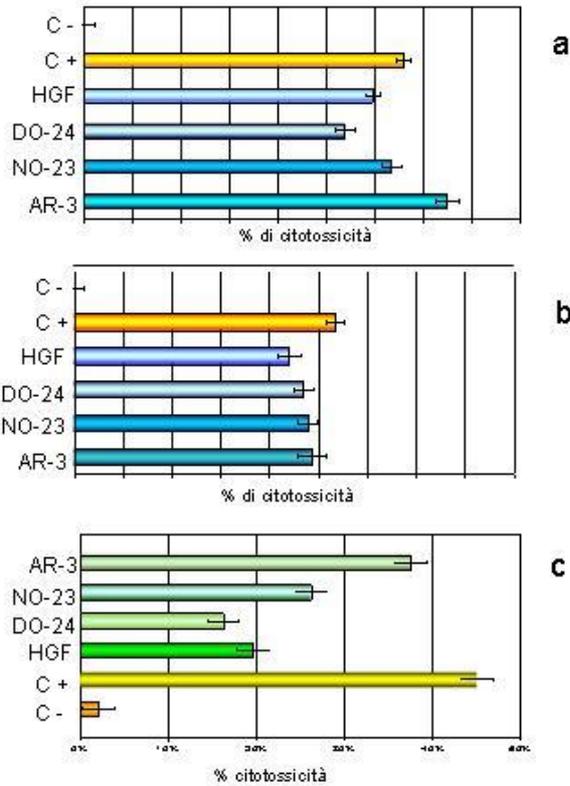
Gli anticorpi agonisti di Met non stimolano risposte di tipo proliferativo in cardiomiociti di ratto

L'analisi della cinetica di crescita di cellule H9c2 stimolate con gli anticorpi agonisti ha rivelato che sia DO-24 che NO-23 non agiscono come fattori di induzione di proliferazione cellulare. Infatti monitorando la crescita cellulare a tempi di 6, 48 e 96 ore non si sono osservate differenze significative tra le cellule trattate con HGF, DO-24 e NO-23 rispetto al controllo.(Fig.5).

L'anticorpo DO-24 attiva una risposta motoria in cellule H9c2

Per valutare la capacità degli anticorpi DO-24 e NO-23 di stimolare una risposta motoria in cardiomiociti di ratto, è stata praticata una ferita su monostrato di cellule H9c2 quiescenti allo stato di sub-confluenza, prima di incubare le cellule con HGF (50 ng/ml), DO-24, NO-23 (20 nM) in terreno con 2% siero. Dopo 48 ore di incubazione si è osservata che solo le cellule stimolate con l'anticorpo DO-24 presentavano completa rimarginazione della ferita, così come quelle dei campioni di controllo trattati con HGF. (Fig. 6)

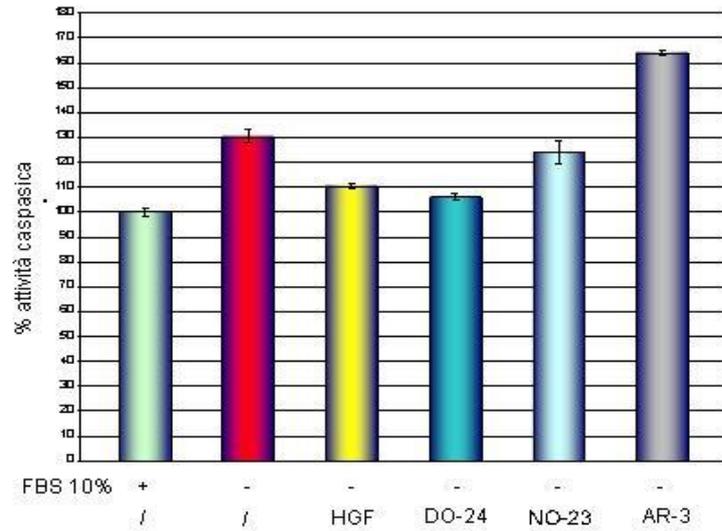
Fig.1a,b,c Anticorpi agonisti anti-Met inibiscono l'apoptosi indotta da doxorubicina e deprivazione di siero in cardiomiociti H9c2



Tab. a: percentuali di protezione da apoptosi indotta da doxorubicina (A e B) e deprivazione di siero (C)

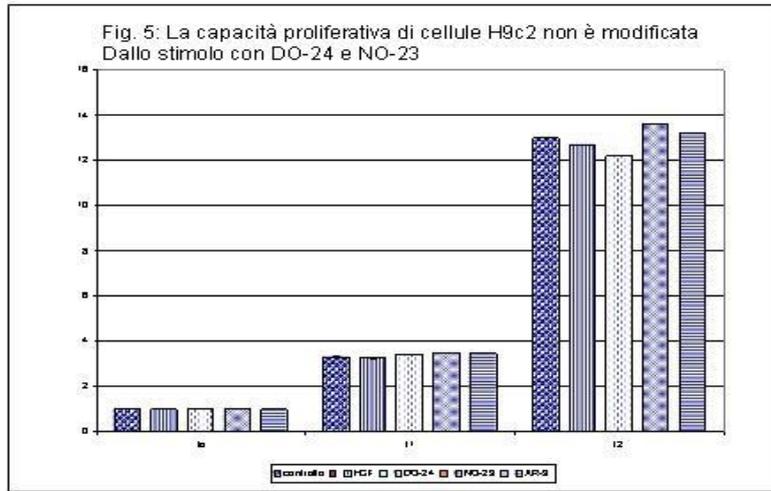
	HGF	DO-24	NO-23	AR-3
A	26	28	19	ns
B	9,6	18,4	3,8	ns
C	60,5	67	44	ns

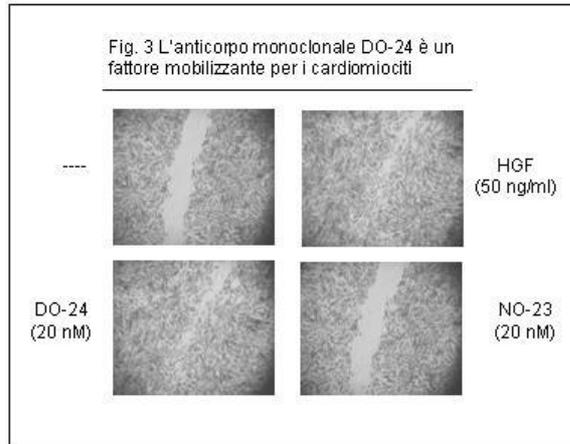
Fig. 3 Gli anticorpi agonisti DO-24 e NO-23 riducono l'attivazione di caspasi 9 mediata da deprivazione di siero per 24 ore



Tab.C: percentuale di riduzione dell'attività di caspasi 9

HGF	66
DO-24	80
NO-23	21
AR-3	ns





Conclusioni

Attualmente nell'ambito della ricerca cardiovascolare sempre più interesse è rivolto al ruolo svolto da fattori di crescita nei processi di rigenerazione tissutale del miocardio in seguito a eventi ischemici e di infarto acuto del miocardio (Morishita et al., 1998). Studi sia in vitro che in vivo hanno dimostrato come fattori quali IGF-1, HGF siano coinvolti nella mobilitazione e differenziazione di

cellule staminali residenti nel cuore (Linke et al., 2005), e svolgano un ruolo anti-apoptotico e cardioprotettivo in modelli sperimentali in vitro e in vivo (Yamamura et al., 2001; Nakamura et al., 2000; Kitta et al., 2001; Duan et al., 2003). Recentemente è stato documentato che su cellule staminali mesenchimali di topo sia Met che HGF sono espressi a bassi livelli, che la loro espressione è aumentata dalla stimolazione con HGF esogeno, e che esso agisce come fattore mitogenico. Questo suggerisce come le aumentate concentrazioni sistemiche di HGF in seguito a danno cardiaco, possano agire da fattori chemotattici per cellule staminali mesenchimali verso il cuore. Inoltre è stato riportato che HGF sia un fattore importante nel transdifferenziamento di queste cellule verso il fenotipo cardiomiogenico (Forte et al., 2006). Tutto questo suggerisce una possibile applicazione di HGF in una terapia cosiddetta molecolare.

La molecola di HGF è espressa da cellule mesenchimali sotto forma di precursore monocatenario inattivo (pro-HGF), la sua maturazione è mediata dall'azione di specifiche convertasi che generano la forma biologicamente attiva costituita da due sub-unità. Essa a differenza del precursore è instabile; inoltre è noto come la produzione di HGF ricombinante puro è un processo dai tempi e costi elevati. Per questo è emersa l'esigenza di valutare la possibilità di utilizzare molecole che presentassero vantaggi sia di tipo economico che di stabilità come gli anticorpi monoclonali agonisti di Met in sostituzione della citochina per future applicazioni terapeutiche.

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, e della deprivazione di siero. L'anticorpo DO-24 si è dimostrato un fattore anti-apoptotico pari, se non leggermente migliore dello stesso HGF. Inoltre DO-24, a differenza di NO-23, ha dimostrato di stimolare, non solo risposte di sopravvivenza, ma anche risposte di tipo motorio. DO-24 era stato già ampiamente studiato per le sue attività biologiche (Prat et al., 1998), ed aveva dimostrato di possedere anche capacità mitogeniche. Questo non si è verificato negli esperimenti condotti sui cardiomioblasti di ratto, dove peraltro neppure HGF è stato in grado di indurre proliferazione. È noto peraltro che il tipo di risposta biologica dipende, oltre che dallo stimolo (ligando diverso), anche dal

tipo di cellula e sicuramente cellule della linea cardiomiogenica non appartengono all'istotipo più pronò alla proliferazione.

Gli studi biochimici hanno confermato che i due anticorpi monoclonali DO-24 e NO-23 sono ligandi agonisti in cardiomiociti. Infatti, entrambi sono in grado di attivare Met, e vie di traduzione del segnale quali quelle di MAPK ERK1/2 e di Akt. Inoltre i due anticorpi interferiscono con l'attivazione della caspasi 9, indotta da deprivazione di siero. Anche in questi esperimenti DO-24 si dimostra migliore rispetto a NO-23.

