

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XIX***

Relazione 4° anno

TITOLO:

**DALLE LINEE CELLULARI ALLE COLTURE
PRIMARIE: UN ANNO DI ESPERIENZA ALL'ESTERO
PER STUDIARE LE SATELLITE DEL MUSCOLO
SCHELETRICO**

Candidata: Viola Felicita Gnocchi

Tutor: Prof. Andrea Graziani

INTRODUZIONE	p. 2
<ul style="list-style-type: none">• Ghrelina• Effetti cardiaci di ghrelina• Effetti di ghrelina sul muscolo scheletrico <p><i>Risultati sulla linea cellulare C2C12</i></p> <p><i>Il progetto "atrofia"</i></p> <p><i>Fibre muscolari e cellule satellite</i></p>	
SCOPO DEL LAVORO	p. 8
MATERIALI E METODI	p. 9
<ul style="list-style-type: none">• Isolamento delle singole fibre muscolari• Coltura delle singole fibre• Isolamento delle satellite dalle singole fibre e coltura• Immuno-decorazione ed analisi al microscopio a fluorescenza	
RISULTATI	p. 12
<ul style="list-style-type: none">• Apprendimento e messa a punto della tecnica per isolare ed analizzare le singole fibre muscolari• Effetti di GHR e des-acyl GHR su cellule satellite associate a singole fibre mantenute in terreno completo• Effetti di GHR e des-acyl GHR su cellule satellite associate a singole fibre mantenute in terreno sub-ottimale (nutrienti ridotti)• Analisi di nuovi marcatori per le cellule satellite	
DISCUSSIONE	p. 17
BIBLIOGRAFIA	p. 21
PUBBLICAZIONI	p. 24
CONGRESSI E WORKSHOP	p.25
SEMINARI	p. 25

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, 1999*), la cui sequenza è altamente conservata presso tutte le specie in cui a tutt'oggi è stato clonato (*Palyha et al, 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, 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 recettore accoppiato a proteina G orfano. Recentemente, tuttavia, un diverso gruppo di lavoro ha confutato il legame a tale recettore (*Holst et al, 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, 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, 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, 2004*), inibizione della proliferazione in cellule tumorali prostatiche umane DU145 (*Cassoni et al, 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, 2001*) e cardioprotezione *in vivo* (*Locatelli et al, 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, 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, 2001*) e dal danno da ischemia/riperfusionazione (*Chang et al, 2004*) nonché il miglioramento dei parametri

cardiaci in corso di insufficienza cardiaca (*Nagaya et al, 2001; Nagaya and Kangawa, 2003*).

Nel corso dei miei precedenti anni di Dottorato, uno dei principali scopi della mia ricerca nel laboratorio del Prof. Andrea Graziani e' stato la messa a punto di un sistema che consentisse l'analisi approfondita degli effetti di ghrelina sul cuore *in vivo* (si vedano relazioni del II e III anno). A tal fine mi sono occupata della produzione di una linea di topi transgenici sovra-esprimenti ghrelina sotto il controllo di un promotore cuore-specifico. A circa due anni di distanza dalla fase di progettazione, produzione del vettore per l'espressione cuore-specifica e microiniezione in ovocita, abbiamo ottenuto 3 diverse linee transgeniche stabili, la cui analisi e' in corso.

EFFETTI DI GHRELINA SUL MUSCOLO SCHELETRICO

Risultati sulla linea cellulare C2C12

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 (mioblasti) 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 recentemente dimostrato che sia GHR che des-acyl GHR sono in grado di indurre differenziamento e fusione dei mioblasti scheletrici C2C12 (*Filigheddu et al, 2007*).

GHR e des-acyl 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 e fusione ha confermato l'attività pro-differenziativa sia di GHR che di des-acyl GHR.

Il progetto “atrofia”

Considerata l'importanza dei meccanismi di differenziamento in seguito a danno del muscolo scheletrico, abbiamo deciso di valutare l'eventuale efficacia di GHR e des-acyl 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'avvio del progetto dello studio di GHR e des-acyl GHR come agenti anti-atrofizzanti è stato uno dei principali obiettivi della mia ricerca nel corso del III anno di Dottorato (si veda relazione di fine anno, settembre 2006). I risultati preliminari da me ottenuti hanno suggerito che sia GHR che des-acyl GHR possano in effetti agire come fattori anti-atrofizzanti, essendo in grado di preservare i diametri e la morfologia dei miotubi ottenuti da mioblasti C2C12 in un modello di atrofia indotta *in vitro*.

