

**Dottorato in Medicina Molecolare - XIX ciclo -**

**Dipartimento di Scienze Mediche**

**Università del Piemonte Orientale**

**RELAZIONE DEL III ANNO DI DOTTORATO**

# **Studio della ghrelina nei sistemi cardiaco e muscolo-scheletrico**

**Dottoranda: Viola Felicita Gnocchi**

**Responsabile Scientifico: Prof. Andrea Graziani**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	pag
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag
<b>RISULTATI</b>	pag
<b>COMMENTI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	pag
<b>RIFERIMENTI BIBIOGRAFICI</b>	pag
<b>ARTICOLI PUBBLICATI</b>	pag
<b>SEMINARI 2005/2006</b>	pag
<b>ABSTRACT</b>	pag
<b>PARTECIPAZIONI A CONGRESSI</b>	pag

# INTRODUZIONE

## GHRELINA

A partire dalla metà degli anni '90 in campo endocrinologico sono state intensivamente studiate delle sostanze sintetiche, peptidiche e non, in grado di stimolare la secrezione dell'ormone della crescita (GH) *in vitro* ed *in vivo*, globalmente denominate GH secretagoghi (GHSs). E' stato appurato che i GHSs sono in grado di stimolare il rilascio del GH mediante legame ad un recettore -allora- orfano, che proprio per questa attività è stato denominato Growth Hormone Secretagogues Receptor 1 (GHS-R1). A tutt'oggi sono note due diverse isoforme del GHS-R1 derivanti da splicing alternativo: l'isoforma 1a, dalla struttura a 7 passi transmembrana, tipica dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), responsabile del segnale indotto dai GHSs, e l'isoforma 1b, tronca e considerata non funzionante.

Solo in un secondo momento, valutando gli effetti di estratti cellulari di diversi tessuti sull'attività del GHS-R1a, è stato isolato e quindi clonato il ligando naturale di tale recettore: si tratta di ghrelina, un ormone peptidico di 28 aminoacidi prodotto essenzialmente dallo stomaco (*Kojima et al. Nature, 1999*), la cui sequenza è altamente conservata presso tutte le specie in cui a tutt'oggi è stato clonato (*Palyha et al, Mol. Endocr. 2000*).

La ghrelina viene ottenuta per mezzo di tagli proteolitici successivi a partire dalla pre-pro ghrelina (117 aminoacidi); in seguito al taglio dei 23 aminoacidi N-terminali e dei 67 aminoacidi C-terminali si ottiene la sequenza di 28 aminoacidi della proteina matura.

Recentemente è stato dimostrato che a partire dal medesimo pre-pro peptide viene ottenuto un secondo ormone peptidico di 23 aminoacidi, denominato obestatina (*Zhang et al. Science, 2005*). L'obestatina si trova a valle della ghrelina all'interno della sequenza pre-pro ed è da essa distanziata di 23 aminoacidi.

Lo studio degli effetti dell'obestatina *in vivo* ha dimostrato che tale peptide ha effetti opposti a quelli della ghrelina: inibisce l'appetito, le contrazioni del digiuno e riduce l'aumento di peso (esperimenti condotti su ratti).

Il gruppo di ricerca che ha scoperto l'obestatina aveva anche riportato, nel medesimo lavoro, che tale peptide era in grado di legare ed attivare il GPR39, un G-protein coupled receptor orfano. Recentemente, tuttavia, un diverso gruppo di lavoro ha confutato il legame a tale recettore (*Holst et al. Endocrinology, 2006*) conducendo esperimenti di

*binding* che lasciano scarsi dubbi sulla veridicità di questo secondo risultato. La discussione su quale sia il recettore per obestatina resta aperta.

Esistono due differenti forme di ghrelina: una octanoilata sulla serina in posizione 3 (GHR), l'altra priva di tale modificazione post-traduzionale (des-acyl GHR). La GHR viene estensivamente studiata per il suo ruolo nel metabolismo, la stimolazione dell'appetito e l'induzione del rilascio di GH; tale ruolo viene svolto mediante interazione con il recettore GHS-R1a (*Bednareck et al. J. Med. Chem. 2001*). Per quanto riguarda la des-acyl GHR, inizialmente si pensava che fosse priva di una propria attività, probabilmente un serbatoio circolante di ghrelina inattiva da attivare all'occorrenza mediante acilazione; infatti la des-acyl GHR non è in grado di stimolare il rilascio di GH e non lega il GHS-R1a (*Kojima et al. Nature, 1999*). Progressivamente però si è cominciato a capire che anche la des-acyl GHR è dotata di propria attività in diversi sistemi cellulari, con effetti analoghi se non superiori a quelli ottenuti con GHR; si tratta ad esempio di induzione dell'adipogenesi in midollo osseo *in vivo* (*Thompson et al. Endocrinology, 2003*), stimolazione della proliferazione in una linea cellulare tumorale ipofisaria di ratto (*Nanzer et al. Eur. J. Endocr. 2004*), inibizione della proliferazione in cellule tumorali prostatiche umane DU145 (*Cassoni et al. Eur. J. Endocr, 2004*).

## **EFFETTI CARDIACI DI GHRELINA**

La maggioranza degli studi condotti sugli effetti di GHR e des-acyl GHR GH-indipendenti si sono concentrati sul sistema cardio-vascolare. Già con taluni GHSs (ad esempio Hexarelin), infatti, era stato osservato un effetto protettivo diretto su cellule di tale sistema, visto ad esempio come inibizione dell'apoptosi in cardiomiociti *in vitro* (*Filigheddu et al, Endocrine 2001*) e cardioprotezione *in vivo* (*Locatelli et al. Endocrinology 1999*).

A partire da queste premesse, il gruppo di lavoro diretto dal Prof. A. Graziani ha cominciato a valutare gli effetti di GHR e des-acyl GHR su cellule cardiache ed endoteliali, in linea o primarie. I risultati di tali esperimenti hanno confermato che sia GHR che des-acyl GHR sono in grado di inibire l'apoptosi indotta con diversi trattamenti (deprivazione di siero, somministrazione di Fas-L, doxorubicina) in cardiomiociti in linea (H9C2), cardiomiociti primari e cellule endoteliali (PAE) (*Baldanzi et al. JCB, 2002*).

Ai risultati ottenuti *in vitro* ormai da diversi gruppi di lavoro sono andati a sommarsi nel tempo risultati ottenuti *in vivo*; in particolare è stata dimostrata da parte di GHR la

protezione dal danno cellulare indotto da infarto del miocardio (*Nagaya et al. Circulation 2001*) e dal danno da ischemia/riperfusion (*Chang et al. J. Cardiovasc. Pharmac. 2004*) nonché il miglioramento dei parametri cardiaci in corso di insufficienza cardiaca (*Nagaya et al. Circulation 2001 - Nagaya and Kangawa, Curr. Opin. Pharmacol. 2003*).

## **EFFETTI DI GHRELINA SUL MUSCOLO SCHELETRICO**

Considerati gli interessanti risultati ottenuti con ghrelina su cellule del sistema cardiovascolare, ci siamo chiesti se GHR e des-acyl GHR potessero avere un'azione anche su un altro tipo di cellule muscolari specializzate, le cellule di muscolo striato scheletrico.

Per questo studio abbiamo principalmente utilizzato i mioblasti scheletrici murini C2C12. Si tratta di una linea cellulare indifferenziata e proliferante di precursori di cellule muscolari che possono essere indotti a differenziare e fondere a dare miotubi multinucleati dopo essere stati mantenuti per circa cinque-otto giorni in terreno di differenziamento (DMEM addizionato di siero di cavallo al 2%).

In questo modello sperimentale il nostro gruppo di lavoro ha dimostrato che sia GHR che des-acyl GHR sono in grado di indurre differenziamento e fusione dei mioblasti scheletrici C2C12 (*Filigheddu N, Gnocchi VF et al, manoscritto sottomesso a Mol Biol Cell*).

GHR e des-GHR sono infatti in grado di inibire la proliferazione dei mioblasti C2C12 e di indurre la trascrizione di marcatori precoci (miogenina) e tardivi (MHC, catena pesante della miosina) del differenziamento muscolare. L'analisi degli indici di differenziamento (numero di cellule positive per MHC/100) e fusione (numero di cellule con tre o più nuclei/cellule positive per MHC/100) hanno confermato l'attività pro-differenziativa sia di GHR che di des-acyl GHR.

## **L'ATROFIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO**

L'atrofia del muscolo scheletrico è una risposta catabolica, sistemica e debilitante ad alcune condizioni fisiologiche, come la denutrizione, o ad una varietà di patologie, come la presenza di una massa tumorale, il diabete mellito, l'AIDS, disturbi renali; inoltre singoli muscoli possono andare incontro ad atrofia in seguito a denervazione o disuso.

L'atrofia del muscolo scheletrico consiste in una perdita massiva di proteine strutturali che porta ad una diminuzione della massa muscolare e ad una conseguente riduzione di

funzionalità. Il decremento delle proteine muscolari è il risultato di una diminuzione di sintesi proteica accoppiato ad un incremento della degradazione; sebbene entrambi i processi concorrano all'insorgere di atrofia, la degradazione proteica tramite la via ubiquitina-proteasoma ATP-dipendente è il principale fenomeno causale.