Nel loro insieme questi dati ci permettono di suggerire il possibile impiego di questi anticorpi 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 ingegnerizzati per applicazioni più mirate (ad esempio: forma monovalente inibitoria verso forma bivalente attivatoria).

Materiali e metodi

Colture cellulari e reagenti

H9c2 è una linea cellulare stabile di cardiomioblasti isolati da embrioni di ratto; queste cellule sono coltivate in terreno DMEM con 10% FBS.

Vengono 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 usati come agonisti del recettore Met nei saggi biologici allestiti. Inoltre sono utilizzati i seguenti anticorpi commerciali per l'analisi in Western blot: anti-Met, (Santa Cruz), anti-PY (UBI), anti P-Akt, anti P-ERK1/2 e anticorpi proteina specifici (Cell Signaling).

Negli studi di cardioprotezione si utilizza come fattore apoptotico doxorubicina, gentilmente donataci dalla Farmacia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara. In tutti gli esperimenti effettuati viene utilizzato HGF ricombinante (Peprotech).

Immunoprecipitazione e analisi in Western blot

Per valutare la capacità degli anticorpi DO-24 e NO-23 di attivare il recettore Met in cardiomiociti di ratto, cellule H9c2, in condizioni di sub-confluenza, sono stimulate con HGF (50 ng/ml), DO-24, NO-23 o AR-3 (20nM) per 15 minuti 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. Gli estratti sono immunoprecipitati con anticorpi Met specifici e quindi separati in SDS-PAGE. L'immunodecorazione viene eseguita con gli anticorpi anti-fosfotirosina e anti-Met. L'analisi delle vie di trasduzione attivate è condotta su estratti preparati in 2% SDS bollente e analizzati in Western diretto con gli anticorpi anti MAPK ERK1/2-P e anti AKT-P e anti proteina specifici, anticorpi anti-Bcl2, caspasi 9, Bax e Bad.

Esperimenti di protezione da apoptosi indotta da doxorubicina e da privazione di siero

Sulla base dei dati ottenuti precedentemente trattando cellule H9c2 con doxorubicina, antraciclina utilizzata nella chemioterapia tumorale, in cui gli agonisti di Met si sono dimostrati fattori antiapoptotici per cardiomiociti, abbiamo voluto applicare altri protocolli sperimentali mimanti situazioni di ischemia/riperfusion e infarto acuto del miocardio in vivo, per valutare le possibili applicazioni di queste molecole. Sono stati allestiti esperimenti di induzione di apoptosi mediante trattamento con doxorubicina o privazione di siero, seminando cellule H9c2 (5×10^3 /campione) in piastra da 96 pozzetti, lasciandole crescere per 48 ore.

A questo punto le cellule sono state trattate applicando diversi protocolli sperimentali.

Protocollo A: cellule H9c2 sono incubate per 1 ora in presenza di terreno privo di siero e 10 μ M doxorubicina e successivamente, viene sostituito il terreno con terreno fresco DMEM 10% FBS, ed incubate per 16 ore in presenza o assenza di HGF (50 ng/ml), anticorpi monoclonali (DO-24 o NO-23) o di controllo (AR-3) (20 nM).

Protocollo B: le cellule sono state contemporaneamente trattate con doxorubicina, HGF e/o gli anticorpi monoclonali agonisti o di controllo. Seguono 16 ore di incubazione come descritto nel protocollo A.

Protocollo C: le cellule H9c2, sono state incubate per 24 ore in terreno privo di siero in presenza o meno di HGF (50 ng/ml), anticorpi monoclonali (DO-24 o NO-23) o di controllo (AR-3) (20 nM). In tutti gli esperimenti descritti l'azione cardioprotettrice dei fattori di interesse è stata valutata mediante saggi di vitalità cellulare, incubando le cellule con una soluzione di MTT (sali di tetrazolio) per 3 ore. Al termine dell'incubazione il terreno è stato eliminato e le cellule, presenti in piastra sono state solubilizzate in DMSO e analizzate allo spettrofotometro ($\lambda = 570$ nm). Il valore di assorbanza ottenuto è proporzionale alla quantità di cellule vitali presenti nella coltura. E' stata eseguita analisi statistica su dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti, applicando il test t-Student ($n=3$, $p<0.05$).

Analisi del ciclo cellulare

Per studiare più dettagliatamente le modalità di perdita di cardiomiociti in seguito a danno ossidativo è possibile analizzare il ciclo cellulare di cellule opportunamente trattate. A tal fine cellule H9c2, seminate in piastre a sei pozzetti, sono state incubate in terreno privo di siero, in presenza o assenza di HGF (50 ng/ml), anticorpi monoclonali anti-Met (DO-24 o NO-23) o di controllo (AR-3) (20 nM), per 24 ore in presenza di 5% CO₂ a 37°C. Allo scadere dell'incubazione le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina ed EDTA, e la sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata insieme ai surnatanti di coltura a 3000 rpm per 10 minuti alla temperatura di 4°C, così da sedimentare sia le cellule che i corpi apoptotici presenti nel mezzo colturale. Le cellule sono state quindi fissate con Etanolo al 76% freddo, aggiunto goccia a goccia, in modo tale da fissare le cellule senza danneggiarle, e si è incubato per 18 ore a - 20°C. Il

giorno seguente i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti a 4 °C per eliminare tutto l'etanolo, e risospesi in tampone (3.4 mM tri-sodio-citrato, 0.65 mM NaCl, 0.003% Nonidet P40, 25 µg/ml propidio ioduro, 10 µg/ml RNAsi) per la marcatura con propidio ioduro, sostanza intercalante il DNA, in grado di emettere fluorescenza se eccitata all'opportuna lunghezza d'onda. L'intensità di fluorescenza è proporzionale alla quantità di DNA presente in quel momento nel nucleo cellulare, in tal modo è possibile identificare cellule nelle diverse fasi del ciclo: fase G1, DNA pari a 2n; fase S, DNA compreso tra 2n e 4n; fase G2/M, DNA pari a 4n. Una caratteristica del solo processo di apoptosi, e non della necrosi, è la condensazione del nucleo e la frammentazione della cromatina. Le molecole di propidio ioduro in questo caso si intercalano a piccoli frammenti di DNA e la fluorescenza emessa risulta inferiore a quella emessa da cellule in fase G1. Per questa ragione le cellule apoptotiche vengono dette cellule in fase sub-G1 e sono facilmente distinguibili da cellule vitali in ciclo.

Saggio dell'attività di caspasi 9

Al fine di valutare la cinetica di attivazione di caspasi 9 in cellule H9c2, 10⁶ cellule sono state seminate in piastra da 96 pozzetti e incubate in terreno privo di siero per tempi di 3,6,9,16 e 24 ore. Stabilito il tempo di induzione di apoptosi per osservare il massimo di attivazione enzimatica, è stata valutata l'azione dei MAbs sulla caspasi 9 incubando cellule H9c2 per 6 ore in presenza di HGF (50 ng/ml), Mab DO-24, NO-23 o AR-3 (20 nM), in terreno privo di siero. L'attività enzimatica della caspasi 9 viene valutata mediante saggio colorimetrico (APOPCYTOTM Caspase-9 Colorimetric Assay kit, MBL) .

I dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti sono stati analizzati applicando il test t-Student (n=3, p<0.05)

Saggi di proliferazione cellulare

Per verificare la capacità degli anticorpi di interesse di indurre proliferazione in cardiomioblasti di ratto, 2.5 x 10³ cellule H9c2 sono state seminate in piastra da 96 e lasciate crescere per 6, 48 e 96 ore in presenza di HGF (50 ng/ml), MAbs agonisti o di controllo (20 nM). I fattori freschi sono stati aggiunti ogni 48 ore.

Allo scadere dei diversi tempi di crescita, le cellule sono state lavate con PBS, fissate con 11% glutaraldeide per 20 minuti, colorate con cristal violetto ed infine solubilizzate con Dimetil-solfossido (DMSO). La colorazione liberata è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 560 nm. Le assorbanze sono direttamente proporzionali al numero di cellule presenti in piastra. I dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti sono stati analizzati applicando il test t-Student (n=3, p<0.05)

Saggi di motilità cellulare (wound healing)

Per valutare la capacità degli anticorpi DO-24 e NO-23 di stimolare risposta motoria in cellule di cuore H9c2, vengono seminate $1,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto di piastra da 24 e lasciate crescere fino alla confluenza ottimale di circa l'80%. Su monostrato sub-confluente di H9c2 quiescenti viene quindi praticata un'incisione con puntale sterile, per eliminare le cellule staccatesi durante l'incisione la coltura viene lavata 2 volte con PBS. Si aggiunge quindi una soluzione di terreno al 2% siero, addizionato di 25 mM Hepes, pH 7,4 e HGF (50 ng/ml), Mabs agonisti o di controllo (20 nM) e si lascia incubare per 48 ore. Successivamente il terreno viene aspirato, le cellule lavate con PBS e fissate con glutaraldeide all'11% per 20 minuti. Infine si colorano con soluzione di cristal violetto e le immagini delle cellule vengono acquisite con macchina fotografica digitale.

HGF/Met nel Sarcoma di Kaposi

Il Sarcoma di Kaposi è la più frequente forma tumorale in pazienti affetti da AIDS, esso è caratterizzato dalla presenza di cellule fusate ("spindle cells") altamente proliferanti, infiltrazioni di cellule infiammatorie, processi

angiogenetici, edema ed invasività. Molteplici fattori patogenetici sono coinvolti nell'origine e sviluppo di questa patologia. In particolare alcuni fattori di crescita quali HGF e VEGF, ed i loro rispettivi recettori tirosina chinatici, Met e KDR, sembrano avere un ruolo importante nella progressione del sarcoma.