Il meccanismo molecolare tramite il quale GHR e des-acyl GHR sono in grado di inibire l'instaurarsi del processo atrofico sembrerebbe passare attraverso la via di segnalazione di Akt e dei fattori FoxO (*Sandri et al, 2004*).

L'analisi dell'attività anti-atrofica di GHR e des-acyl GHR è tutt'ora in corso di svolgimento nel laboratorio del Prof. Andrea Graziani, e il mio attuale ruolo è di supervisione a distanza.

Stiamo inoltre conducendo un'analisi dell'attività anti-atrofica di GHR *in vivo* con la collaborazione della Prof. Perroteau e del Dr. Geuna, Università degli Studi di Torino.

Fibre muscolari e cellule satellite

Una volta pubblicati i risultati sull'abilità di GHR e des-acyl GHR nell'indurre differenziamento e fusione di cellule C2C12, abbiamo pensato che il passo successivo dovesse essere l'analisi dell'eventuale capacità di tali molecole nell'indurre differenziamento in un sistema più fisiologico, ovvero le cellule satellite.

Le cellule satellite sono le principali cellule staminali del muscolo scheletrico (*Cossu e Biressi, 2005*). Individuate nel 1961 da Mauro, le cellule satellite sono state così denominate per la posizione periferica che occupano nella fibra muscolare, subito al di sotto della lamina basale che isola la fibra stessa, costituita da centinaia di mionuclei post-mitotici.

Normalmente quiescenti nell'adulto, le cellule satellite possono essere attivate all'occorrenza e, in risposta ad opportuno stimolo, rientrare in ciclo, proliferare, differenziare e infine fondere, tra loro o con fibre pre-esistenti, per riparare un danno muscolare o accrescere il numero di fibre. Le cellule satellite sono inoltre in grado di auto-rigenerare precursori indifferenziati che tornano allo stato quiescente, pronti a rispondere ad un nuovo stimolo attivante (*Zammit et al, 2004*), caratteristica che le rende a tutti gli effetti classificabili come cellule staminali.

A livello molecolare, le cellule satellite quiescenti esprimono il caratteristico fattore di trascrizione Pax7 (*Seale et al, 2000*); una volta attivate esprimono in tempi molto rapidi (circa 6 ore) il fattore di trascrizione MyoD e, a tempi più tardivi, miogenina. Per un certo lasso di tempo in seguito ad attivazione, MyoD e Pax7 risultano co-espressi, poi le cellule adottano destini differenti: in circa l'80% di esse Pax7 viene represso mentre MyoD continua ad essere espresso (rapidamente seguito da miogenina e infine dalle catene pesante e leggera della miosina); nel restante 20% circa, è MyoD ad essere represso, mentre Pax7 persiste: saranno queste cellule a tornare quiescenti e ricostituire il "pool" di cellule satellite riserva.

Per analizzare l'attività di GHR e des-acyl GHR sulle cellule satellite e al contempo incrementare la mia esperienza di ricerca con un soggiorno presso un laboratorio estero, ho deciso di trascorrere il mio quarto anno di Dottorato presso il laboratorio del Dr. Peter Zammit, al King's College di Londra (UK).

Nel laboratorio del Dr. Zammit l'isolamento di singole fibre muscolari con le proprie cellule satellite associate è pratica corrente. Tale tecnica consente di isolare un elevato numero di fibre muscolari a partire da diversi muscoli (usualmente di topo o ratto), mantenerle in coltura per tempi variabili (fino a 5-6 giorni) ed indurre le cellule staminali ad esse associate ad attivarsi (*Rosenblatt et al, 1995*).

L'isolamento di singole fibre è particolarmente utile poiché consente di analizzare le cellule satellite nel proprio micro-ambiente inalterato, la nicchia spaziale e molecolare nella quale si trovano quando associate alla propria fibra; consente inoltre la semplice manipolazione del terreno di coltura nel quale vengono mantenute, permettendo di valutare gli effetti di singoli fattori.

Oltre ad apprendere la tecnica per l'isolamento delle singole fibre muscolari e a valutare gli effetti di GHR e des-acyl GHR in tale sistema, nel laboratorio del Dr. Zammit sono stata coinvolta in altri progetti riguardanti le cellule satellite.