Recentemente è stato condotto un accurato studio per elucidare i cambiamenti trascrizionali che accompagnano l'insorgere dello stato atrofico. Esperimenti di cDNA *microarrays* per comparare quattro diverse condizioni inducenti atrofia (denutrizione, presenza di tumore, insufficienza renale, diabete mellito) a condizioni di equilibrio e assenza di atrofia in topi o ratti hanno rivelato che in tutte le condizioni inducenti atrofia, mentre il 90% del trascrittoma non mostra significative variazioni, un set comune di 120 geni viene regolato in modo coordinato (*Lecker et al, The FASEB J, 2004*). Tra questi geni, collettivamente denominati "atrogeni", si trovano geni codificanti proteine coinvolte nella via ubiquitina-proteasoma (*up*-regolati), nella produzione di energia, codificanti per proteine strutturali della matrice extracellulare (*down*-regolati) e così via .

La presenza di questo "programma atrofico" ben conservato ha permesso di postulare una via di segnalazione comune che influenzi i medesimi fattori trascrizionali per indurre l'espressione dei medesimi geni indipendentemente dallo stimolo testato.

Tra gli atrogeni identificati si distingue per entità di sovraespressione in corso di atrofia atrogenin-1 (MAFbx), una Ub-ligasi muscolo-specifica la cui espressione è notevolmente incrementata durante l'atrofia; per questo motivo l'espressione di atrogenin-1 può essere utilizzata come marcatore del grado di atrofia della cellula (*Bodine et al, Science 2001*).

Principali responsabili dell'aumento di espressione di atrogenin-1 e della sua repressione in condizioni non atrofiche sono una famiglia di fattori di trascrizione chiamati FoxO, Forkhead box subgroup O (*Sandri et al, Cell 2004*). I fattori FoxO sono finemente regolati sia da un meccanismo di induzione trascrizionale (in particolare FoxO-1, che appartiene a sua volta al set di atrogeni) e da un classico meccanismo di fosforilazione/defosforilazione. La fosforilazione dei fattori FoxO impedisce la loro traslocazione nel nucleo e di conseguenza l'attivazione della trascrizione di un certo numero di geni, tra cui atrogenin-1, in risposta all'induzione di atrofia. E' da notare tuttavia, che nel muscolo scheletrico sono presenti numerose altre ubiquitina-ligasi (come ad esempio UBR1 e MuRF1) che sicuramente concorrono al processo atrofizzante, come emerge dall'osservazione che *knockouts* di atrogenin-1 sono solo parzialmente efficaci nel prevenire l'insorgere di atrofia (*Cao et al, Int J Bioch Cell Biol, 2005*).

La fosforilazione dei fattori FoxO è a carico della via di trasduzione PI3K/Akt, come dimostrato in risposta al fattore anti-atrofico IGF-1 (*Stitt et al, Molecular Cell, 2004; Nader, Int J Bioch Cell Biol, 2005, Léger et al, FASEB J, 2006*).

L'assenza di siero o di fattori di crescita come insulina o IGF-1 blocca la via di trasduzione del segnale PI3K/AKT e, di conseguenza, i fattori FoxO non fosforilati sono liberi di entrare nel nucleo dove promuovono la trascrizione di atrogin-1 e di altri atrofici. Inoltre è stato dimostrato che i fattori FoxO non sono gli unici coinvolti a valle di PI3K/AKT: infatti anche la fosforilazione di GSK3 $\beta$  (inattivante) e la fosforilazione di mTOR (attivante) svolgono un ruolo nella trascrizione degli atrofici e pertanto concorrono all'insorgere di atrofia (*Li BG et al, Int J Bioch Cell Biol, 2005*).

## MATERIALI E METODI

### COLTURE CELLULARI

Cellule C2C12 (mioblasti scheletrici murini immortalizzati ad un basso grado di differenziamento) sono state mantenute a 37°C in terreno di crescita (*growth medium*, GM), così definito: DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) arricchito con FCS al 10%, e addizionato di antibiotici, antimicotici e glutamina. Le cellule sono state mantenute in piastre Petri di 10 cm di diametro ad arrivare ad una confluenza di circa 70-80% e poi passate a diluizione opportuna. La coltura in terreno di crescita ed il non raggiungimento della confluenza completa consentono di mantenere le C2C12 non differenziate e attivamente proliferanti.

Il differenziamento dei mioblasti C2C12 a miotubi è stato indotto sostituendo a cellule al 70-80% di confluenza il terreno di crescita con il terreno di differenziamento (DM), costituito da DMEM addizionato di siero di cavallo al 2%, antibiotici, antimicotici e glutamina. Dopo circa cinque-sette giorni di coltura in DM le cellule si presentano come sincizi multinucleati ed allungati, i miotubi.

Sono state inoltre utilizzate cellule L6; si tratta di mioblasti scheletrici indifferenziati di ratto. Le condizioni di coltura utilizzate sono state le medesime delle C2C12. Le cellule L6, tuttavia, hanno mostrato una velocità di proliferazione inferiore a quella delle C2C12 ed anche una rallentata capacità ad andare incontro a fusione e differenziamento. I miotubi ottenuti dalla fusione delle L6 risultano morfologicamente meno allungati ma di diametro superiore rispetto a quelli ottenuti con le C2C12.

### INDUZIONE DELL'ATROFIA

L'atrofia è stata indotta in miotubi C2C12 ottenuti dalla permanenza in terreno di differenziamento per 5 giorni mediante *i)* sostituzione del terreno di differenziamento con PBS, per tempi variabili *ii)* somministrazione di dexametasone 1 µM per 24 ore.

In una serie di esperimenti abbiamo anche indotto apoptosi dei miotubi utilizzando un anticorpo monoclonale agonista di FAS (Apo 1/3, Alexis) in grado di mimare l'attività del FAS-L.



## **VALUTAZIONE DELL'ATROFIA**

Per valutare il grado dell'atrofia indotta nei miotubi con i diversi stimoli e trattamenti abbiamo utilizzato un metodo qualitativo ed un metodo quantitativo.

Il metodo qualitativo prevede il fissaggio e la colorazione delle cellule al termine dei trattamenti con l'utilizzo di Diff quick (fissaggio con metanolo, colorazione con ematossilina eosina) e foto al microscopio per mettere in evidenza le differenze morfologiche e di organizzazione dei miotubi. In alcuni casi le foto sono state scattate senza previa fissazione e colorazione delle cellule.

Il metodo quantitativo è finalizzato a valutare uno dei parametri morfologici dei miotubi che variano maggiormente in corso di atrofia, il diametro. Per ogni piastra o pozzetto di cellule con diverso trattamento sono stati misurati, con l'ausilio del computer, circa 120 diametri in almeno 4-5 diversi campi; i 10 diametri maggiori e i 10 minori sono stati eliminati e dei restanti 100 è stata calcolata la media con relativo errore standard.

Per valutare la significatività delle differenze riscontrate tra i valori medi ottenuti è stato applicato il test t di Student con coda = 2 e tipo = 3. Sono stati considerati significativi valori del t con  $p \leq 0,01$ .

## **ESTRAZIONE RNA, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE**

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Nucleo Spin RNA II (Macharey Nagel); a seguito dei trattamenti le cellule sono state lavate con PBS e ogni piastra è stata lisata con 400  $\mu$ l di buffer di lisi e  $\beta$ -mercaptoetanololo; la lisi è stata ottimizzata mediante omogenizzazione con siringa.

L'RNA ottenuto è stato quantificato mediante misurazione allo spettrofotometro e 2  $\mu$ g di ciascun campione sono stati retrotrascritti con SuperScript III RT (Invitrogen) per ottenere il cDNA, in presenza di random esameri. 1  $\mu$ l di ciascun cDNA è stato utilizzato per effettuare RT PCR per la GAPDH murina come verifica di avvenuta retrotrascrizione (primer: GAPDH-for 5' ATCACTGCCACCCAGAAGACT 3' e GAPDH-rev 5' ATCGAAGG TGGAAGAGTGGGA 3').

Per tutte le RT-PCR è stata utilizzata la DyNAzyme EXT polimerasi (Finnzymes).

## **DISEGNO DEI PRIMER**

Tutti i primer descritti in questo lavoro sono stati disegnati utilizzando il programma *online* Web Primer disponibile gratuitamente alla pagina <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> e sono stati sintetizzati dalla MWG Biotech. Tutte le sequenze sottoposte al programma per il disegno dei primer sono state ricavate dalla banca dati dell'NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

## **REAL TIME PCR**

Per valutare quantitativamente la presenza del trascritto di atrogin-1 nei nostri campioni sono state effettuate delle Real Time PCR. Ogni singola reazione è stata condotta in un volume finale di 20 µl: Platinum Sybr Green qPCR SuperMix UDG (2X), ROX (50X); come gene di controllo è stata utilizzata la GAPDH, amplificata con i seguenti primer:

GAPDH for 5' CTGGCCAAGGTCATCCATGA 3'

GAPDH rev 5' AGGGGCCATCCACAGTCTT 3'

Per il gene di interesse sono stati usati i seguenti primer:

atrogin-1 for 5' TGCCATCCTGGATTCCAGAAG 3'

atrogin-1 rev 5' TTCTTTTGGGCGATGCCACT 3'

Ad ogni esperimento i singoli campioni sono stati amplificati in triplicato. Lo strumento utilizzato è il 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems.