In letteratura è documentato che linee stabili isolate da lesioni di Kaposi, quali la linea KS-IMM esprimono un recettore Met funzionale che in seguito a



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

BBRC

Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1172–1179

www.elsevier.com/locate/ybbrc

Agonist Met antibodies define the signalling threshold required for a full mitogenic and invasive program of Kaposi's Sarcoma cells [☆]

Claudio Bardelli, Marilena Sala, Umberto Cavallazzi, Maria Prat ^{*}

Dipt. Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro" Via Solferino 17, 28100 Novara, Italy

Received 3 July 2005

Available online 18 July 2005

Abstract

We previously showed that the Kaposi Sarcoma line KS-IMM express a functional Met tyrosine kinase receptor, which, upon HGF stimulation, activates mitogenic, proliferative, and invasive responses. In this study, we investigated the signalling pathways activated by HGF, as well as by Met monoclonal antibodies (Mabs), acting as full or partial agonists. The full agonist Mab mimics HGF in all biological and biochemical aspects. It elicits the whole spectrum of responses, while the partial agonist Mab induces only wound healing. These differences correlated with a more prolonged and sustained tyrosine phosphorylation of the receptor and MAPK evoked by HGF and by the full agonist Mab, relative to the partial agonist Mab. Since Gab1, JNK and PI 3-kinase are activated with same intensity and kinetics by HGF and by the two agonist antibodies, it is concluded that level and duration of MAPK activation by Met receptor are crucial for the induction of a full HGF-dependent mitogenic and invasive program in KS cells.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Tyrosine-kinase receptor; *MET*; Kaposi Sarcoma; Signal transduction; Receptor agonist; Proliferation; Invasiveness; MAPK; PI3-kinase; Gab1

The hepatocyte growth factor (HGF) receptor encoded by the *MET* protooncogene mediates multiple biological responses, namely motility, proliferation, and morphogenesis in a cell-type and agonist-dependent fashion. These phenomena are essential in physiological processes, such as organ development and regeneration; however, when inappropriately activated, they may result in tumor development and metastasis [1,2].

[☆] **Abbreviations:** HGF, hepatocyte growth factor; KS, Kaposi's Sarcoma; KS-IMM, Kaposi's Sarcoma immortalized cell line; MAPK, mitogen-activated protein kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; PI, phosphatidylinositol; PIP₂, PI-4,5-bisphosphate; PIP, PI-3-phosphate; STAT, signal transducer and transcription; Gab 1, GRB2 adaptor binding; Mab, monoclonal antibody; PY, phosphotyrosine; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; BSA, bovine serum albumin.

^{*} Corresponding author. Fax: +39 0321 620 421.

E-mail address: mprat@med.unipmn.it (M. Prat).

While HGF is normally produced and secreted by cell of mesenchymal origin, its receptor is predominantly expressed in epithelial cells. The Met receptor is a transmembrane tyrosine kinase; its activity is dependent on the transphosphorylation of its kinase domain and of a multifunctional docking site [3], which cause the concomitant activation of multiple signal transduction pathways that account for the complex biological responses elicited by HGF [1,2,4]. Many efforts have been made to link specific signal transducers to a precise biological effect. There is now a general consensus that the ras-MAPK and the JNK pathways are mainly activated in proliferative responses, while PI 3-kinase is involved in mitogenic and anti-apoptotic effects [3,5].

HGF and its receptor Met are among the many factors involved in the pathogenesis of Kaposi's Sarcoma (KS), the most frequent neoplasia in patients with AIDS, that is characterized by the presence of prolifer-

ating spindle cells of endothelial origin and infiltrating inflammatory cells, by angiogenesis, edema, and invasiveness [6,7]. In fact: (i) KS cells express Met and in most cases also HGF [8–10]; (ii) an autocrine loop was shown to sustain the proliferation of KS cells [11]; (iii) HGF stimulation of an established KS cell line (KS-IMM cells) elicits the whole spectrum of biological effects typically induced by this ligand, i.e., cell migration, proliferation, and invasiveness ([10], see also beyond).

In this paper, we investigated the signalling pathways activated by HGF, as well as by Met monoclonal antibodies (Mabs), acting as full or partial receptor agonists, in the attempt to correlate the different biological effects mediated by the Met receptor in KS cells with the activation of specific transduction pathways.

Materials and methods

Reagents, antibodies, and cell culture. Recombinant HGF was produced in the baculovirus expression system [10]. Its specific activity was of 3–5 scatter unit/ng. DO-24 and DL-21 anti-Met Mabs were used for immunoprecipitation and Western blot, respectively [12]. DO-24 and DN-30 anti-Met Mabs were purified from ascitic fluid by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography on protein A-Sepharose 4B [12]. Mabs against phosphotyrosine (PY) and rabbit polyclonal antibodies against Gab1 were from UBI (Lake Placid, NY). Rabbit antibodies against the active and the inactive forms of ERK-1/2 MAPK, JNK and STAT were from New England BioLabs (Beverly, MA). KS-IMM cells, an already used Kaposi's Sarcoma immortalized cell line [10], were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ air.

Biological assays. For wound healing assay, 2.5×10^5 cells were grown in 24 well Costar plates and, when confluent, incubated in DMEM–0.2% FCS for 18 h and wounded with a plastic pipette as described [10]. After washing with PBS, they were incubated for 6–8 h in DMEM–0.2% FCS, with or without HGF or agonist Mabs, fixed with 11% glutaraldehyde, and stained with 0.1% crystal violet. The assay for matrix invasion was performed in blind-well Transwell chambers using a modification of the Matrigel method [10]. Briefly, 10^5 KS-IMM cells/200 μ l DMEM were seeded on the upper side of a porous polycarbonate membrane (pore size: 8 μ m), previously coated with Matrigel (1.2 mg/ml), and 500 μ l of medium containing or not HGF or the agonist Mabs was added to the lower compartment. After incubation for 48 h, cells and Matrigel at the upper side of the filter were mechanically removed and cells migrated to the lower side of the filter were fixed and stained with crystal violet.

For cell proliferation assay, 2.5×10^3 cells were plated in 96-well plates in DMEM–2% FCS with or without HGF or agonist Mabs, which were replenished every 2 days for 6 days. Cell number was estimated after staining with crystal violet by a colorimetric assay, which was read at 595 nm.

Cell stimulation, immunoprecipitation, and Western blot analysis. Confluent quiescent cells were stimulated for different periods of time at 37 °C in the absence or in the presence of HGF [10] or agonist Mabs at the indicated concentration. After washing with cold phosphate-buffered saline (PBS), cells were lysed in DIM buffer (50 mM Pipes pH 7.4, 300 mM saccharose, 100 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, and 100 μ M ZnCl₂), 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, and a cocktail of protease inhibitors. Clarified cell extracts were immunoprecipitated for 2 h with the different antibodies and Sepharose–protein A or Sepharose–protein G. Washed immunoprecipitates were eluted in

reducing Laemmli buffer at 95 °C, resolved on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), transferred onto nitrocellulose filters, which were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 45 °C, probed with antibodies diluted in TBS (Tris-buffered saline)–3% BSA, and reacted with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies followed by enhanced chemiluminescence reaction (ECL, Amersham).

PI 3-kinase assay. PI 3-kinase assays were performed as previously described [13]. Cell extracts, prepared as above, were precleared on Sepharose–protein G and immunoprecipitated with anti-PY Mabs and Sepharose–protein G. A mixture of phosphatidylinositols (PIs) was added to a final concentration of 0.2 mg/ml. Reactions were performed at 22 °C for 10 min in 0.5 mM ATP, 0.5 mM Na₃VO₄, 0.5 mM ZnCl₂, and 5 mM MgCl₂ final concentrations with 20 μ Ci [γ -³²P]ATP and terminated by adding 1 N HCl, extracted with CHCl₃/CH₃OH (1:1), and subjected to thin layer chromatography in CH₃CH₂CH₂OH/CH₃COOH/H₂O (65:4:31) and autoradiography. Standard PIs were run in parallel on the same plate as reference and visualized with I₂.

Results

Different transduction pathways are activated by HGF in KS-IMM cells

It has been previously reported that HGF induces Met receptor phosphorylation in KS-IMM cells [12]. We thus examined downstream signalling pathways known to be relevant to cell proliferation, motility, and invasiveness (see review [2,4]). As shown in Western blot analysis, HGF stimulation induced the phosphorylation of ERK-1/2 MAPK (Fig. 1A), JNK (Fig. 1B), and Gab1 (Fig. 1D), the major substrate of the kinase activity of Met receptor [1,2,5]. By contrast, STAT 3 was found to be constitutively activated and insensitive to further stimulation by HGF (Fig. 1C). Moreover, in HGF stimulated KS-IMM cells, also PI 3-kinase was activated, as shown in an in vitro lipid kinase assay performed on tyrosine phosphorylated immunoprecipitates (Fig. 1E).

We conclude that upon HGF stimulation, ERK-1/2 MAPK, JNK, and PI 3-kinase pathways are all activated in KS-IMM cells. Also Gab1, the main and more specific adaptor protein of the HGF/Met ligand–receptor pair, is phosphorylated in a ligand-dependent manner.