In particolare, mi sono occupata di caratterizzare una serie di nuovi marcatori per le cellule satellite, validando così nuovi strumenti che saranno utili per proseguire gli studi in questo campo.

SCOPO DEL LAVORO

Gli scopi principali della mia ricerca durante il quarto anno di Dottorato, svolto presso il laboratorio del Dr. Zammit al King's College di Londra (UK), sono stati:

i) imparare ad isolare ed analizzare le singole fibre muscolari e le cellule satellite da esse ottenute;

ii) valutare gli eventuali effetti di GHR e des-acyl GHR su proliferazione e differenziamento delle cellule satellite associate con le singole fibre;

iii) approfondire la mia esperienza in campo muscolare - e delle cellule satellite in particolare - seguendo ulteriori progetti nel laboratorio ospite.

MATERIALI E METODI

ISOLAMENTO DELLE SINGOLE FIBRE MUSCOLARI

I muscoli per le nostre indagini sono stati ottenuti da topi C57/BL10 maschi, di età compresa tra le 8 e le 12 settimane, sacrificati mediante dislocazione cervicale.

La maggior parte degli studi è stata condotta su muscolo EDL (extensor digitorum longus) della zampa posteriore. Tuttavia, la medesima tecnica di isolamento è stata applicata con successo, con piccole modifiche, anche su TA (tibialis anteriore), soleo, diaframma e massetere (il principale muscolo della guancia).

Per rimuovere l'EDL è necessario tagliare i tendini inferiori e superiori evitando di toccare o tirare eccessivamente il muscolo stesso, dal momento che questo provocherebbe ipercontrazione delle fibre, rendendole inutilizzabili.

L'intero muscolo una volta isolato è stato digerito con una soluzione di collagenasi di tipo I (Sigma Aldrich) allo 0,2% in DMEM (Gibco, Invitrogen), per circa 90 minuti a 37°C.

Al termine della digestione il muscolo è stato trasferito in terreno DMEM per inattivare l'attività enzimatica della collagenasi. Per le successive operazioni sono state utilizzate piastre PETRI per coltura cellulare, trattate con una soluzione di BSA (albumina bovina, Sigma Aldrich) allo 0,5% in PBS per evitare l'adesione delle fibre stesse alla piastra.

Dopo l'inattivazione della collagenasi, il muscolo è stato trasferito in nuove piastre contenenti DMEM e si è proceduto gentilmente all'isolamento delle singole fibre con l'ausilio di pipette Pasteur dai bordi arrotondati (per evitare di danneggiare la fibra stessa e le satellite).

Al termine dell'isolamento le singole fibre ottenute sono state fissate per procedere direttamente ad analisi oppure coltivate per tempi variabili, fino a 5-6 giorni in opportuno terreno.

COLTURA DELLE SINGOLE FIBRE

Le singole fibre isolate di fresco sono state coltivate a 37°C, 5% CO₂, in un terreno in grado di indurre le satellite associate alla fibra stessa ad attivarsi. Il terreno, definito "*plating medium*" è costituito da una base di DMEM cui sono stati aggiunti il 10% di siero di cavallo e lo 0,5% di CEE (chick embryo extract, estratto di embrione di pollo). Ai fini del mio studio, per valutare gli eventuali effetti di GHR e des-acyl GHR sulla proliferazione e il

differenziamento delle satellite, sono state utilizzate anche concentrazioni di siero inferiori, per mimare una condizione di nutrimento sub-ottimale.

ISOLAMENTO DELLE SATELLITE DALLE SINGOLE FIBRE E COLTURA

Per ottenere le cellule satellite associate alle singole fibre muscolari, le fibre stesse, una volta isolate, sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti precedentemente rivestiti di Matrigel e mantenute in *plating medium*, come precedentemente descritto.

Dopo circa 48-72 ore dalla piastratura su Matrigel è stato possibile rimuovere gentilmente le fibre in ambiente sterile, con l'ausilio di una pipetta Pasteur dai bordi arrotondati: le cellule satellite, infatti, in seguito ad attivazione, tendono a migrare dalla fibra stessa e ad aderire al substrato di Matrigel.

Una volta rimosse le fibre donatrici, le satellite sono state mantenute in terreno proliferante composto da una base di DMEM addizionato di FBS al 20%, siero di cavallo al 10% e CEE (chick embryo extract) all'1%.