## **WESTERN BLOTTING**

Le cellule, in seguito ai trattamenti, sono state lisate con tampone di lisi addizionato di una miscela di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich) e ortovanadato 1 mM.

Le proteine sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di acrilamide all'8% in presenza di SDS. In seguito alla corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrana in PVDF (Amersham) mediante trasferimento Semi-Dry (Biorad). La membrana così ottenuta, dopo saturazione in metanolo, è stata decorata con un anticorpo primario. Dopo la decorazione con l'anticorpo la membrana è stata abbondantemente lavata con TBS-Tween (0,1%) e a seguire è stata incubata in presenza di anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina. Dopo gli opportuni lavaggi il risultato è stato osservato mediante reazione in chemiluminescenza (ECL, Perkin Elmer). Per poter riutilizzare la

medesima membrana per la decorazione con un diverso anticorpo primario, è stato utilizzato un tampone addizionato di  $\beta$ -mercaptoetanololo in grado di rimuovere gli anticorpi legatisi in precedenza. Per saturare nuovamente la membrana prima della nuova decorazione è stata utilizzata una soluzione al 10% di BSA.

Come anticorpi primari sono stati utilizzati: anti P(Ser 473)-AKT e anti AKT (Biosource), anti P-FoxO-3 (Upstate), anti P-FoxO-1 e anti FoxO-1 (Cell Signaling), anti tubulina (Sigma Aldrich); gli anticorpi anti P-Gsk3b, anti Gsk3b, anti P-p70s6k e anti p70s6k, tutti Cell Signaling, sono stati un gentile omaggio del laboratorio del Prof. Gianni Gaudino.

## **ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO E PCR PER SELEZIONE ETEROZIGOTI E OMOZIGOTI NELLA F1 E F2 DELLE LINEE DI TOPI TRANSGENICI GHR-CUORE**

I topi nati dall'accoppiamento dei fondatori con dei topi wild type (F1) sono stati analizzati per la presenza del transgene, GHR sotto controllo di un promotore cuore-specifico. Per ottenere il DNA genomico da analizzare è stato tagliata ad ogni topo l'estremità della coda (circa 3 mm) ed è stata immediatamente digerita per 3 ore a 57°C in presenza di proteinasi K. Il surnatante della digestione è stato utilizzato come stampo per la PCR.

La selezione via PCR è stata ottenuta con un primer forward complementare ad una sequenza del promotore della  $\alpha$ MHC murina ed un primer reverse complementare ad una sequenza della GHR (for 5' GGGGTTCCCACCCTTATGTAA 3'; rev 5' TTACTIONTGTTCAGCTGGCGCCT 3'). L'amplimero risultante è di 904 paia di basi.

## **PRODUZIONE DEL VETTORE D'ESPRESSIONE MUSCOLO-SPECIFICA DI GHRELINA (MODIFICATO RISPETTO AL PRECEDENTE)**

In precedenza avevamo già clonato l'intero cDNA di ghrelina murina e l'avevamo inserito all'interno di un vettore per l'espressione muscolo schletrico-specifica (si veda relazione del II anno). Prima che procedessimo con la microiniezione, però, è uscito un lavoro di Zhang e colleghi in cui si dimostrava l'esistenza di un secondo ormone peptidico, denominato obestatina, codificato a partire dalla pre-pro ghrelina mediante tagli proteasici specifici. In particolare l'obestatina (23 aminoacidi) si trova a valle della ghrelina nella pre-pro ghrelina.

Abbiamo dunque deciso di inserire uno stop codon nel cDNA della pre-pro ghrelina a valle di ghrelina, a monte di obestatina per inserire nel nostro vettore la sola porzione codificante la ghrelina.

Il cDNA di ghrelina murina è stato clonato a partire da cDNA di stomaco di topo (precedentemente preparato) utilizzando i seguenti primer:

for- 5' ATGCTGTCTTCAGGCACCAT 3'

rev- 5' GATCTCCAGCTACTCCTCTGT 3'

Il primer reverse, mediante sostituzione di un'unica base (C→ A) consente l'amplificazione di un codone di stop in luogo di un residuo di acido glutammico.

Il prodotto di reazione (222 bp) è stato sottoposto a nuova amplificazione con i primer per inserire i siti di restrizione opportuni con i seguenti primer: mGHR/XhoI\_for 5' CCGCTCGAGCGGATGCTGTCTTCAGGCACCAT 3' e mGHR/ stop/HindIII\_rev 5' CCCAAGCTTGGGGATCTCCAGCTACTCCTCTGT 3' Il prodotto di PCR è stato fatto correre su gel per verificare le dimensioni del frammento che è stato quindi purificato (NucleoSpin Extract, Macherey Nagel). I tagli enzimatici con XhoI e HindIII (New England BioLabs) sono stati effettuati contemporaneamente con tampone compatibile a 37°C per 2 ore. A seguire corsa su gel ed estrazione della banda.

Il vettore per espressione muscolo scheletrico-specifica è così costruito: 2,7 kb del vettore pUC18 (contenente origine di replicazione batterica e resistenza all'ampicillina), 1,5 kb del promotore per MLC1f, sito di clonaggio, sito di poliadenilazione di SV40 ed MLC enhancer, per un totale di circa 6 kb. Tale vettore è stato tagliato a livello del sito di clonaggio con Sall e HindIII (New England BioLabs) in sequenza, con corsa su gel d'agarosio ed estrazione della banda da gel ad ogni passaggio. I tagli con Sall e XhoI producono estremità compatibili.

La reazione di ligasi con T4 ligasi (New England BioLabs) tra vettore e inserto in rapporto 1:6 (50 ng:300 ng) è durata 17 ore a 16°C.

Con il prodotto di ligasi sono stati trasformati batteri competenti TOP10 ed è stata effettuata una Midi Prep (Sigma-Aldrich) dopo crescita *over night* in 200 ml di terreno LB.

La verifica dell'avvenuta ligasi è stata effettuata mediante taglio enzimatico con EcoRI (Invitrogen). Una volta verificata l'avvenuta ligasi, la ghrelina murina è stata nuovamente amplificata con i primer con cui era stata clonata e l'amplimero così ottenuto è stato inviato a sequenziare alla MWG biotech per escludere la presenza di errori nella sequenza.

## RISULTATI

### GHRELINA INDUCE FOSFORILAZIONE DI AKT IN MIOTUBI C2C12

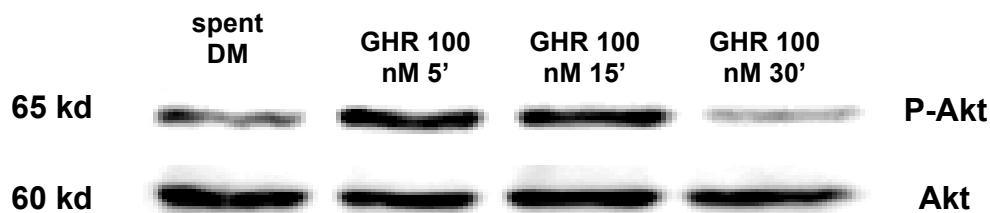
Siamo andati a valutare se GHR e des-acyl GHR avessero un'attività biochimica sui miotubi C2C12.

Cellule C2C12 a confluenza 70-80% sono state poste in terreno di differenziamento (DMEM 2% HS) per 5 giorni. Il terreno è stato cambiato ogni 24 ore. Al termine dei 5 giorni le cellule erano differenziate e fuse, a dare i caratteristici miotubi multinucleati.

Ai miotubi non è stato cambiato il terreno durante le ultime 24 ore ed è quindi stata somministrata la GHR 100 nM, per 5, 15 o 30 minuti. In un esperimento indipendente abbiamo anche provato a concentrazioni superiori, ma il risultato è rimasto invariato, indicando che presumibilmente 100 nM è già una concentrazione saturante di GHR.

L'esperimento ha dimostrato che la GHR è in grado di indurre fosforilazione di Akt in miotubi C2C12 in cui tale fosforilazione sia ridotta dalla presenza di terreno consumato. La cinetica di tale fosforilazione dimostra che GHR induce un picco a 5 minuti per decrescere a 15 e tornare a valori basali a 30 minuti (Figura 1).

Esperimenti condotti nelle medesime condizioni con la des-acyl GHR hanno invece suggerito che tale peptide de-acilato non abbia effetto sulla fosforilazione di Akt su miotubi C2C12.



**Figura 1:** time course in Western Blot degli effetti di GHR sulla fosforilazione di Akt in miotubi C2C12 mantenuti in terreno consumato.