Different agonist Mabs dissect Met-mediated biological responses in KS-IMM cells

The anti-Met DO-24 and DN-30 Mabs were previously shown to behave, respectively, as full or partial receptor agonists on different responsive epithelial cells [12]. In particular, the latter could induce only mitogenic effects, but not proliferation, invasiveness or tubulogenesis. When tested on KS-IMM cells, the two Mabs induced wound healing with the same efficacy (Fig. 2A) in a dose-dependent manner (not shown). By contrast only the DO-24 Mab (30–100 nM), but not

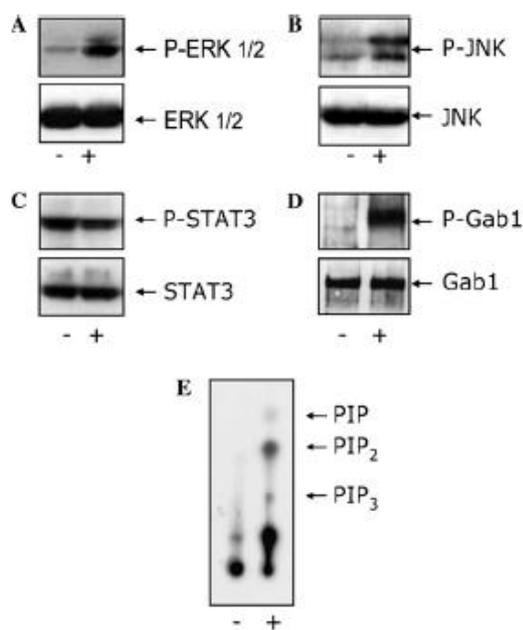


Fig. 1. Different transduction pathways are activated by HGF in KS-IMM cells. Quiescent cells were stimulated or not with HGF (50 ng/ml) for 12 min. (A,B,C) Total cell lysates were run in SDS-PAGE and probed in Western blot with different antibodies, specific for phosphorylated protein or the protein irrespective of phosphorylation state. (D) Lysates were immunoprecipitated with anti-Gab1 antibodies, run in SDS-PAGE and probed in Western blot with antibodies specific for PY and Gab1 antibodies. (E) Lysates were immunoprecipitated with anti-PY and assayed for PI 3-kinase activity, as described under Materials and methods. Standard PIs were run in parallel and visualized with I_2 on the basis of previously obtained chromatograms. This is a representative experiment out of the three (Western blot) or of the two (PI 3-kinase assay) independent experiments performed.

the DN-30 Mab (even when used at very high concentrations, up to 800 nM), could induce an invasive response, as analysed in the Transwell system, with filters coated with the artificially reconstituted basal membrane (Fig. 2B) or a proliferative response (Fig. 2C). The mitogenic activity of DO-24 was dose-dependent, with a bell-shaped curve, displaying maximal effect at 30 nM, which was comparable to that induced by 50 ng/ml HGF (not shown).

All together these data show that also on KS-IMM DO-24 Mab behaves as a full agonist of Met, mimicking all the biological effects induced by the natural ligand HGF, while DN-30 Mab is a partial agonist, able to trigger only the mitogenic response.

Monoclonal antibodies to HGF receptor stimulate phosphorylation of Met protein in KS-IMM cells and the effect is additive to the natural ligand

Next, we investigated the signalling mechanisms that could explain the differences in the biological responses induced by the two Mabs. Since they are all strictly

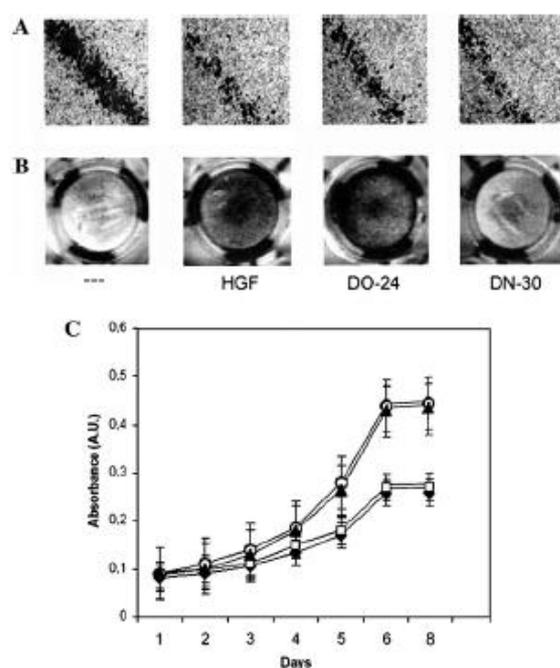


Fig. 2. Different agonist Mabs dissect Met-mediated biological responses in KS-IMM cells. (A) Wound healing assay. Monolayers of confluent, quiescent cells were wounded and then treated with HGF (25 ng/ml), DO-24 or DN-30 Mabs (30 nM) for 6 h, fixed, and stained with crystal violet. Micrographs show representative cell fields. (B) Invasive assay. Cells were incubated in the upper compartment of Transwells on Matrigel coated filters and the stimuli (HGF: 50 ng/ml; DO-24 and DN-30 Mab: 50 nM) were added in the lower compartment. After 48 h incubation, cells that had crossed the Matrigel and attached to the lower side of the filter were fixed and stained with crystal violet. Micrographs show representative cell fields. (C) The mitogenic activity of the three stimulators [HGF: ○, 50 ng/ml; DO-24: ▲, 30 nM; DN-30: ▼, 100 nM; unstimulated: □] was evaluated after stimulating cells every second days for 6 days. Cells were then fixed, stained with crystal violet, and solubilized. Colorimetric values were evaluated on the basis of a calibration curve. These are representative experiments out of the three independent experiments performed.

dependent on receptor phosphorylation [1,2,4], we concentrated on quantitative aspects. Preliminary experiments performed to find the optimal Mab concentration for Met biochemical activation, showed a bell-shaped curve, typical of bivalent stimulators, for both Mabs (PY; Fig. 3A). The optimal Mab concentrations were 15–45 and 135 nM, for DO-24 and DN-30, respectively. This difference closely parallels the slight difference in the Mab affinity for Met receptor (K_d 0.69 nM versus 2.64 nM) [12]. When suboptimal concentrations of HGF (12 ng/ml) and either Mab (DO-24: 5 nM; DN-30: 45 nM) were used in combination to stimulate KS-IMM, an additive/synergistic effect was observed (Fig. 3B). We conclude that the two Mabs mimic the natural ligand in their ability to activate the Met receptor expressed on KS-IMM cells.

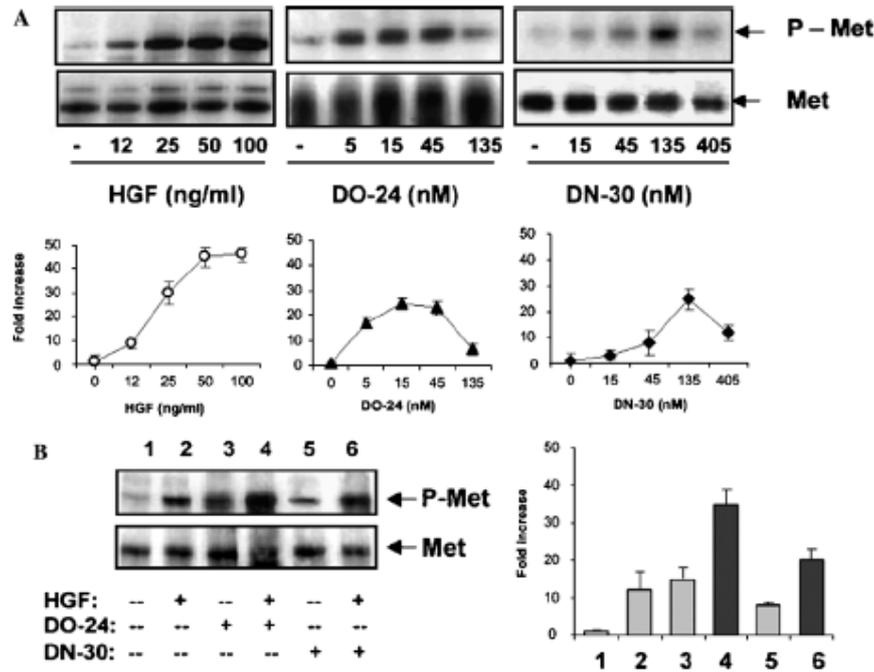


Fig. 3. Monoclonal antibodies to HGF receptor stimulate phosphorylation of Met protein in KS-IMM cells and the effect is additive to the natural ligand. (A) Quiescent cells were stimulated with different concentrations of HGF or agonist Mabs for 12 min. Met receptor was immunoprecipitated with specific antibodies from detergent cell lysates, and probed with anti-PY antibodies (P-Met) or anti-Met antibodies (Met). (B) Suboptimal concentrations of HGF (12 ng/ml) and either Mab (DO-24: 5 nM; DN-30: 45 nM) were used in combination to stimulate quiescent cells for 12 min. Representative experiments out of the three performed are reported. Quantifications of the phosphorylation normalized to the Met protein irrespective of the phosphorylation state are reported in the graphs and are the mean of the three independent experiments \pm standard error of the mean. The second band with higher molecular weight, detected in some experiments of Western blot with anti-Met antibodies, corresponds to the intracellular Met precursor.

Only HGF receptor full agonists induce a sustained and persistent activation of Met and ERK-1/2 MAPK, other transducers being stimulated at the same levels by both full and partial agonists

Each agonist was then used as stimulator of receptor phosphorylation in a time-course experiment at its optimal concentration. Both HGF and DO-24 Mab induced a sustained and persistent tyrosine phosphorylation from 10 min to 1 h, starting to decline thereafter, and reaching basal levels after 5 h (Fig. 4A). In contrast, the partial agonist DN-30 Mab induced a transient receptor phosphorylation, which peaked at 10 min and then declined rapidly.

Next, downstream signalling pathways were analysed. ERK-1/2 MAPK activation displayed a clear difference upon incubation with the full agonists HGF and DO-24 or the partial agonist DN-30. The formers induced a stronger and prolonged activation with a biphasic kinetics peaking at 10 min and at 1 h after stimulation (Fig. 4B). Thereafter the response started to decline. In contrast, DN-30 Mab induced a significantly lower level of ERK-1/2 phosphorylation, with only the 10 min peak. No significant differences were observed in the activation of JNK (Fig. 4C), PI 3-kinase activity

(Fig. 5) or in Gab1 phosphorylation induced by the three stimulators.

It can thus be concluded from all these data that, while the JNK and PI 3-kinase pathways, as well as the Gab1 adaptor protein, are equally well activated following stimulation with full or partial Met agonists, Met receptor, and ERK-1/2 MAPK are activated at sustained levels and for prolonged periods of time only by the full agonists HGF and DO-24 Mabs, but not by the partial agonist DN-30 Mabs.

Discussion

We report that in KS cells HGF activates the main transduction pathways activated in other cell types. Moreover by use of two different Mabs, acting as partial and full Met agonists, we could dissociate the mitogenic response from the proliferative and invasive ones and show that the latter requires a sustained and long-lasting activation of Met receptor and MAPK. In all these aspects HGF and the full agonist Mab displayed completely overlapping activities.