Dopo circa 48-72 ore dalla rimozione delle fibre e mantenimento in terreno di proliferazione, le satellite sono state piastrate alla densità voluta e indotte a differenziare riducendo drasticamente la concentrazione di siero e nutrienti nel terreno; per il differenziamento, infatti, è sufficiente il 2% di siero di cavallo.

Trascorsi circa 7 giorni in terreno di differenziamento, le satellite fuse tra loro danno origine a grandi miotubi multinucleati, l'equivalente *in vitro* delle miofibre *in vivo*.

IMMUNO-DECORAZIONE ED ANALISI AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Le singole fibre isolate con le proprie satellite associate sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 10 minuti. Al termine del trattamento sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS. A questo punto le fibre sono state immediatamente sottoposte a decorazione con anticorpi oppure mantenute a 4°C per circa 1-2 mesi.

Per procedere alla decorazione con anticorpi, è necessario un passaggio di permeabilizzazione delle fibre, effettuato mediante trattamento con 0,5% Triton-X100 in PBS per 6 minuti. A seguire, 3 lavaggi con PBS.

Per bloccare i siti di legame aspecifici, sono richiesti circa 30 minuti di incubazione in Carrageenan (Sigma Aldrich) 0,35% in PBS addizionato con 10% siero di capra e 10%

siero di maiale (Dako Cytomation), eccetto nei casi in cui si utilizzi un anticorpo primario prodotto in uno di questi animali.

Gli anticorpi primari sono stati diluiti in Carrageenen 0,35% in PBS e lasciati *over night* a 4°C.

Gli anticorpi utilizzati includono: anti-Pax7 (DSHB), anti-MyoD1 (Dako Cytomation), anti-miogenina (clone F5D, DSHB), anti-caveolina-1 (Santa Cruz), anti-integrina alfa7 (gentile omaggio di un collaboratore), anti-recettore della calcitonina (AbD Serotec), anti-Jagged-1 (Santa Cruz), anti-p21/Cip (DB), anti-p27/kip (BD) e anti-p130 (BD).

Al termine dell'incubazione con anticorpo primario sono stati effettuati 3 lavaggi con 0,5% Tween-20 in PBS ed incubazione con anticorpo secondario, diluito in Carrageenen 0,35% in PBS, per circa 90 minuti al buio. Gli anticorpi secondari coniugati con fluorocromi utilizzati sono stati tutti ottenuti dalla Molecular Probes.

Al termine dell'incubazione con anticorpo secondario sono stati effettuati 3 lavaggi con 0,5% Tween 20 in PBS e le fibre sono state sistemate su vetrino. I vetrini sono stati montati con l'aggiunta di Faramount fluorescent mounting medium (DAKO Cytomation) contenente 100 ng/ml di 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), per la visualizzazione dei nuclei.

La successiva analisi e' stata effettuata con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza (Zeiss)

RISULTATI

APPRENDIMENTO E MESSA A PUNTO DELLA TECNICA PER ISOLARE ED ANALIZZARE LE SINGOLE FIBRE MUSCOLARI

L'apprendimento e la messa a punto della tecnica per isolare le singole fibre muscolari con le satellite ad esse associate sono stati gli obiettivi principali del mio periodo di ricerca presso il laboratorio del Dr. Zammit al King's College di Londra (UK).

Nei primi mesi della mia permanenza ho appreso ad isolare singole fibre da vari muscoli del topo, in particolare dall'EDL (extensor digitorum longus), a mantenerle in coltura, decorarle con anticorpi ed infine analizzarle. La tecnica richiede una certa pratica, che viene raggiunta in pieno in circa un paio di mesi.

Per esercitarmi nella tecnica, ho coltivato fibre muscolari ottenute da differenti muscoli per diversi tempi (0-24-48-72-96 ore) e ho osservato l'andamento nel tempo di marcatori noti, quali Pax7 (espresso dalle satellite quiescenti, viene represso nelle cellule che vanno incontro a differenziamento terminale mentre viene mantenuto dalle cellule che formeranno il nuovo "pool" di riserva), MyoD (uno dei marcatori precoci del differenziamento, viene espresso dalle satellite già a 6 ore dall'attivazione, viene mantenuto ad alti livelli nelle cellule che differenziano terminalmente e nuovamente represso dal "pool" delle riserva), miogenina (marcatore tardivo del differenziamento, la sua espressione ha andamento simile a quella di MyoD, ma con circa 12-24 ore di ritardo; tendenzialmente cellule in cui resti alta l'espressione di Pax7 esprimono bassi o nulli livelli di miogenina).