## **GHRELINA PROTEGGE MIOTUBI C2C12 DALL'ATROFIA**

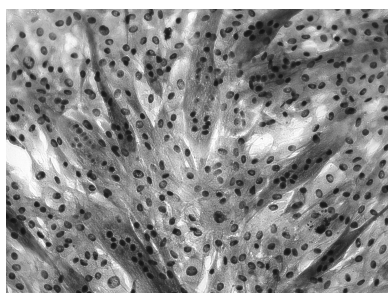
Cellule C2C12 a confluenza 70-80% sono state poste in terreno di differenziamento (DMEM 2% HS) per 5 giorni. Il terreno è stato cambiato ogni 24 ore. Al termine dei 5 giorni i miotubi ottenuti sono stati indotti ad andare incontro ad atrofia mediante trattamento con dexametasone 1  $\mu$ M per 24 ore o, in alternativa, mediante sostituzione del terreno con PBS per 60 o 180 minuti. In contemporanea con lo stimolo atrofico ai miotubi sono stati somministrati anche i diversi trattamenti: GHR o des-acyl GHR a diverse concentrazioni (10-100-1000 nM), IGF1 10 ng/ml. Come controllo positivo è stato utilizzato del terreno di differenziamento fresco.

In seguito allo stimolo atrofico le cellule sono state osservate al microscopio: l'atrofia era chiaramente visibile, dal momento che i miotubi risultavano di diametro ridotto, separati gli uni dagli altri, con un inferiore numero di nuclei ed una chiara disorganizzazione generale.

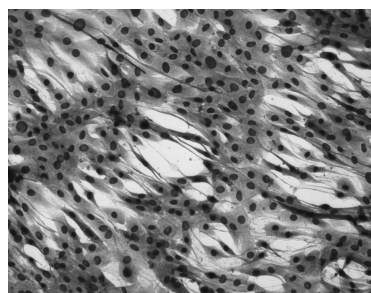
Per valutare quantitativamente gli effetti biologici sia dell'induzione che dell'eventuale protezione da atrofia, sono stati misurati i diametri dei miotubi, come descritto nei materiali e metodi.

I risultati ottenuti hanno indicato che la GHR, ma non la des-acyl GHR, è in grado di inibire l'atrofia indotta sia da dexametasone che da PBS.

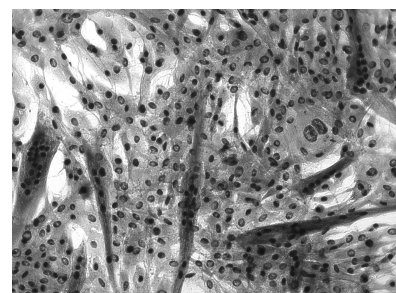
Infatti la GHR a tutte le concentrazioni testate (10, 100, 1000 nM) era in grado di revertire la morfologia alterata dei miotubi e di mantenerne il diametro (Figure esemplificative 2, 3, 4 e 5).



**DM**



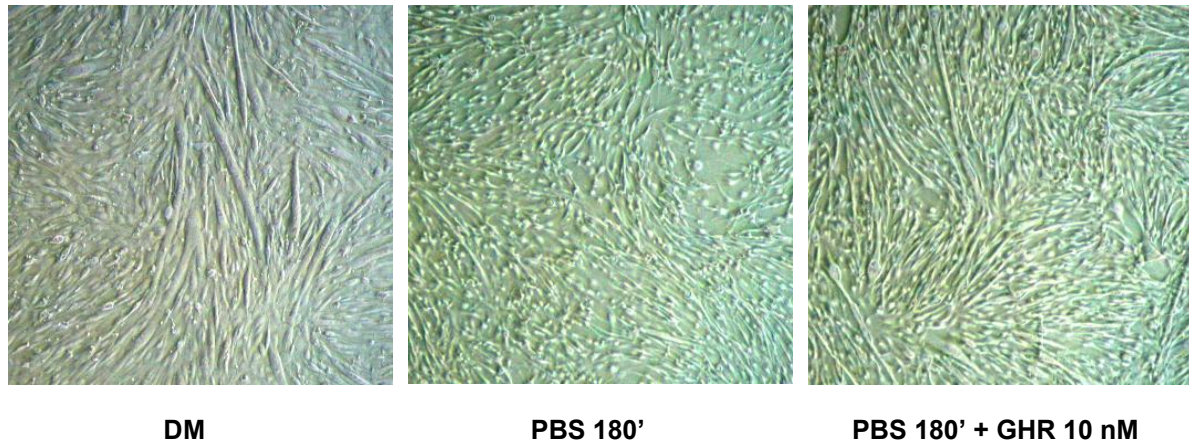
**Dexa 1  $\mu$ M 24 h**



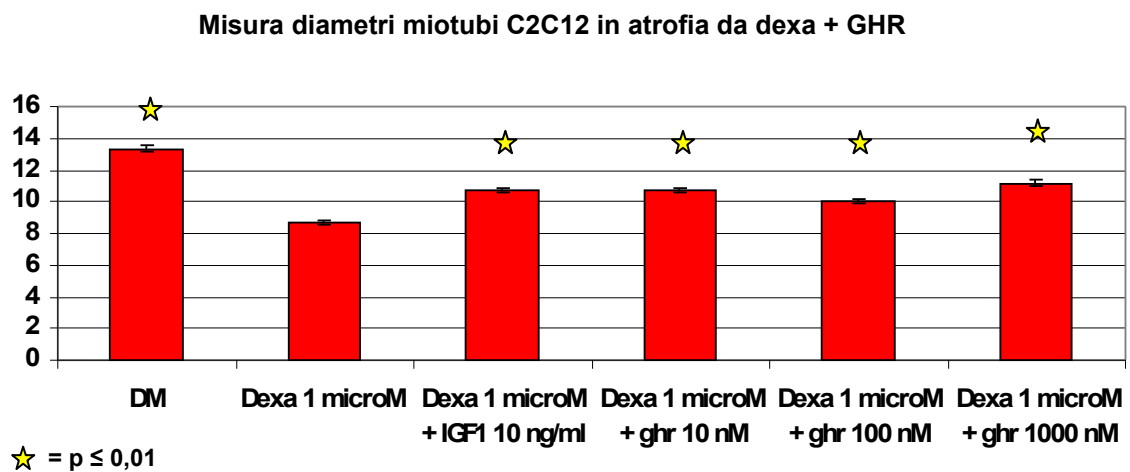
**Dexa 1  $\mu$ M 24 h**

+ GHR 100 nM

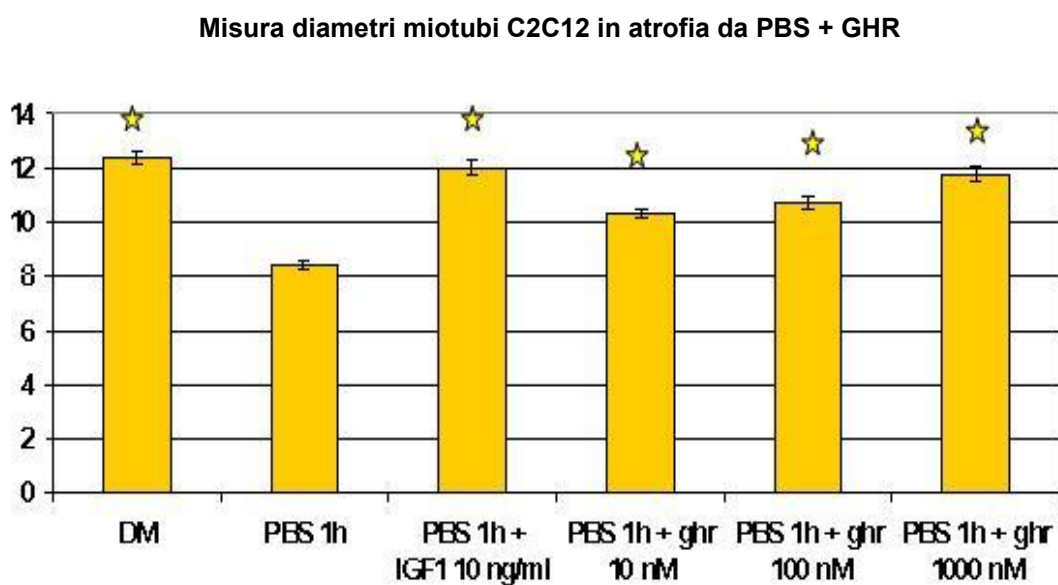
**Figura 2:** immagine al microscopio di miotubi C2C12 fissati e colorati con Diff Quik in terreno di differenziamento, indotte ad andare in atrofia con dexametasone e trattate con GHR 100 nM.



**Figura 3:** immagine al microscopio di miotubi C2C12 in terreno di differenziamento, indotte ad andare in atrofia mediante sostituzione del terreno con PBS per 180 minuti e GHR 10 nM.



**Figura 4:** grafico riassuntivo delle medie dei diametri misurati (micrometri) di miotubi C2C12 in atrofia da dexametasone; come controlli positivi sono stati usati il DM e l'IGF1 10 ng/ml; i trattamenti con GHR sono stati somministrati a 3 diverse concentrazioni.



**Figura 5:** grafico riassuntivo delle medie dei diametri misurati (micrometri) di miotubi C2C12 in atrofia da PBS 60 minuti; come controlli positivi sono stati usati il DM e l'IGF1 10 ng/ml; i trattamenti con GHR sono stati somministrati a 3 diverse concentrazioni.