Met receptor activity has been studied mostly on epithelial cells. Here we used KS, which are of mesenchy-

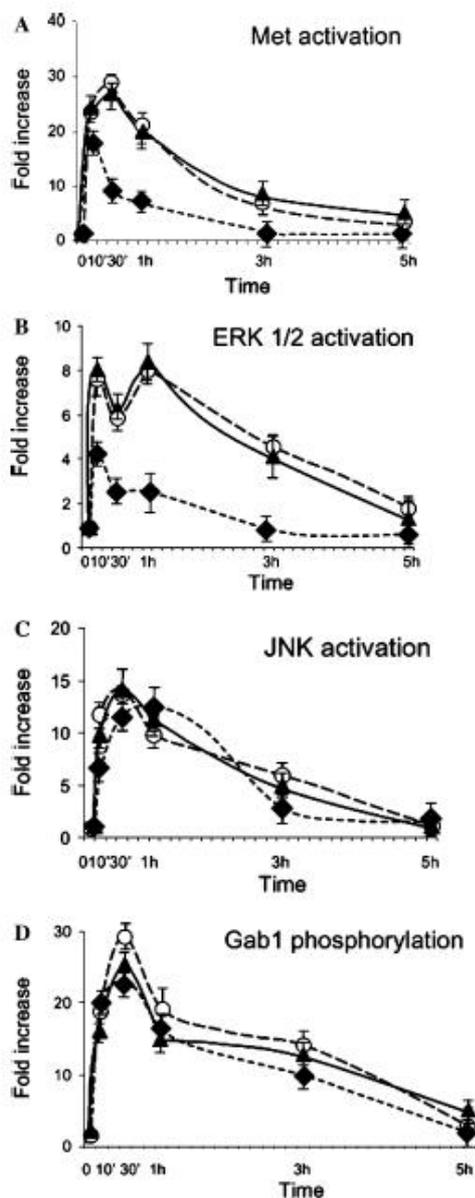


Fig. 4. Only HGF receptor full agonists induce a sustained and persistent activation of Met protein and of MAPK. Quiescent cells were stimulated for different periods of time with HGF (50 ng/ml) or agonist Mabs (DO-24: 15 nM; DN-30: 135 nM). Met (A) and Gab1 (D) immunoprecipitated from cell lysates were analysed in Western blot for tyrosine phosphorylation with anti-PY antibodies, as described in Figs. 1 and 3. Total cell lysates were probed with antibodies recognizing the tyrosine phosphorylated forms of ERK-1/2 (B) or JNK (C). Graphs represent densitometric analysis of phosphorylated bands normalized versus their respective unphosphorylated bands. Data are the means of three independent experiments \pm standard error of the mean.

mal origin and express a functional Met receptor, which, upon stimulation with HGF, activates programs of motogenicity, proliferation, and invasiveness [10]. We

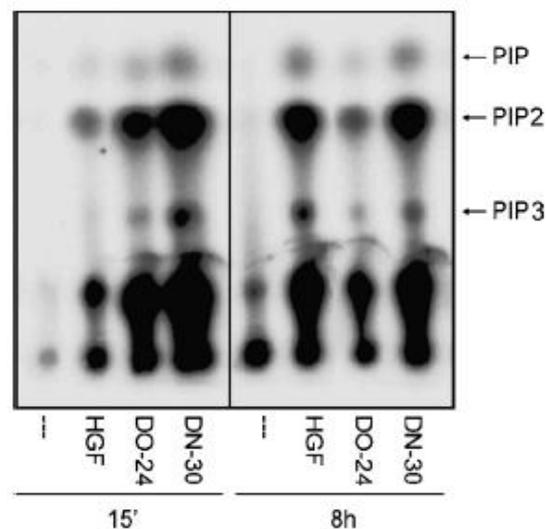


Fig. 5. Both full and partial agonists activate PI 3-kinase at similar levels. The assay was performed on equal amounts of proteins from cell lysates, as described in Fig. 1. Standard PIs were run in parallel and visualized with I_2 on the basis of previously obtained chromatograms. This is a representative experiment out of two independent experiments performed. Only one fourth of the sample stimulated with DO-24 Mab for 8 h was run.

report herein that in KS cells HGF activates the ERK-1/2 MAPK, JNK, and PI3K pathways. Also the adaptor Gab1 is phosphorylated upon HGF stimulation. STAT-3 was found phosphorylated even in the absence of stimulation; constitutive activation of this transducer was described in many primary tumors and tumor cell lines and was reported to be essential for in vitro transformation and in vivo tumorigenesis [14]. The above transducers can be activated in KS cells also upon stimulation with other cytokines/growth factors. Indeed, MAPK is phosphorylated upon treatment with HIV-1 tat protein, GPCR of KSHV and OSM [15–17], JNK is activated upon treatment by these factors, as well as by FGF [15,18,19], while PI 3-kinase is activated upon treatment with HIV tat protein and OSM [20,21]. The finding that the main signalling pathways are shared among different stimulators of KS cells is not unexpected and can be easily explained by the fact that these factors are all involved in the pathogenesis of KS.

The possibility to induce selective biological effects, among the many induced by pleiotropic growth factors, in different peculiar situations is a much debated issue in basic biology and opens to great therapeutic perspectives [22]. In this context, by using two Mabs agonists for Met receptor, we could dissociate the proliferative and invasive responses from the motogenic effect. Both Mabs could induce a motogenic response, but only the DO-24 Mab displayed mitogenic and invasive activities. It is thus shown once again that, among the different responses, motogenicity is the one more easily induced

upon Met receptor activation [23,24]. The signalling mechanisms could explain the different biological effects exerted by the two agonist Mabs. In fact, we observed a sustained and persistent Met receptor and ERK-1/2 MAPK activation in response to the full agonist Mab DO-24, in contrast to a lower and transient receptor, and ERK-1/2 activation in response to the partial agonist Mab DN-30. No other differences were detected when the other signalling pathways were considered. That the ras-MAPK pathway played an essential role in transducing Met-mediated proliferative responses already emerged also from previous studies performed on epithelial or Met-transfected cells, in which specific pharmacological inhibitors [25] or dominant negative forms of the effector molecules [26], or mutated receptors, unable to activate efficiently peculiar transduction pathways [23,24] were used. Indeed, disruption of the major Grb-2-dependent activation pathway of ras-ERK-1/2 significantly reduced Met-mediated cell transformation, the low residual Grb-2-independent ERK-1/2 activity being sufficient for the mitogenic response [23,24]. These data suggested for the first time that quantitative differences in signalling could control the outcome of Met receptor stimulation. In line with this, it was recently reported that a high level of Grb-2 ras-ERK-1/2 pathway activation correlated with HGF-dependent myoblast proliferation, while differentiation required a low level of activation of this pathway [27].

Impaired signal activation was observed also upon Met stimulation by other partial agonists. The chimeric HGF-MSP molecule, endowed of trophic activity, but devoid of invasive potential, induced only a transient phosphorylation of ERK-1/2, Akt, and Gab1 [28]. In a more artificial model, dimerization of an engineered FKBP-Met chimeric truncated receptor, induced by the bifunctional FKBP-domain specific ligand, elicited only mitogenic and morphogenic responses, but not proliferation in hepatocyte precursor cells. This partial agonist failed to induce the early peak of ERK-1/2 activation [29]. Also the HGF/NK2 Met ligand, devoid of proliferative potential, induced an impaired ERK-1/2 activation [30]. All together these data show that different qualitative biological outcomes induced by partial agonists rely on quantitative and temporal differences in the ras-MAPK signalling pathway.

In contrast to the differences observed in the ERK-1/2 activation induced by the two Mabs, similar responses were detected when other transduction pathways were analysed. Both full and partial agonists elicited a sustained and persistent activation of Gab1 and PI 3-kinase, and a shorter JNK activation. These data suggest that these molecules may be necessary effectors, but are not sufficient for a proliferative and invasive biological response in KS-IMM cells. Indeed, PI 3-kinase activity is clearly involved in the HGF-dependent mitogenic effect and cytoskeletal rearrangement [23,25], pro-

tection from apoptosis [5,21], and in the proliferative response [31]. In some cases PI 3-kinase lipid products alone could sustain the progression through the late phase of the cell cycle (phase G_{1L}), substituting the requirement of a second delayed pulse of mitogen [32]. The latter mechanism can be excluded in KS-IMM cells, since a sustained and long lasting PI 3-kinase activity is not sufficient to drive cell proliferation. No differential response was found for Gab1 activation. This protein is a key molecule in HGF induced signalling and through many tyrosine residues can recruit various effectors, such as PLC- γ , SHPTP 2 phosphatase, essential for activation of the morphogenic program [2,4], which, however, is not executed by KS-IMM cells. Gab1 has also been linked to PI 3-kinase. Indeed a reciprocal positive feedback seems to regulate the interaction between these two proteins, since upon HGF stimulation more PI 3-kinase associates with Gab1 than with the receptor and, on the other side, PI 3-kinase is required for effective Gab1 signalling (see review [4]). In the case of KS-IMM cells, the sustained and long lasting Gab1 phosphorylation could be instrumental for maintaining PI 3-kinase activity.

The two Mabs display quantitatively different activation potential also at receptor level. Although both of them induce its dimerization because of their bivalent structure, only the full agonist Mab can stabilize a conformationally active form of the Met receptor for the time necessary to trigger a full signalling activation [12]. The different epitopes recognized by the two Mabs play a critical role [12]. These are different also from the HGF binding site, since neither of them cross-compete with HGF, but on the contrary show additive effect with HGF. Significantly, another full agonist Mab defines an epitope partially overlapping the one recognized by the DO-24 Mab (Prat, personal observation). The data so far available localize the epitopes recognized by the two Mabs in the Met β chain ectodomain, while the binding site of HGF has been mapped recently to the first 212 β chain amino acids, folded in a β barrel domain [33]. Further experiments are needed to clarify whether also the epitopes defined by the Mabs are localized within the β barrel domain. The more potent receptor activation exerted by the full agonist Mabs is probably due to a more effective phosphorylation of the two tyrosines in the kinase domain (Y¹²³⁴ and Y¹²³⁵), which are the major targets of Met enzymatic activity. This difference can then propagate to the two tyrosines within the docking site (Y¹³⁴⁹ and Y¹³⁵⁶). In the case of the partial agonist Mab, the lower level of phosphorylation in the docking site is compatible with the impairment of the Grb-2-ras-ERK-1/2 MAPK pathway, which depends on Y¹³⁵⁶ phosphorylation, the maintenance of an intact potentially phosphorylation-independent activation of the Gab1-PI 3-kinase pathway [23], and a basal level of

ERK-1/2 MAPK activity. Thus, by use of two monoclonal antibodies, acting as full or partial receptor agonists, it is shown herein that specificity in the Met-mediated biological responses can be achieved through the graduated activation of a specific signaling transduction pathway.