Durante questa fase preparatoria ho potuto familiarizzare con la tecnica di isolamento ed analisi delle singole fibre, confermando gli andamenti temporali dell'espressione dei marcatori riportati in letteratura e ottimizzando il metodo secondo le mie esigenze sperimentali.

EFFETTI DI GHR E DES-ACYL GHR SU CELLULE SATELLITE ASSOCIATE A SINGOLE FIBRE MANTENUTE IN TERRENO DI COLTURA COMPLETO

Il primo gruppo di esperimenti è stato disegnato per valutare possibili effetti di GHR e des-acyl GHR sulla proliferazione e sul differenziamento delle cellule satellite associate a singola fibra quando aggiunte al *plating medium* completo.

Le fibre, isolate come descritto nei materiali e metodi da muscoli EDL, sono state mantenute in *plating medium* in presenza o assenza di GHR o des-acyl GHR e fissate a diversi tempi (24, 48 e 72 ore). GHR e des-acyl GHR sono state aggiunte a concentrazione 100 nM all'inizio della coltura in *plating medium* e, in un esperimento indipendente, aggiunte nuovamente alla medesima concentrazione dopo 12, 36 e 60 ore dall'inizio della coltura per valutare se un'alta concentrazione iniziale fosse sufficiente ad esercitare un effetto o se alte concentrazioni di ormone fossero necessarie nel terreno di coltura per tempi piu' lunghi. Non sono state osservate differenze tra queste due diverse condizioni.

Le fibre sono state fissate ai diversi tempi, decorate con anticorpi anti-Pax7 e anti-MyoD, osservate e contate al microscopio a fluorescenza, come descritto nei materiali e metodi.

Nelle condizioni sperimentali sopra descritte non abbiamo tuttavia osservato differenze significative nel numero totale di cellule satellite associate a fibra (considerate come somma delle cellule Pax7+ve/MyoD+ve, Pax7-ve/MyoD+ve e Pax7+ve/MyoD-ve) a 24 e 48 ore, mentre abbiamo osservato un lieve aumento, tuttavia non significativo, del numero totale di satellite in presenza di GHR nel terreno di coltura a 72 ore.

Un'osservazione importante è che, mentre il numero totale di cellule satellite è risultato aumentato, le percentuali di cellule dei diversi sottotipi (Pax7+ve/MyoD+ve, Pax7-ve/MyoD+ve e Pax7+ve/MyoD-ve) sono risultate inalterate, ad indicare che la scelta del fato da adottare non è stata influenzata dalla presenza di GHR. Questa osservazione è valida anche per quanto riguarda des-acyl GHR.

EFFETTI DI GHR E DES-ACYL GHR SU CELLULE SATELLITE ASSOCIATE A SINGOLE FIBRE MANTENUTE IN TERRENO DI COLTURA SUB-OTTIMALE (NUTRIENTI RIDOTTI)

Condotti gli esperimenti preliminari in fibre mantenute in terreno di coltura completo, abbiamo deciso di valutare quali potessero essere gli effetti di GHR e des-acyl GHR su cellule satellite associate a fibre muscolari mantenute in terreno di coltura sub-ottimale, ovvero con un ridotto numero di nutrienti.

Il rationale alla base di questo tipo di esperimenti risiede nel fatto che un'eventuale effetto di una molecola aggiunta al terreno di coltura completo possa essere mascherato dall'eccessiva concentrazione di nutrienti presenti.

Abbiamo dunque progressivamente ridotto le concentrazioni di siero di cavallo e CEE al 50%, 25% e infine 10% di quelle presenti nel *plating medium* completo.

Riducendo le concentrazioni di siero al 50% di quelle ottimali, è stato ottenuto solo un modesto effetto sulla proliferazione delle cellule satellite (comparando con il terreno completo) e non è stato osservato alcun effetto significativo da parte di GHR o des-acyl GHR 100 nM a 24, 48 o 72 ore.