**GHRELINA INDUCE FOSFORILAZIONE DI AKT E FOXO3 IN MIOTUBI C2C12 ED L6 SOTTOPOSTI A STIMOLO ATROFICO, INOLTRE SINERGIZZA CON IGF1 NEL FOSFORILARE TALI PROTEINE.**



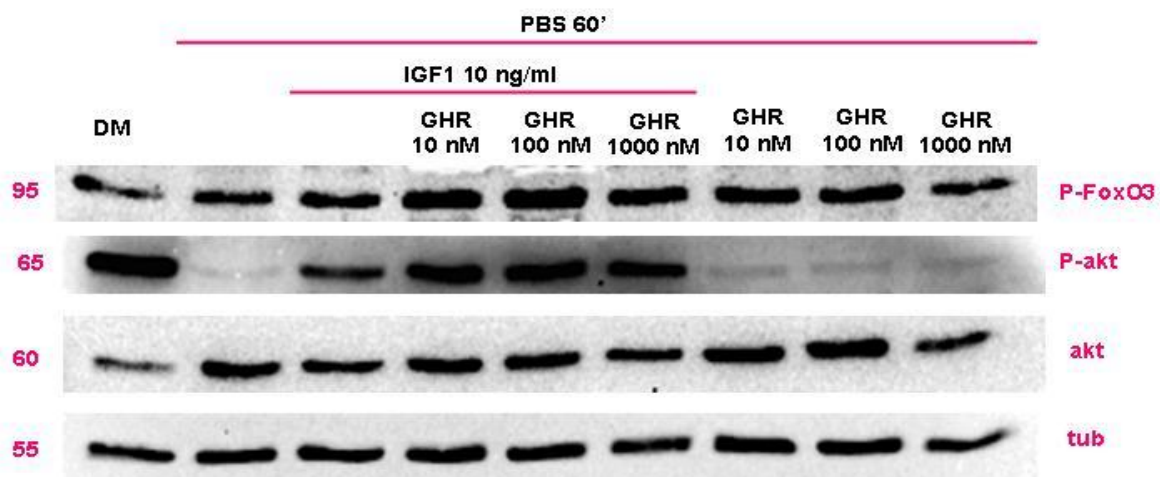
Miotubi C2C12 (5-6 giorni in DM) ed L6 (7-8 giorni in DM) sono stati indotti ad andare in atrofia mediante sostituzione del DM con PBS per 60 minuti. In contemporanea sono stati somministrati i trattamenti: DM e IGF1 10 ng/ml sono stati usati come controllo positivo, GHR e des-acyl GHR sono state somministrate a diverse concentrazioni (10, 100 e 1000 nM). Inoltre GHR e des-acyl GHR sono state somministrate insieme all'IGF1 10ng/ml a diverse concentrazioni (10, 100 e 1000 nM), per verificare se vi fosse una sinergia a livello biochimico tra tali molecole.

Al termine dei trattamenti i miotubi sono stati lisati e le proteine ottenute sono state corse su gel di acrilamide. Le membrane risultanti sono state decorate con anticorpi anti P-Akt e anti P-FoxO3; per normalizzare è stato effettuato *stripping* delle medesime membrane che sono state quindi decorate con anticorpo anti Akt e anti tubulina.

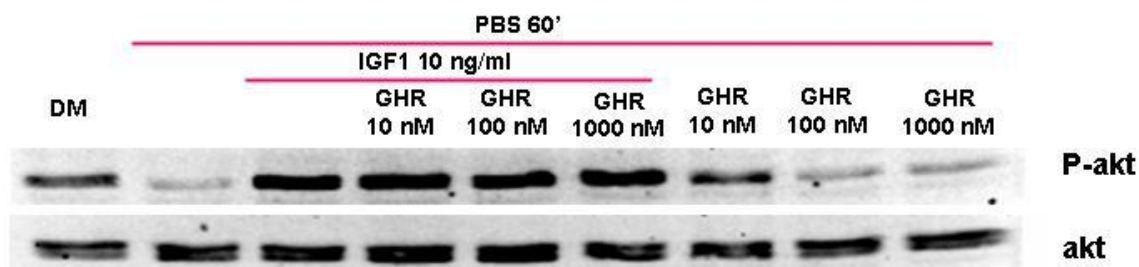
I risultati ottenuti hanno indicato che GHR è in grado di indurre una debole fosforilazione sia di Akt che di FoxO3 a tutte le concentrazioni testate, mentre la des-acyl GHR non ha tali effetti a nessuna concentrazione.

Per quanto riguarda la sinergia con IGF1 risultati ottenuti hanno indicato che la GHR ha un effetto biochimico sinergico con IGF1; è infatti in grado di potenziare la fosforilazione indotta da questo potente fattore di crescita sia nei confronti di Akt che di FoxO3. Al contrario la des-acyl GHR non esercita il medesimo effetto sinergico in nessuna delle condizioni testate.

Le figure 6 e 7 mostrano due esperimenti condotti in miotubi C2C12 ed L6, rispettivamente.



**Figura 6:** Analisi in Western Blot della fosforilazione di FoxO3 e Akt in risposta a GHR o a GHR addizionata ad IGF1 di miotubi C2C12 indotti ad andare in atrofia mediante sostituzione del DM con PBS per 60 minuti.



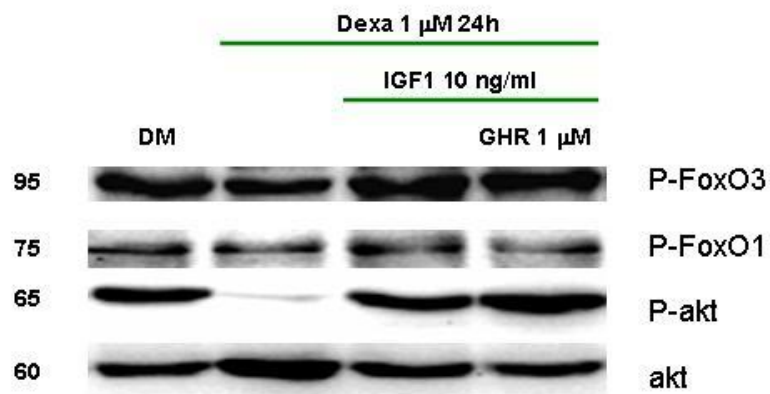
**Figura 7:** Analisi in Western Blot della fosforilazione di Akt in risposta a GHR o a GHR addizionata ad IGF1 di miotubi L6 indotti ad andare in atrofia mediante sostituzione del DM con PBS per 60 minuti.

### **GHRELINA NON POTENZIA LA FOSFORILAZIONE DI GSK3 $\beta$ E p70s6K IN MIOTUBI C2C12 SOTTOPOSTI A STIMOLO ATROFICO INDOTTA DA IGF1**

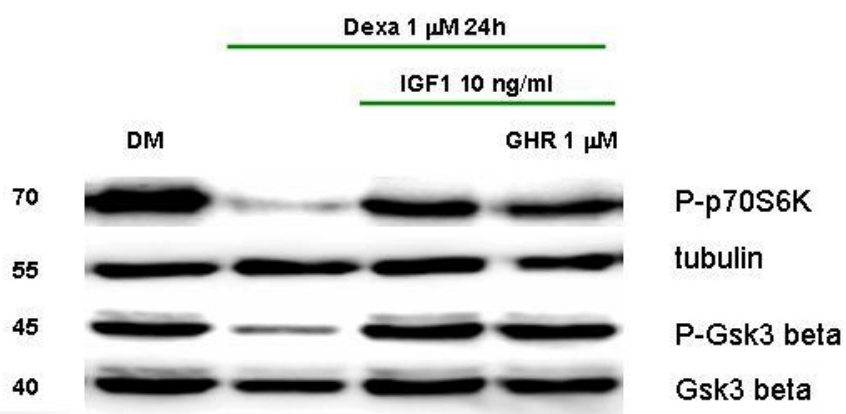
Utilizzando gli stessi lisati di miotubi C2C12 degli esperimenti descritti nel paragrafo precedente siamo andati a valutare se GHR sinergizzasse con IGF1 nell'indurre fosforilazione di FoxO1, Gsk3 $\beta$  e p70s6k. Sui medesimi lisati è stata nuovamente verificato l'aumento di fosforilazione di FoxO3 e Akt.

I risultati da noi ottenuti indicano che la GHR non ha alcuna influenza sul livello di fosforilazione di tali proteine, suggerendo che, sebbene Akt e FoxO3 ne siano influenzati, la via di segnalazione attivata a valle di Akt deve essere differente e che non tutti i fattori FoxO sono coinvolti nel medesimo modo (figura 8) .

L'osservazione della mancata fosforilazione di Gsk3 $\beta$  e p70s6k (figura 9) è coerente con precedenti osservazioni condotte nel nostro laboratorio che dimostravano chiaramente che la GHR non era in grado di indurre ipertrofia dei miotubi, al contrario di IGF1.



**Figura 8:** Analisi in Western Blot della fosforilazione di FoxO3, FoxO e Akt indotta in miotubi C2C12 in atrofia da dexametasone 1 µM per 24 ore; la fosforilazione di entrambe le proteine viene potenziata dalla sinergia tra IGF1 e GHR 1 µM.



**Figura 9:** Analisi in Western Blot della fosforilazione di p70s6k e Gsk3b indotta da IGF1 in miotubi C2C12 in atrofia da dexametasone; tale fosforilazione non viene potenziata dal contemporaneo trattamento con GHR 1  $\mu$ M.