Finally, this work has shown that the DO-24 Mab can be a valuable substitute of the natural ligand HGF, since it mimicks its activity in all biological and biochemical aspects. This is particularly interesting since HGF is a complex molecule, which must undergo proteolytic cleavage in order to acquire biological activity, is quite unstable, and can be sequestered by proteoglycans associated to the cell surface or present in the extracellular matrix (see review [1,2,4]). By contrast, Mabs are easily produced, available in large amounts in purified form, and definitively more stable than HGF, which makes them potentially valuable for therapeutic applications, once they are eventually humanized [34]. Similarly, the partial activity exerted by the DN-30 Mab deserves further studies, since the possibility to activate a selective HGF-induced response may be exploited in some peculiar situations.

Acknowledgments

Antonella Maffè is acknowledged for performing some biological experiments and Laura Ferretti for technical help. This work was supported by grants from ISS, Programma Nazionale sull'AIDS, Progetto "Patologia, clinica e terapia dell'AIDS," Rome, Italy, and from MIUR, Progetto "Aspetti clinici e patogenetici del sarcoma di Kaposi."

References

- [1] L. Trusolino, P.M. Comoglio, Scatter factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 289–300.
- [2] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, G.F. Vande Woude, Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 915–925.
- [3] C. Ponzetto, A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. Dalla Zonca, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou, P.M. Comoglio, A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family, *Cell* 77 (1994) 261–271.
- [4] K.A. Furge, Y.W. Zhang, G.F. Vande Woude, Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins, *Oncogene* 19 (2000) 582–589.
- [5] S. Giordano, A. Maffè, T.A. Williams, S. Artigiani, P. Gual, A. Bardelli, C. Basilico, P. Michieli, P.M. Comoglio, Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties, *FASEB J.* 14 (2000) 399–406.
- [6] M.S. Reitz Jr., L.S. Nerurkar, R.C. Gallo, Perspective on Kaposi's Sarcoma: facts, concepts, and conjectures, *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1999) 1453–1458.
- [7] B. Ensoli, M. Sturzl, Kaposi's Sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998) 63–83.
- [8] P.J. Polverini, B.J. Nickoloff, Role of scatter factor and the c-met protooncogene in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's Sarcoma, *Adv. Cancer Res.* 66 (1995) 235–253.
- [9] J.A. Maier, M. Mariotti, A. Albini, P. Comi, M. Prat, P.M. Comoglio, M.R. Soria, Over-expression of hepatocyte growth factor in human Kaposi's Sarcoma, *Int. J. Cancer* 65 (1996) 168–172.
- [10] F. Montaldo, A. Maffè, M. Morini, D. Noonan, S. Giordano, A. Albini, M. Prat, Expression of functional tyrosine kinases on immortalized Kaposi's Sarcoma cells, *J. Cell Physiol.* 184 (2000) 246–254.
- [11] Y.M. Naidu, E.M. Rosen, R. Zitnick, I. Goldberg, M. Park, M. Naujokas, P.J. Polverini, B.J. Nickoloff, Role of scatter factor in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi Sarcoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5281–5285.
- [12] M. Prat, T. Crepaldi, S. Pennacchietti, F. Bussolino, P.M. Comoglio, Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF, *J. Cell Sci.* 111 (1998) 237–247.
- [13] A. Graziani, D. Gramaglia, L.C. Cantley, P.M. Comoglio, The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 22087–22090.
- [14] Y.W. Zhang, L.M. Wang, R. Jove, G.F. Vande Woude, Delineating an oncostatin M-activated STAT3 signaling pathway that coordinates the expression of genes involved in cell cycle regulation and extracellular matrix deposition of MCF-7 cells, *Oncogene* 21 (2002) 217–226.
- [15] R.K. Ganju, N. Munshi, B.C. Nair, Z.Y. Liu, P. Gill, J.E. Groopman, Human immunodeficiency virus tat modulates the Flk-1/KDR receptor, mitogen-activated protein kinases, and components of focal adhesion in Kaposi's Sarcoma cells, *J. Virol.* 72 (1998) 6131–6137.
- [16] M. Faris, B. Ensoli, N. Stahl, G. Yancopoulos, A. Nguyen, S. Wang, A.E. Nel, Differential activation of the extracellular signal-regulated kinase, Jun kinase and Janus kinase-Stat pathways by oncostatin M and basic fibroblast growth factor in AIDS-derived Kaposi's Sarcoma cells, *AIDS* 10 (1996) 369–378.
- [17] A. Sodhi, S. Montaner, V. Patel, M. Zohar, C. Bais, E.A. Mesri, J.S. Gutkind, The Kaposi's Sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha, *Cancer Res.* 60 (2000) 4873–4880.
- [18] C. Bais, B. Santomasso, O. Coso, L. Arvanitakis, E.G. Raaka, J.S. Gutkind, A.S. Asch, E. Cesarman, M.C. Gershengorn, E.A. Mesri, M.C. Gershengorn, G-protein-coupled receptor of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator, *Nature* 391 (1998) 86–89.
- [19] Z.Y. Liu, R.K. Ganju, J.F. Wang, M.A. Ona, W.C. Hatch, T. Zheng, S. Avraham, P. Gill, J.E. Groopman, Cytokine signaling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's Sarcoma cells, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1798–1804.
- [20] R. Soldi, A. Graziani, R. Benelli, D. Ghigo, A. Bosia, A. Albini, F. Bussolino, Oncostatin M activates phosphatidylinositol-3-kinase in Kaposi's sarcoma cells, *Oncogene* 9 (1994) 2253–2260.
- [21] M.C. De Regibus, S. Buttiglieri, S. Russo, B. Bussolati, G. Camusi, CD40-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates endothelial cell survival and in vitro angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18008–18014.
- [22] L. Trusolino, L. Pugliese, P.M. Comoglio, Interactions between scatter factors and their receptors: hints for therapeutic applications, *FASEB J.* 12 (1998) 1267–1280.

- [23] C. Ponzetto, Z. Zhen, E. Audero, F. Maina, A. Bardelli, M.L. Basile, S. Giordano, R. Narsimhan, P. Comoglio, Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 14119–14123.
- [24] E.D. Fixman, M. Holgado-Madruga, L. Nguyen, D.M. Kamikura, T.M. Fournier, A.J. Wong, M. Park, Efficient cellular transformation by the Met oncoprotein requires a functional Grb2 binding site and correlates with phosphorylation of the Grb2-associated proteins, Cbl and Gab1, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20167–20172.
- [25] A. Khwaja, K. Lehmann, B.M. Marte, J. Downward, Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18793–18801.
- [26] G. Hartmann, K.M. Weidner, H. Schwarz, W. Birchmeier, The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 21936–21939.
- [27] Y. Leshem, I. Gitelman, C. Ponzetto, O. Halevy, Preferential binding of Grb2 or phosphatidylinositol 3-kinase to the met receptor has opposite effects on HGF-induced myoblast proliferation, *Exp. Cell Res.* 274 (2002) 288–298.
- [28] P. Michieli, S. Cavassa, C. Basilio, A. De Luca, M. Mazzone, C. Asti, R. Chiusaroli, M. Guglielmi, P. Bossu, F. Calotta, G. Caselli, P.M. Comoglio, An HGF-MSP chimera disassociates the trophic properties of scatter factors from their pro-invasive activity, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 488–495.
- [29] C. Boccaccio, M. Ando, P.M. Comoglio, A differentiation switch for genetically modified hepatocytes, *FASEB J.* 16 (2002) 120–122.
- [30] R.M. Day, V. Cioco, D. Breckenridge, P. Castagnino, D.P. Bottaro, Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis, *Oncogene* 18 (1999) 3399–3406.
- [31] N. Rahimi, E. Tremblay, B. Elliott, Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced mitogenic signals in epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24850–24855.
- [32] S.M. Jones, A. Kazanietz, Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 165–172.
- [33] E. Gherardi, M.E. Youles, R.N. Miguel, T.L. Blundell, L. Iamele, J. Gough, A. Bandyopadhyay, G. Hartmann, P.J. Butler, Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12039–12044.
- [34] W. Dall'Acqua, P. Carter, Antibody engineering, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998) 443–450.

Discussione

Attualmente la ricerca cardiovascolare dimostra sempre più attenzione al ruolo che fattori di crescita hanno nei processi di rigenerazione tissutale del miocardio in seguito ad eventi ischemici e di infarto acuto del miocardio (Morishita et al.,

1998), ma non solo anche del ruolo che essi svolgono nell'attivazione piastrinica e nei processi di differenziamento di cellule staminali mesenchimali e cardiache (Selheim et al., 2002; Grabarek et al., 1994; Vassbotn et al., 1994; Herzog et al., 2003; Bianchi et al., 2001).

Gli studi condotti su piastrine, MSC (mesenchymal stem cells) e cardiomiociti durante il corso di dottorato, hanno messo 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 in seguito ad ischemia (Nakamura et al., 2000; Duan et al., 2003), ma esso ha un ruolo anche nella modulazione dell'attività piastrinica mediata da agonisti noti, quali la trombina, e nel transdifferenziamento delle MSC in senso cardiomiogenico (Pietrapiana et al., 2005; Forte et al., 2006).