Riducendo le concentrazioni di siero al 25% di quelle ottimali, sorprendentemente abbiamo osservato un aumento della proliferazione a 48 ore; inoltre des-acyl-GHR, ma non GHR, ha ulteriormente - seppur di poco - incrementato la proliferazione. Inoltre a 72 ore, mentre la proliferazione delle satellite associate a fibre mantenute in terreno sub-ottimale è diminuita rispetto a quella delle satellite associate a fibre in terreno completo, la des-acyl GHR, ma di nuovo non la GHR, sembrerebbe aver promosso l'indirizzamento verso il differenziamento piuttosto che verso l'auto-rinnovo (visto come aumento della percentuale di cellule Pax7-ve/MyoD+ve).

L'ulteriore riduzione delle concentrazioni di siero nel terreno di coltura al 10% di quelle ottimali ci ha permesso di osservare una diminuzione significativa del tasso di proliferazione già dopo 48 ore in coltura. Inoltre già a 48 ore sono state osservate cellule Pax7-ve/MyoD+ve; la possibile spiegazione per questo fenomeno è che in un terreno di coltura così impoverito le satellite siano indotte ad andare incontro a differenziamento precoce per compensare la mancanza di nutrienti, come potrebbe accadere in corso di atrofia muscolare.

In queste condizioni sperimentali l'abilità di des-acyl GHR a indurre ulteriormente le satellite ad andare incontro a differenziamento terminale e' risultata piu' evidente, essendo già osservabile a 48 ore, mentre la GHR e' risultata nuovamente non avere alcun effetto.

Dopo 72 ore in coltura è apparso che sia GHR che des-acyl GHR sono in grado di ridurre il tasso di proliferazione a favore di un incrementato tasso di differenziamento. L'analisi dell'espressione di miogenina sarà necessaria per confermare il risultato.

Quando le singole fibre sono state coltivate in totale assenza di siero nel terreno di coltura, le cellule satellite non sono state in grado di attivarsi e le fibre stesse sono morte (ipercontratte) entro 48 ore dall'inizio della coltura. Né GHR né des-acyl GHR si sono dimostrate in grado di prevenire ed impedire la morte delle fibre causata dalla totale mancanza di nutrienti.

ANALISI DI NUOVI MARCATORI PER LE CELLULE SATELLITE

Per definire in modo univoco le cellule satellite e seguirne il destino in seguito ad attivazione, è estremamente utile definire una serie di marcatori molecolari che ne consentano l'identificazione, l'isolamento e l'analisi.

Nel corso di quest'anno di ricerca mi sono occupata di definire l'espressione di una serie di marcatori suggeriti in letteratura ma mai analizzati in dettaglio sulle satellite associate a singola fibra. Tra questi figurano proteine strutturali (caveolina-1 e integrina $\alpha 7$), recettori e ligandi (recettore per la calcitonina e Jagged-1) e proteine regolatorie del ciclo cellulare (p21/cip, p27/kip, p130).

L'espressione di questi marcatori è stata analizzata a diversi tempi dall'inizio della coltura di fibre di muscolo EDL (0, 24, 48 e 72 ore, laddove le 0 ore rappresentano le fibre isolate di fresco e le satellite associate vengono considerate quiescenti) sempre in associazione con un altro marcatore noto.

Caveolina-1

Caveolina-1 si è dimostrata un ottimo marcatore di membrana per le satellite quiescenti. La sua co-espressione con Pax7 al tempo 0 è infatti del 100%. La percentuale di co-espressione con Pax7 a 24, 48 e 72 ore resta completa ed inalterata, mentre la co-espressione con MyoD, del 100% a 24 ore, decresce nei tempi successivi, ad indicare che l'espressione di caveolina-1 può essere considerata un marcatore di staminalità per questo tipo cellulare.

Dimostrato che l'andamento dell'espressione di caveolina-1 segue quello dell'espressione di Pax7, tale marcatore è stato utilizzato in sostituzione a Pax7 ove necessario.

Integrina $\alpha 7$ e recettore della calcitonina (CTR)

Analogamente a caveolina-1, anche l'integrina $\alpha 7$ e il CTR si sono rivelati dei buoni marcatori per le satellite quiescenti. Allo stesso modo, la loro espressione segue l'andamento delle proprietà staminali nel tempo. Anche queste due proteine sono marcatori di membrana.

Jagged-1

Jagged-1 è uno dei ligandi per Notch-1 e Notch-2, recettori la cui via di segnalazione è implicata nella scelta del fato da seguire (differenziamento terminale o ritorno allo stato indifferenziato) da parte delle cellule satellite.