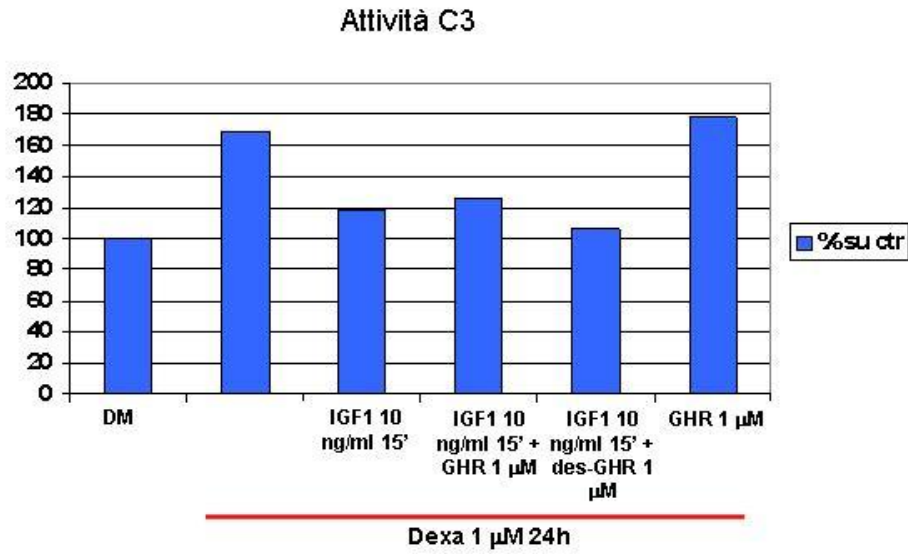
**GHRELINA NON INIBISCE L'ATTIVITA' DELLA CASPASI 3 IN MIOTUBI C2C12 IN SEGUITO A STIMOLO ATROFICO O APOPTOTICO (in collaborazione con il Dr. Massimo Ferretti)**

Dal momento che l'attivazione delle caspasi è una tappa precoce dell'atrofia massiva in cellule muscolari, ci siamo chiesti se GHR e des-acyl GHR fossero in grado di inibire questa prima fase, indispensabile per ottenere i frammenti proteici da coniugare all'ubiquitina per il processamento da parte del proteasoma.

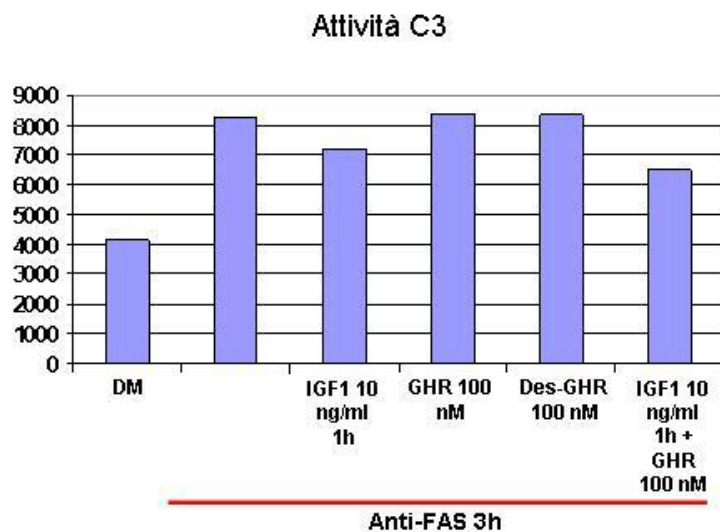
Per verificare questa ipotesi abbiamo indotto atrofia in miotubi C2C12 mediante trattamento con dexametasone, sostituzione del terreno con PBS e stimolazione di FAS con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale agonista (Apo 1/3, Alexis).

Abbiamo verificato che trattamento con dexametasone, attivazione di FAS , ma non PBS, erano in grado di attivare la caspasi 3; inoltre abbiamo verificato che IGF1 è in grado di inibire tale attivazione in miotubi trattati con dexametasone in modo efficace, molto più scarsamente in miotubi trattati con FAS-L. Sia di per sé che in sinergia con IGF 1 GHR e Des-acyl GHR non sono in grado di inibire l'attività C3.

Dunque l'inibizione dell'atrofia da parte di GHR non avviene nelle fasi precoci del danno, bensì in una fase più tardiva.



**Figura 10:** analisi dell'attività C3 mediante test fluorimetrico (MBL) in miotubi C2C12 sottoposti a trattamento con dexametasone; l'IGF1 è in grado di inibire tale attivazione, la presenza di GHR o des-GHR non potenziano l'inibizione dovuta ad IGF1 e la GHR da sola non ha alcun affetto.



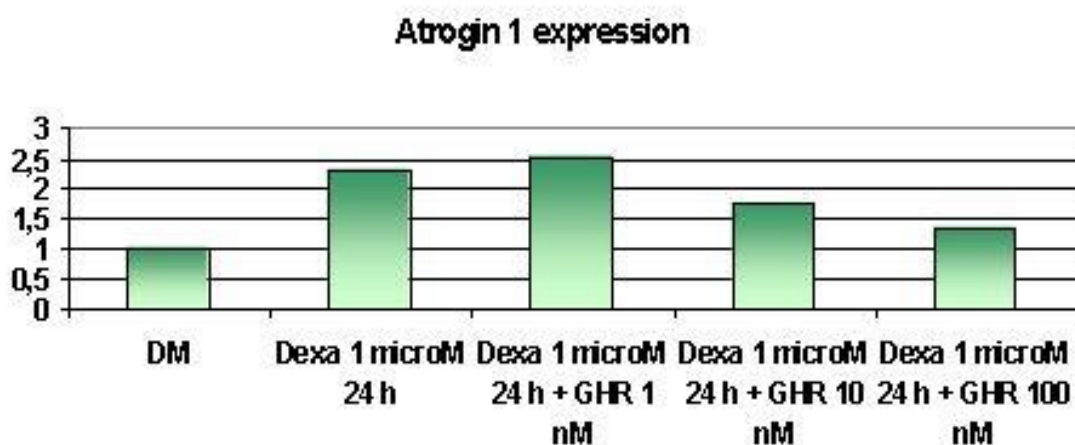
**Figura 11:** analisi dell'attività C3 mediante test fluorimetrico (MBL) in miotubi C2C12 sottoposti a trattamento con anticorpo monoclonale Apo 1/3. L'IGF1 è scarsamente in grado di inibire tale attivazione, la presenza di GHR o des-GHR non hanno alcun effetto e GHR non sembra potenziare lo scarso effetto di IGF1.

### **L'ESPRESSIONE DI ATROGIN 1 IN MIOTUBI C2C12 SOTTOPOSTI A STIMOLO ATROFICO VIENE RIDOTTA IN MODO DOSE-DIPENDENTE DA GHRELINA**

Abbiamo valutato la capacità di GHR e des-acyl GHR nel ridurre l'espressione di atrogin in miotubi C2C12 indotti in atrofia. Abbiamo condotto esperimenti in Real Time PCR con dei primer specifici per Atrogin1, FoxO1 e FoxO3.

Nelle nostre condizioni sperimentali, tuttavia, l'espressione di FoxO3 o di FoxO1 non risultava correlata con l'insorgere dell'atrofia.

Abbiamo dunque concentrato la nostra attenzione sull'analisi del trascritto di Atrogin 1 e abbiamo riscontrato che GHR, ma non des-acyl GHR, è in grado di ridurre l'espressione di tale trascritto in modo dose dipendente. Infatti, non si osserva una riduzione del trascritto di Atrogin 1 in cellule trattate con dexametasone in presenza di GHR 1 nM; aumentando la concentrazione a 10 nM si osserva una sensibile riduzione e il trattamento con GHR 100 nM è in grado di portare l'espressione ad un livello comparabile con quello dell cellule trattate con DM fresco, non sottoposte allo stimolo atrofico.



**Figura 12:** Un esperimento rappresentativo in Real Time PCR mostra che GHR, ma non des-acyl GHR, è in grado di ridurre l'espressione di Atrogin1 in modo dose-dipendente.

## **TOPO TRANSGENICO OVER-ESPRIMENTE GHR NEL CUORE E TOPO TRANSGENICO OVER-ESPRIMENTE GHR NEL MUSCOLO SCHELETRICO.**

Per quanto riguarda il topo transgenico esprime ghrelina in modo cuore-specifico, siamo arrivati ad ottenere le coppie di omozigoti di 3 diverse linee.

Il costrutto per il topo transgenico esprime GHR -ma non obestatina- nel muscolo scheletrico è stato recentemente microiniettato in ovociti e i figli delle madri in cui è stato effettuato il reimpianto devono essere analizzati per PCR, per verificare la presenza del transgene.

## **DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE**

### **STUDIO DELLA PROTEZIONE DALL'ATROFIA MUSCOLARE DA PARTE DI GHRELINA**

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato che GHR e des-acyl GHR sono in grado di indurre differenziamento e fusione dei mioblasti scheletrici C2C12 (Filigheddu et al, lavoro sottomesso a Mol Biol Cell). I nostri risultati dimostrano che GHR e des-GHR inducono cambiamenti morfologici analoghi a quelli indotti da terreno di differenziamento, promuovono l'espressione di proteine del differenziamento e inoltre inducono fusione dei mioblasti.