Lo studio condotto sulle piastrine, in collaborazione con il laboratorio di Biochimica, del Dipartimento di Scienze Mediche, ha documentato per la prima volta che il recettore Met è espresso sulla membrana piastrinica, e che HGF agisce sull'attività piastrinica come modulatore negativo dello stimolo trombinico. L'attività di HGF è assai simile a quella documentata per il fattore PDGF, il quale agisce come modulatore negativo dell'attivazione piastrinica indotta da agonisti quali la trombina (Vassbotn et al., 1994). Il solo stimolo di HGF come del PDGF non è in grado di evocare alcuna risposta biologica nelle piastrine. In particolare HGF si è dimostrato un modulatore negativo dell'aggregazione piastrinica indotta dalla trombina. HGF agisce in maniera dose-dipendente e transiente. L'effetto massimo di inibizione è osservato a 30 secondi di stimolazione delle piastrine; prolungando oltre i 30 secondi i tempi di trattamento con HGF e poi somministrando trombina, si osserva infatti una progressiva diminuzione dell'effetto inibitorio fino alla completa sparizione. Le concentrazioni di HGF ottimali sono nell'ordine del picomolare (10^{-10} - 10^{-12} g/ml), concentrazioni fisiologiche che dimostrano che l'effetto di HGF nelle piastrine è mediato dall'espressione del recettore ad alta affinità Met, funzionalmente attivo.

E' noto che le dosi ottimali di HGF in sistemi cellulari di tipo epiteliale, che notoriamente esprimono il recettore e che sono riconosciuti bersagli dell'attività

della citochina sono intorno a quelle picomolari (Naldini et al., 1991). Rimane ancora da definire come HGF inibisce lo stimolo della trombina; si può però ipotizzare una possibile via di azione di HGF. L'attivazione delle piastrine avviene attraverso la modificazione strutturale dell'integrina, recettore del fibrinogeno, $\alpha_{IIb}\beta_3$, nota anche come GPIIb/IIIa, che in seguito a stimolo di un agonista come la trombina, passa da una forma di membrana inattiva ad una forma attiva in grado di trasdurre un segnale pro-attivatorio. L'attivazione della GPIIb/IIIa media l'aggregazione irreversibile delle piastrine.

In piastrine stimulate con HGF si osserva una inibizione della modificazione strutturale dell'integrina nella forma attiva indotta dall'azione della trombina (Pietrapiana et al., 2005). Ulteriori indagini potrebbero individuare le vie trasduzionali coinvolte nell'azione di HGF, permettendo di individuare possibili bersagli terapeutici in pazienti ad alto rischio trombotico o in pazienti colpiti da eventi di questo tipo.

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 dimostrato 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 motogena di HGF su cellule MSC, suggerendo che le aumentate concentrazioni sistemiche di HGF in seguito a danno cardiaco, possano agire da fattori chemotattici per queste cellule verso il cuore. Gli studi in microscopia confocale, inoltre, hanno messo in evidenza l'azione differenziativa in senso cardiomiogenico di HGF su MSC, mediante blocco della proliferazione e induzione dell'espressione di specifici marcatori cardiaci quali MHC α .

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 la possibilità di utilizzare queste molecole come sostituti di HGF nella cardioprotezione da apoptosi.

I dati ottenuti dai nostri studi sul ruolo della coppia HGF/Met, nel sistema cardiovascolare, ci permettono quindi di considerare HGF e Met due possibili elementi chiave nello sviluppo futuro di eventuali studi per il disegno e l'applicazione terapeutica nel campo cardiovascolare.

L'interazione HGF/Met è nota per essere un elemento importante nello sviluppo e nella progressione del sarcoma di Kaposi (Montaldo et al., 2000), tuttavia poco si conosceva sulle modalità di azione di HGF e quali vie di traduzione vengono attivate dal recettore Met, espresso in modo ectopico in un modello cellulare di tipo mesenchimale come quello rappresentato dalle cellule di sarcoma di Kaposi. Per studiare il ruolo che il sistema HGF/Met svolge nella patologia del sarcoma di Kaposi abbiamo indagato quali vie trasduzionali sono attivate da HGF e con quali modalità. Sono state utilizzate a tal fine due molecole anticorpali con proprietà di agonista totale e parziale del recettore, il mAb DO-24 e il mAb DN-30 rispettivamente. Questo ha permesso di dissociare le risposte mitogene da quelle proliferative ed invasive evocate da HGF in vivo. In particolare l'anticorpo agonista totale DO-24 è in grado di attivare tutte le risposte biologiche indotte da HGF. Infatti si osserva una sovrapposizione delle attività di HGF e DO-24, mentre l'anticorpo DN-30 è in grado di evocare solo risposte di tipo motorio. Non solo le differenze sono qualitative, ma sono state osservate delle differenze quantitative, cioè i due anticorpi sono in grado di reclutare molecole uguali, ma con cinetiche di attivazione differenti. Entrambi i Mab agonisti sono in grado di attivare risposte motorie, ma solo l'anticorpo DO-24 riesce ad evocare risposte proliferative ed invasive. In particolare è stata documentata una diversa modalità di attivazione del sistema delle MAPK: l'agonista totale DO-24 induce un'attivazione sostenuta e protratta per lungo tempo delle MAPK ERK1/2, che consente l'attivazione di risposte mitogene, mentre l'agonista parziale DN-30 è in grado di indurre solo un basso e transiente livello di attivazione delle MAPK, che risulta insufficiente per attivare una risposta proliferativa, ma capace di evocare risposte motorie (Bardelli et al., 2005). Queste dinamiche di attivazione non erano mai state documentate prima in cellule di tipo mesenchimale, mentre sono note in sistemi cellulari di tipo epiteliale, bersagli naturali dell'azione di HGF.

I due anticorpi monoclonali DO-24 e DN-30 mostrano inoltre capacità di attivazione del recettore quantitativamente diverse. Entrambi sono in grado di indurre dimerizzazione di Met, data la loro struttura bivalente, ma solo l'agonista totale riesce a mantenere la fosforilazione del recettore per un tempo sufficiente ad attivare una risposta completa di Met: proliferazione, motogenesi, morfogenesi e crescita invasiva (Prat et al., 1998).

Gli anticorpi DO-24 e DN-30 legano il recettore Met in due epitopi diversi tra loro e che non coincidono con il sito di legame di HGF, non si osserva competizione né cross reazione tra HGF e i due anticorpi, anzi è possibile verificare effetti additivi stimolando con HGF e DO-24 o DN-30.

Analogamente a quanto osservato nello studio sugli effetti biologici di anticorpi agonisti di Met nei cardiomiociti abbiamo osservato anche nel lavoro di indagine delle modalità di attivazione delle risposte proliferative ed invasive di HGF in cellule di Kaposi (KS-IMM) che solo l'anticorpo DO-24, agonista totale è in grado di attivare tutte le vie biochimiche e mimare completamente le risposte biologiche evocate dal ligando naturale HGF, mentre l'anticorpo agonista parziale DN-30, riesce solo a stimolare risposte di tipo motorio, attivando vie trasduzionali diverse e con modalità diverse.

In conclusione possiamo affermare che l'impiego di anticorpi monoclonali agonisti del recettore Met sono assai vantaggiosi sia in ambito terapeutico, che di ricerca. La molecola di HGF infatti è una molecola complessa, che va incontro a taglio proteolitico per acquisire attività biologica, è abbastanza instabile e in vivo può essere sequestrata da molecole di proteoglicani esposti sulla superficie cellulare o presenti nella matrice extracellulare, sottraendola quindi al tessuto bersaglio e rendendo meno efficace la somministrazione di HGF a scopi terapeutici. Le molecole anticorpali invece presentano notevoli vantaggi di impiego. Innanzi tutto sono reagenti facili da ottenere in grandi quantità, relativamente poco costosi e sono molecole molto più stabili del ligando naturale HGF. Attualmente inoltre le tecniche di biologia molecolare sono sempre più avanzate e possono essere facilmente utilizzate per riformattare le molecole di anticorpi per migliorarne e ampliarne le possibili applicazioni sia in ambito clinico, umanizzazione degli anticorpi per facilitarne l'impiego terapeutico,

riducendo effetti collaterali quali HAMA; sia in ambito di ricerca, per ottenere strumenti di indagine sempre più maneggevoli ed efficaci, anticorpi “single chain” utilizzabili come inibitori dell’attivazione recettoriale. Per concludere la possibilità di disporre di anticorpi parziali agonisti di Met, permetterebbe di attivare selettivamente solo alcune risposte biologiche tra le tante evocate da HGF, consentendo di “sfruttare” effetti importanti stimolati dall’interazione di HGF/Met e non altri. Ad esempio in clinica la possibilità di utilizzare una molecola sostituta di HGF, capace di attivare solo risposte anti-apoptiche Met-mediate in cellule cardiache, ma non risposte proliferative e/o motorie o di crescita invasiva. potrebbe rivelarsi di grande rilevanza nel trattamento di pazienti oncologici sottoposti a terapia con antracicline (doxorubicina), di cui sono noti gli effetti collaterali sul cuore, permettendo un miglioramento della qualità di vita del paziente stesso e riducendo gli eventuali rischi connessi alla somministrazione di una citochina nota per il ruolo svolto anche nella progressione tumorale.