Abbiamo osservato che Jagged-1 non è espresso dalle satellite quiescenti, mentre viene gradualmente espresso dalle cellule attivate, fino ad essere co-espresso con MyoD al 100% a 48 ore

Proteine regolatorie del ciclo cellulare (*cdk inhibitors*)

Abbiamo analizzato l'espressione di tre diverse proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, in quanto inibitori delle chinasi ciclo-dipendenti: p21/cip, p27/kip e p130.

I risultati ottenuti hanno indicato che p27/kip e p130, sebbene espresse a bassi livelli anche nei micronuclei post-mitotici che costituiscono la fibra matura, sono espressi a maggiore intensità nei nuclei delle satellite quiescenti.

p21/cip, al contrario, non è espresso dalle satellite quiescenti mentre inizia ad essere espresso gradualmente in corso di attivazione. A 72 ore dall'inizio della coltura cellulare, p21/cip è espresso dal 90% delle satellite attivate.

DISCUSSIONE

Nel laboratorio del Prof. Andrea Graziani abbiamo recentemente dimostrato che GHR e des-acyl GHR sono in grado di indurre differenziamento e fusione di mioblasti scheletrici in linea C2C12 (*Filigheddu et al, 2007*). Lo studio della ghrelina, in particolare su cellule muscolari, è stato oggetto della mia ricerca nel corso dei primi tre anni di Dottorato e una volta avvenuta la pubblicazione dei dati ottenuti sulle C2C12, abbiamo pensato che il passo successivo dovesse essere l'analisi degli effetti di tale molecola e della sua isoforma de-acilata sul sistema muscolare in un contesto cellulare più fisiologico.

Coniugando questa esigenza con l'opportunità di svolgere un'esperienza di ricerca all'estero, ho trascorso il mio quarto anno di Dottorato presso il laboratorio del Dr. Peter Zammit al King's College di Londra (UK), dove ho appreso ad isolare ed analizzare singole fibre muscolari e le cellule satellite ad esse associate.

La tecnica per isolare singole fibre muscolari è estremamente utile per poter studiare le cellule satellite (le principali cellule staminali del muscolo) nel proprio micro-ambiente intatto, una delicata nicchia spaziale e molecolare.

Inizialmente ho trascorso alcuni mesi nel mettere a punto la tecnica per isolare le singole fibre, analizzare le cellule satellite ad esse associate, isolare le cellule stesse quando necessario e prendere confidenza con il sistema che, per quanto non complesso, richiede un certo grado di pratica.

E' stato inoltre necessario mettere a punto le condizioni ideali in cui condurre gli esperimenti per valutare gli effetti di GHR e des-acyl GHR in tale sistema.

Ho inizialmente verificato che GHR e des-acyl GHR hanno scarso -se non nullo- effetto sulla proliferazione e il differenziamento delle cellule satellite associate a singole fibre mantenute in un terreno di crescita completo. Questo risultato ci ha suggerito che eventuali effetti di GHR o des-acyl GHR in questo sistema potessero essere "mascherati" dall'elevato numero di nutrienti cui le cellule erano esposte.

Il passo successivo è stato dunque ridurre la concentrazione di siero presente nel terreno di coltura delle fibre in modo progressivo, al 50%, 25% e 10% della concentrazione ottimale. Conducendo questi esperimenti abbiamo verificato che solo riducendo al 10% la concentrazione di siero nel terreno di coltura si ottiene un effetto di diminuita proliferazione e aumentato differenziamento già dopo 48 ore rispetto al terreno completo. In questa condizione la des-acyl GHR, ma non la GHR, sembrerebbe avere un lieve effetto nello spingere le cellule satellite verso il differenziamento terminale.

Questi risultati preliminari ci hanno fatto concludere che non fosse il caso di indagare oltre l'attività di GHR e des-acyl GHR sulle cellule satelliti associate a singole fibre, essendo gli effetti osservati troppo deboli e scarsamente riproducibili.

Tuttavia abbiamo intenzione di indagare ulteriormente gli effetti di GHR e des-acyl GHR sulle cellule satelliti, con alcuni accorgimenti tecnici: al momento gli esperimenti sono stati condotti somministrando i peptidi al terreno di coltura, ma i tempi di degradazione non sono noti e potrebbero essere variabili. Per ovviare a questa incognita, abbiamo intenzione di infettare le fibre muscolari con un retrovirus esprimente ghrelina, in modo da garantire la presenza del peptide in modo più massivo, avendo così modo di osservare gli eventuali effetti sulle cellule satelliti in risposta ad elevate dosi.