Considerata l'importanza dei meccanismi di differenziamento in seguito a danno del muscolo scheletrico, ci siamo proposti di valutare l'eventuale efficacia di GHR e des-GHR nel proteggere il muscolo scheletrico da processi atrofizzanti, proponendo dunque

tali molecole come potenziali strumenti per proteggere il muscolo danneggiato, sia a protezione delle fibre esistenti (inibizione dell'atrofia) sia in quanto promotrici della generazione di nuove fibre (induzione del differenziamento)

L'atrofia è stata indotta in un modello sperimentale *in vitro*, utilizzando miotubi ottenuti da mioblasti C2C12 (topo) o L6 (ratto) sostituendo il terreno di differenziamento con del PBS per tempi diversi o mediante trattamento con dexametasone.

Per valutare l'effetto biologico di GHR e des-acyl GHR sui miotubi abbiamo utilizzato sia un metodo qualitativo (osservazione della morfologia al microscopio) sia quantitativo (misura dei diametri in seguito ai diversi trattamenti).

Abbiamo osservato che la GHR, ma non la des-acyl GHR, è in grado di inibire l'induzione dell'atrofia, indipendentemente dallo stimolo atrofizzante utilizzato. Morfologicamente, infatti, le cellule trattate con la GHR mostrano un ridotto grado di alterazione (numero di miotubi, adiacenza, numero di nuclei, aspetto generale). Per quanto riguarda i diametri, il trattamento con GHR riesce a perseverarne le dimensioni a fronte dello stimolo atrofico. È stato dimostrato che la protezione da atrofia dei miotubi scheletrici *in vitro* da fattori quali l'IGF1 è mediata dalla fosforilazione di Akt che a sua volta porta a fosforilazione dei fattori FoxO, resi incapaci di entrare nel nucleo e promuovere trascrizione di atrogeni ed altri geni rilevanti ai fini dell'instaurarsi del danno da atrofia (Sandri et al, 2004).

Abbiamo quindi verificato se anche la GHR e la des-acyl GHR fossero in grado di influenzare tale via di segnalazione.

I nostri risultati indicano che GHR, ma non des-acyl GHR, come atteso dall'analisi dell'effetto biologico, è in grado di indurre debole fosforilazione di Akt e FoxO3 in miotubi stimolati ad andare in atrofia. Inoltre la GHR è in grado di potenziare il segnale promosso da IGF1.

È interessante notare che la GHR sinergizza con IGF1 nel promuovere fosforilazione di Akt e FoxO3, ma non di FoxO1, Gsk3b e p70s6k. Questo risultato indica che, sebbene gli effetti di IGF1 e GHR vadano nella stessa direzione (promozione di atrofia, la via di segnalazione a valle di Akt è differente. Questa considerazione è confermata anche dalla nostra precedente osservazione che GHR, a differenza di IGF1 non promuove ipertrofia dei miotubi. L'ipertrofia, infatti, è mediata dalla via di segnalazione che passa per Gsk3b e p70s6k-mTOR.

Per verificare che la GHR fosse in grado di inibire l'atrofia anche a livello molecolare, abbiamo analizzato l'espressione di atrogeni, promossa dai fattori FoxO in corso di atrofia.



In letteratura è riportato che il fattore FoxO maggiormente coinvolto nella promozione della trascrizione di atrogin è FoxO3, a sua volta un atrogene.

Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo osservato che la GHR (e, di nuovo, non la sua forma de-acilata) è in grado di ridurre l'espressione di atrogin 1 in modo dose dipendente, indicando un effetto specifico della molecola.

Altri atrogin presi in considerazione, gli stessi FoxO1 e FoxO3, invece, non risultavano modulati nelle condizioni da noi osservate.

Inoltre abbiamo deciso di verificare se gli effetti di GHR potessero essere evidenti anche in fasi precoci del danno atrofico, in particolare nella fase di attivazione delle caspasi.

Abbiamo preso in considerazione l'attivazione della caspasi 3 in miotubi in risposta a dexametasone, PBS o attivazione di FAS. I risultati da noi ottenuti indicano che GHR non è in grado di proteggere i miotubi dall'iniziale attivazione di caspasi 3.

L'insieme dei nostri dati indica dunque che la GHR, ma non la des-acyl GHR, è un fattore potenzialmente rilevante per proteggere miotubi che vadano incontro a processi atrofici.

Questo dato, combinato con il fatto che GHR è in grado anche di indurre differenziamento e fusione di mioblasti, è estremamente rilevante, in quanto ci permette di annoverare la GHR tra quelle molecole che globalmente proteggono in muscolo dal danno, mentre il danno è in corso e a danno avvenuto.

Per quanto riguarda la prosecuzione del lavoro sarà certamente necessario migliorare la qualità dei dati ottenuti per poi sottoporli a pubblicazione.

Il fatto che la des-acyl GHR non abbia i medesimi effetti della GHR ci ha sorpreso, dal momento che tale peptide è invece capace, tanto quanto la GHR, di indurre differenziamento e fusione dei mioblasti da cui sono stati ottenuti i miotubi utilizzati in questo studio. La possibile spiegazione è che per esercitare l'effetto anti-atrofico l'acilazione sia necessaria e che i miotubi non abbiano l'acilasi responsabile per tale modificazione post-traduzionale, o non abbiano a disposizione l'acido grasso necessario (octanoico).

Tuttavia, abbiamo verificato che né i mioblasti né i miotubi C2C12 esprimono il recettore noto per la GHR, il GHS-R1a. La nostra ipotesi è dunque che sui miotubi sia presente un differente recettore che promuova l'inibizione di atrofia.

Per proseguire l'analisi degli effetti di GHR e des-acyl GHR sul muscolo scheletrico abbiamo deciso di andare ad analizzarne l'effetto sulle cellule satellite, le cellule staminali del muscolo scheletrico.

Sulla scia degli esperimenti condotti fino a questo momento ed ai risultati ottenuti la nostra ipotesi è che GHR ne stimoli l'attivazione e il differenziamento *in vivo*.

Gli esperimenti sulle cellule satellite verranno da me condotti presso il laboratorio del Professor Peter Zammit, al King's College, London, nel corso dell'anno a venire.

## **TOPI TRANSGENICI**

Stiamo cercando di ottenere due diverse linee di topi transgenici over-esprimenti ghrelina, l'una ad espressione cuore specifica, l'altra ad espressione muscolo scheletrico-specifica.

Per quanto riguarda il topo transgenico ad espressione cuore-specifica siamo arrivati ad ottenere le coppie di omozigoti per la progenie di tre diversi topi fondatori. Una volta ottenute le linee omozigote, sarà possibile procedere con gli esperimenti, confrontando la risposta al danno cardiaco tra i topi transgenici ed i *wild type*.

Il danno cardiaco verrà indotto mediante somministrazione del chemioterapico cardiотossico doxorubicina; verranno misurate la sopravvivenza (esperimenti a lungo termine) e la morfologia del cuore stesso (esperimenti a breve termine).

Per lo studio della morfologia si analizzeranno parametri quali dimensioni del cuore, peso del cuore su peso corporeo totale, livelli di espressione cardiaca di ghrelina, livelli di espressione di marker apoptotici, forma e dimensione delle singole miofibre, analisi del contenuto proteico.

Avendo dimostrato nel nostro laboratorio che GHR e des-GHR sono in grado di inibire apoptosi di cardiomiociti e cellule endoteliali *in vitro* (Baldanzi et al, JCB, 2002) ed essendo disponibile un'intensa letteratura che correla la GHR con un miglioramento dei parametri cardiaci *in vivo* (Chang et al. *J. Cardiovasc. Pharmac.* 2004, Nagaya et al. *Circulation* 2001, Nagaya and Kangawa, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003).

La nostra ipotesi è che l'over-espressione di ghrelina a livello cardiaco conferisca un vantaggio in termini di capacità di risposta al danno cardiaco ai topi transgenici.

Per quanto riguarda il topo transgenico over-esprimente ghrelina nel muscolo scheletrico, invece, abbiamo adottato una strategia sperimentale leggermente diversa, per evitare di far esprimere insieme alla ghrelina anche l'obestatina.

Dopo aver individuato i topi fondatori ed aver ottenuto le linee di omozigoti transgenici dovremo verificare che la nostra manipolazione del DNA, con inserzione di un codone di

stop in luogo di un acido glutamico a valle di ghrelina non alteri la produzione della proteina matura.

Una volta effettuate le necessarie verifiche, procederemo ad analizzare le risposte dei topi transgenici a confronto con topi wild type in risposta a differenti danni muscolari; prevediamo anche di incrociare i topi transgenici con altri topi geneticamente predisposti a degenerazione muscolare (ad esempio topi *Mdx*) per analizzare la capacità della ghrelina nel contrastare la degenerazione stessa.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

*Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1-2 and PI 3-kinase-AKT. Journal of Cell Biology 159 (2002) 1029-1037.*

*Bednareck MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. J. Med. Chem. 43 (2001) 4370-4376.*

*Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K.M., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K., Pan Z.Q., Valenzuela D.M., De Chiara J.M., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass R.J.* **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** *Science* 249 (2001).