Bibliografia

1. **Anastasi S**, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. J Cell Biol 1997, 137: 1057-68

2. **Aoki M**, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y, Ogihara T. *J Atheroscler Thromb.* 2000; 7: 71-6.
3. **Bardelli A**, Longati P, Albero D, Gruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM. *EMBO J* 1996, 15: 6205-12
4. **Bardelli C**, Sala M, Cavallazzi U, Prat M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 334:1172-9.
5. **Barillari G and Ensoli B.** *Clin Microbiol Rev* 2002, 15: 310-26
6. **Beltrami AP**, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Cimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, and Anversa P. *Cell* 2003, 114: 763-76
7. **Bianco P**, Riminucci M, Gronthos S et al., *Stem Cells* 2001, 19: 180-92
- 8. Birchmeier C. and Gherardi E.** *Trends Cell Biol* 1998, 8: 404-10
9. **Birchmeier C**, Birchmeier W, Gherardi E and Vande Woude GF. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4: 915-925
10. **Bladt F**, Reithmacher D, Isenmann S, aguzzi A, Birchmeier C. *Nature*, 1995 376: 768-71
11. **Bussolino F**, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, and Comoglio PM. *J Cell Biol* 1992, 119: 629-41
12. **Cantley LC**, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, and Soltoff S. *Cell* 1991, 64: 281-302
13. **Capello D**, Gaidano G, Gallicchio M, Gloghini A, Medico E, Vivenza D, Buonaiuto D, Fassone L, Avanzi GC, Saglio G, Prat M, Carbone A. *Leukemia.* 2000, 14:285-91.
14. **Cooper CS**, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. *Nature* 1984, 311: 29-33
- 15. Crepaldi T**, Prat M, Giordano S, Medico E, and Comoglio PM. *J Biol Chem* 1994, 269: 1750- 55
- 16. Crow MT**, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. *Circ Res* 2004, 95: 957-70
Review
- 17. Di Renzo MF**, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vignari R, Pienotti MA, et al. *Oncogene* 1992, 7: 2549-53
- 18. Di Renzo MF**, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. *Oncogene* 1991, 6: 1997-2003
19. **Donate LE**, Gherdardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell TL. *Protein Sci* 1994, 3: 2378-94
20. **Duan HF**, Wu CT, Wu DL, Lu Y, Liu HJ, Ha XQ, Zhang QW, Wang H, Jia XX, Wang LS. *Mol Ther.* 2003, 8: 467-74.
21. **Ensoli B**, Sgadari C, Bacillari G, Siriani MC, Sturzl M, Monini P. *European Journal of Cancer* 2001, 37: 1251-69
22. **Freedman JE.** *Circulation* 2005, 112: 2725-34 Review
23. **Forte G**, Minieri M, Cossa D, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, Fiaccavento R, Carotenuto F, De Vito P, Baldini PM, Prat M, Di Nardo P. *Stem Cells* 2006, 24: 23-33

24. **Furge KA**, Zhang YW, Vande Woude GF. *Oncogene*. 2000, 19: 5582-9. Review.
25. **Grabarek J**, Groopman E, Lyles YR, Jiang S, Bennett L, Zsebog K and Avraham H. *JBC* 1994, 269: 21718-21724.
26. **Graziani A**, Gramaglia D, dalla Zonca P, Comoglio PM. *J Biol Chem*. 1993, 268: 9165-68
27. **Graziani A**, Gramaglia D, Cantley LC, Comoglio PM. *J Biol Chem*. 1991, 266: 22087-90
28. **Gandino L**, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. 1994 *J Biol Chem* 269: 1815-20
29. **Gill C**, Mestrlil R, Samali A. *FASEB J* 2002; 16: 135-146 Review
30. **Jin H**, Yang R, Li W, Ogasawara AK, Schwall R, Eberhard DA, Zheng Z, Kahn D, Paoni NF. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003, 304: 654-60.
31. **Herzog EL**, Chai L, Krause DS. *Blood* 2003, 102: 3483-93
32. **Hudson PJ**, Souriau C. *Nat Med*. 2003, 9:129-34. Review.
33. **Kawamoto R**, Oka Y, Yoshida O, Takagi Y. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 154-9.
34. **Kholodenko BN**, Hoek JB, Westerhoff HV. *Trends Cell Biol*. 2000, 10: 173-8
35. **Kitta K**, Day RM, Kim Y, Torregroza I, Evans T, Suzuki YJ. *J Biol Chem*. 2003, 278: 4705-12.
36. **Kitta K**, Day RM, Ikeda T, and Suzuki YJ. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001; 31: 902-910.
37. **Krijnen PAJ**, Nijmeijer R, Meijer CJLM, Visser CA, Hack CE, Niessen HWM. *J Clin Path*. 2002, 55: 801-11 Review
38. **Leof EB**. *Trends Cell Biol*. 2000, 10: 343-8
39. **Linke A**, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Bohm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J and Anversa P. *PNAS* 2005, 102: 8966-71
40. **Makino H**, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Hiraoka K, Shimizu H, Azuma J, Kurinami H, Ogihara T, Morishita R. *Hypertens Res*. 2004, 27: 85-91.
41. **Makino S**, Fukuda K, Miyoshi S et al. *J Clin Invest* 1999, 103: 697-705
42. **Maier JA**, Mariotti M, Albin A, Comi P, Prat M, Comoglio PM, Soria MR. *Int J Cancer* 1996, 65: 168-72
- 43. Maina F** and Klein R. *Nat Neuroscience* 1999, 2: 213-17
44. **Matsumori A**, Furukawa Y, Hashimoto T, Ono K, Shioi T, Okada M, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 391-395
45. **Matsumori A**, Ono K, Furukawa Y, Okada M, Sasayama S. *Jpn Circ J* 1998; 62: 311-313
46. **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. *Jpn Circ J* 2000; 64: 805-807
47. **Matsumori A.**, Takano H., Obata J., Takeda S., Tsuyuguci N., Ono K., Okada M., Miyamoto T., Ohnishi T., Daikuhara Y., Sasayama S. *Circ J* 2002; 66: 216-218
48. **McDonagh CF**, Beam KS, Wu GJ, Chen JH, Chace DF, Senter PD, Francisco JA. *Bioconjug Chem*. 2003, 14:860-9.

49. **Mellstedt H.** *Drugs Today (Barc)*. 2003, 39 Suppl C:1-16. Review.
- 50. Miyazawa K,** Shimomura T, Naka D, Kitamura N. *J Biol Chem* 269: 8966-70
- 51. Montaldo F,** Maffè A, Morini M, Noonan D, Giordano S, Albin A, and Prat M. *J Cell Physiol* 2000, 184: 246-54
52. **Morishita R,** Nakamura S, Hayashi S, Aoki M, Matsushita H, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. *J Atheroscler Thromb*. 1998; 4:128-34. Review.
53. **Naidu YM,** Rosen EM, Zitnick R, Goldberg I, Park M, Naujokas M, Polverini PJ, Nickoloff BJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 5281-85
- 54. Naldini L,** Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. *EMBO J* 1992, 11: 4825-33
- 55. Naldini L,** Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. *Oncogene*. 1991, 6: 501-4.
56. **Nakamura T,** Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, and Nakamura T. *J. Clin. Invest*. 2000; 106: 1511–1519.
57. **Neuss S,** Becher E, Woltje M et al.,. *Mol Ther* 2004, 22: 405-14
58. **Ono K,** Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. *Circulation* 1997; 95: 2552-2558
59. **Orlic D,** Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98: 10344-9
- 60. Pietrapiana D,** Sala M, Prat M and Sinigaglia F. *FEBS Lett*. 2005, 579: 4550-54
- 61. Ponzetto C,** Zhen Z, Audero E, Maina F, Bardelli A, Basile ML, Giordano S, Narsimhan R, Comoglio PM. *J Biol Chem* 1996, 271: 14119-23
- 62. Ponzetto C,** Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. *Cell* 1994, 77: 261-71
- 63. Prat M,** Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, and Comoglio PM. *J Cell Science*, 1998; 111: 237-47
- 64. Prat M,** Crepaldi T, Gandino I., Giordano S, Lonati P, and Comoglio PM. *Mol. Cell. Biol*, 1991; 11: 5954-62
65. **Prat M,** Medico E, Rossino P, Garrino C, Comoglio PM. *Cancer Res*. 1989, 49: 1415-21.
66. **Prat M,** Morra I, Bussolati G, Comoglio PM. *Cancer Res*. 1985, 45: 5799-807.
67. **Rappolee DA,** Iyer A, Patel Y. *Circ Res*. 1996; 78:1028-36.
- 68. Ridley AJ,** Comoglio PM, Hall A. *Mol Cell Biol*. 1995, 15: 1110-22
- 69. Roos F,** Ryan AM, Chamow SM, Bennett GL, Schwall RH. *Am J Physiol*. 1995, 268: G380-6.

70. **Sakakura Y**, Kaibori M, Oda M, Okumura T, Kwon AH, Kamiyama Y. *J Surg Res*. 2000, 92: 261-6.
71. **Selheim F**, Holmsen H, Vassbotn FS. *FEBS Lett*. 2002, 512: 107-10.
72. **Shimamura M**, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. *Circulation*. 2004, 109: 424-31.
73. **Siedman JG and Seidman C**. *Cell*, 2001; 104: 557-567 – Review
- 74. Slovirer RS**. *Trends Pharmacol Sci* 2002, 23: 19-24
75. **Steinhubl SR**, Moliterno DJ. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005, 5: 399-408. Review.
- 76. Tamagnone L and Comoglio PM**. 1997 *ELSEVIER* 8:129-42
77. **Trusolino L**, Pugliese L, and Comoglio PM. 1998 *FASEB J* 12: 1267-80
78. **Tulasne D**, Deheuninck J, Lourenço FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P, and Fafeur V. *Mol Cell Biol* 2004, 24: 10328-39
79. **Ueda H**, Nakamura T, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. *Cardiovasc Res*. 2001, 51: 41-50.
80. **Ueda H**, Sawa Y, Matsumoto K, Kitagawa-Sakakida S, Kawahira Y, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. *Ann Thorac Surg*. 1999; 67: 1726-31.
81. **Vassbotn FS**, Havnen OK, Heldin CH and Holmsen H. *JBC* 1994, 269: 13874-13879.
82. **Vigna E**, Gramaglia D, Longati P, Bardelli A, Comoglio PM. 1999 *Oncogene* 18:4275-81
83. **Villa-Moruzzi E**, Lapi S, Prat M, Gaudino G, Comoglio PM. *J Biol Chem*. 1993, 268: 18176-80
84. **Vogel CL**, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ. *Oncology*. 2001, 61 Suppl 2:37-42. Review.
85. **Weidner KM**, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. *Nature* 1996, 384: 173-6
86. **Weidner KM**, Sachs M, Riethmacher D, Birchmeier W. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 2597-2601
87. **Yamamoto Y**, Kohara K, Tabara Y, Igase M, Nakura J, Miki T. *Hypertens Res*. 2002; 25: 661-7.
88. **Xiao GH**, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 247-52
89. **Zhang L**, Himi T, Murota S. *J Neurosci Res*. 2000; 62: 389-95.