*Cao PR, Kim HJ, Lecker SH.* **Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) 2088-2097

*Cassoni P, Ghè C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G.* **Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasm and related cell lines.** *European J. of Endocrinology* 150 (2004) 173-184.

*Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Jang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C.* **Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43 (2004) 165-70.

*Filigheddu N, Fubini A, Baldanzi G, Cutrupi S, Ghe C, Catapano F, Broglio F, Bosia A, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E, Deghenghi R, Graziani A.* **Hexarelin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death.** *Endocrine* 14 (2001) 113-119.

*Glass DJ.* **Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) 1974-1984

*Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW.* **GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin.** *Endocrinology.* 2006 Sep 7; [Epub ahead of print]

*Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H and Kangawa K.* **Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.** *Nature* 402 (1999) 656-660.

*Lecker S.H., Jagoe R.T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S.R., Mitch W.E., Goldberg A.L.* **Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression.** *The FASEB Journal* 18 (2004).

*Léger B, Vergani L, Soraru G, Hespel P, Derave W, C. G, D'Ascenzio C, Angelini C and Russell AP.* **Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1.** *Faseb J* 20 (2006) 583-585.

*Li BG, Hasselgren PO, Fang CH.* **Insulin-like growth factor-1 inhibits dexamethasone-induced proteolysis in cultured L6 myotubes through PI3K/Akt/GSK3b and PI3K/Akt/mTOR-dependent mechanisms.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) 2207-2216

*Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F, Torsello A, De Gennaro Colonna V, Bernareggi M, Deghenghi R, Muller EE, Berti F.* **Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat.** *Endocrinology* 140 (1999) 4024-4031.

*Nader GA.* **Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) 1985-1996

*Nagaya N and Kangawa K.* **Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure.** *Current Opinions in Pharmacology* 2 (2003) 146-151

*Nagaya N, Uematsu M, Kojima K, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K.* **Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure.** *Circulation* 104 (2001) 1430-1435.

*Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M.* **Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway.** *European J. of Endocrinology* 151 (2004) 233-240.

*Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Gao Yd, Schleim KD, Yang L, Morriello GJ, Nargund R, Patchett AA, Howard AD, Smith RG.* **Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from pufferfish to humans.** *Molecular Endocrinology* 14 (2000) 160-169.

*Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L.* **FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** *Cell* 117 (2004) 399-412.

*Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ.* **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Molecular Cell*, vol. 14 (2004) 395-403

*Thompson A, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson I, Wells T.* **Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of GHS-R1a.** *Endocrinology* 145 (2004) 4859-4867.

*Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ.* **Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake.** *Science* 310 (2005) 996-9.

## ARTICOLI PUBBLICATI

[Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, \*\*Gnocchi V\*\*, Fiaccavento R, Carotenuto F, De Vito P, Baldini PM, Prat M, Di Nardo P.](#) Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration and Differentiation. *Stem Cells*. 2006 Jan;24(1):23-33. Epub 2005 Aug 11

## ARTICOLI SOTTOMESSI

*Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, **Gnocchi V**, Loggia E, Notario M, Filigheddu N, Van B, Parolini O, Bussolino F, Sinigaglia F, Graziani A.* and membrane recruitment of alpha-Dgk by Src-mediated phosphorylation of tyrosine 335 are necessary and sufficient for cell motility. Activation  
[submitted to *Oncogene*]

*Filigheddu N, **Gnocchi VF**, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, Crepaldi T, Ponzetto C, Fubini A, Sinigaglia F and Graziani A.* Ghrelin and Des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells.  
[submitted to *Mol Biol Cell*]

*Cutrupi S, Chianale F, Baldanzi G, Rainero E, Porporato PE, Filigheddu N, **Gnocchi V**, Traini S, Panico-Guercia R, Parolini O, Santoro M, Sinigaglia F and Graziani A.* Dgk $\alpha$  mediates HGF- and v-Src induced cell scattering by regulating Rac activation and Paxillin localization  
[submitted to *Mol Cel Biol*]

## CONGRESSI E WORKSHOP

FISV 2006, Riva del Garda, 28 settembre-1 ottobre 2006

CNB9: 9<sup>th</sup> National Biotechnology Congress, Torino, 7-9 settembre 2006

Proteine 2006, Novara, 1-3 giugno 2006

Third workshop of working units on Cardiovascular Research, Torino 24-25 marzo 2006

## **ABSTRACT**

Congresso SIB 2006 – Riccione, 28-30 settembre 2006.

*Baldanzi G, Santina C, Chianale F, Porporato P, **Gnocchi V**, Brignoli G, Sinigaglia F, Graziani A, Traini S, Filigheddu N.* Diacylglycerol Kinase alpha regulates Rac activation and Hgf invasion

CNB9: 9<sup>th</sup> National Biotechnology Congress, Torino, september 7-9, 2006

***Gnocchi V**, Filigheddu N, Coscia M, Badà L, Sottini F, Traini S, Porporato P, Chianale F, Brignoli G, Baldanzi G, Taulli R, Crepaldi T, Sinigaglia F and Graziani A.* Ghrelin induces differentiation and fusion of C2C12 myoblasts and protects myotubes from atrophy

CNB9: 9<sup>th</sup> National Biotechnology Congress, Torino, september 7-9, 2006

*Chianale F, Deantonio C, Baldanzi G, Gaggianesi M, Cutrupi S, **Gnocchi V**, Porporato P, Traini S and Graziani A.* Dgk-alpha regulates HGF-induced cell motility through Rac.

Proteine 2006, Novara, June 1-3 2006

***Gnocchi V**, Filigheddu N, Badà L, Sottini F, Traini S, Chianale F, Brignoli G, Cutrupi S, Baldanzi G, Porporato P, Taulli R, Ponzetto C, Crepaldi T and Graziani A.* Ghrelin activity on cardio-vascular systems: an in vitro study and in vivo perspectives.

Proteine 2006, Novara, June 1-3 2006

*Baldanzi G, Pagnozzi D, Cutrupi, Chianale F, **Gnocchi V**, Filigheddu N, Parolini O, Sinigaglia F, Pucci P and Graziani A.* Dgk-alpha phosphorylation by Src is required for activation, membrane recruitment and HGF induced cell motility.

Proteine 2006, Novara, June 1-3 2006



*Chianale F, Cutrupi S, Rainero E, Deantonio C, Sampietro S, Porporato P, **Gnocchi V**, Traini S, Brignoli G and Graziani A.* Dgk-alpha regulates HGF and v-Src-induced cell motility through Paxillin and Rac.

Gordon Conference "Growth Factor Signaling" – Connecticut College, New London, CT (USA), 16-21 luglio 2006.

*Baldanzi G, Chianale F, Porporato P, Rainero E, Traini S, Deantonio C, Gaggianesi M, **Gnocchi VF**, Graziani A.* Src-mediated phosphorylation of Dgk- $\alpha$  on tyrosine 335 is required for its activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility.

FEBS Special Meeting – Cellular Signaling - Dubrovnik (Croatia), May 26 - June 1 2006  
*Porporato PE, Chianale F, **Gnocchi VF**, Baldanzi G, Cutrupi S, Brignoli G, Traini S and Graziani A.* sh-RNA to study the role of diacylglycerol kinase alpha in tumorigenesis

## **SEMINARI FREQUENTATI NELL'AMBITO DELLA SCUOLA DI DOTTORATO AA 2005/2006**

**Dott. O. Parolini:** Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion. 12 settembre 2005

**Dott. S. Ellis:** Functions of ribosomal protein S19: implications for Diamond Blackfan Anemia. 13 settembre 2005

**Prof. Paolo Gasparini:** Genetica della sordità. 18 ottobre 2005

**Dott. Diego Cotella:** Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. 18 novembre 2005

**Prof. Adinolfi:** HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications. 22 novembre 2005

**Prof. Robert Tjian:** Mechanisms of Transcriptional Regulation and Disease. 25 novembre 2005.

**Dott.ssa Maria Grano:** Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. 19 gennaio 2006.

**Prof. Daniele Sblattero:** Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. 15 febbraio 2006

**Dott.ssa Antonia Follenzi:** Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. 13 marzo 2006

**Prof. Mikael Knip:** The natural course of preclinical type 1 diabetes. 20 marzo 2006.

**Dott. Francesco Forconi:** Aspetti immunogenici e terapeutici della hairy cell leukemia. 6 aprile 2006

**Dott. Daniela Cilloni:** Terapie molecolari delle malattie mieloproliferative. 20 aprile 2006.

**Prof. Vickie E. Baracos:** Strategies to maintain oral food intake in patients with advanced malignant disease: success and failures. 15 maggio 2006

**Prof. Marco Lenzi:** L'epatite autoimmune. 18 maggio 2006

**Dott.ssa Marialuisa Lavitrano:** Sperm Mediated Gene Transfer: Storia e Applicazioni. 30 maggio 2006.

**Prof. Guido Tarone:** Melusin: a Stretch Sensor Molecule Controlling Adaptive Cardiac Remodeling to Pressure Overload. 15 giugno 2006.

**Prof. Pierluigi Toniutto:** Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato. 22 giugno 2006

**Prof.ssa Lia Rimondini:** Osteointegrazione e superfici implantari. 27 giugno 2006.

**Dott.ssa Renata Grifantini:** DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design. 5 luglio 2006

**Dr. Pantaleo Giannuzzi:** L'approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolari. 13 luglio 2006