Andremo anche ad analizzare gli effetti di GHR e des-acyl GHR sulle cellule satelliti isolate dalla fibra. Tali cellule infatti possono essere ottenute in seguito a coltura in adesione delle fibre muscolari su Matrigel. Le cellule satelliti mantenute in un terreno estremamente ricco di nutrienti sono in grado di proliferare *in vitro* per diversi giorni, essere piastrate ad elevata densità ed essere indotte a differenziare e fondere mediante riduzione del siero nel terreno di coltura.

Dopo circa una settimana in terreno di differenziamento, dalle cellule satelliti si ottengono dei miotubi di notevoli dimensioni, contenenti centinaia di nuclei post-mitotici. Si ottengono inoltre delle cellule "riserva", che non fondono con le altre e mantengono l'espressione di Pax7.

Cellule C2C12 (mioblasti scheletrici murini immortalizzati), da noi utilizzate nei precedenti studi con GHR e des-acyl GHR (*Filigheddu et al, 2007*), hanno un comportamento simile e sono pertanto considerate un ottimo modello per lo studio del differenziamento del muscolo scheletrico *in vitro*. Tuttavia le cellule satelliti, ottenute direttamente dal muscolo dell'animale, rappresentano un modello più potente e fisiologico: il tasso di proliferazione è maggiore, i miotubi che si ottengono sono più estesi e costituiti da un maggior numero di nuclei, le cellule riserva più abbondanti e facilmente identificabili. Per tutti questi motivi, sarà interessante verificare i risultati da noi ottenuti sulle C2C12 sulle cellule satelliti coltivate *in vitro*, sebbene i nostri esperimenti sulle cellule satelliti associate a fibra non abbiano avuto il successo atteso.

Nel corso del mio anno di ricerca presso il laboratorio del Dr. Peter Zammit al King's College di Londra ho avuto l'opportunità di accrescere la mia esperienza nel campo dello

studio del muscolo scheletrico anche grazie al coinvolgimento in altri progetti riguardanti le cellule satellite.

In particolare mi sono occupata di analizzare e validare una serie di marcatori per le cellule satellite a vario stadio di attivazione la cui importanza fosse già stata suggerita in letteratura ma mai verificata nel sistema delle singole fibre.

I risultati da me ottenuti hanno rivelato che caveolina-1, integrina $\alpha 7$ e il recettore per la calcitonina (CTR) sono validi marcatori per le cellule satellite quiescenti e la loro espressione decresce nelle cellule che vanno incontro a differenziamento terminale. L'aver individuato tre nuovi marcatori per le cellule satellite apre la strada alla possibilità di isolare tali cellule con sempre crescente precisione; il fatto che si tratti di tre proteine di membrana rende questi marcatori dei buoni candidati per *FACS sorting* o altre tecniche di purificazione.

Uno dei ligandi di Notch-1, Jagged-1, al contrario non è espresso dalle cellule satellite quiescenti, ma viene espresso in corso di attivazione. L'importanza della via di segnalazione di Notch nella determinazione del destino delle cellule satellite è sempre più evidente dai dati pubblicati in letteratura.. L'espressione regolata dei recettori Notch e dei relativi ligandi potrà essere un utile strumento per lo studio dei meccanismi che consentono proliferazione, differenziamento, fusione e allo stesso tempo il mantenimento di un *pool* di cellule satellite indifferenziate.

Infine per quanto riguarda le proteine regolatorie del ciclo cellulare analizzate, è da notare che le cellule satellite vanno incontro a due diversi tipi di arresto cellulare: l'arresto in G0 durante la fase di quiescenza, spesso mantenuto per tempi estremamente lunghi, e l'arresto indotto in seguito ad attivazione per andare incontro a differenziamento terminale. Presumibilmente questi due diversi tipi di arresto del ciclo cellulare sono indotti, mantenuti e regolati da fattori diversi.

Dai risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione degli inibitori di chinasi ciclo-dipendenti (cdks) p21/cip, p27/kip e p130, sembrerebbe che p27/kip e p130 siano maggiormente coinvolti nel mantenimento della fase G0 durante la quiescenza delle cellule satellite, mentre p21 - assente nelle cellule satellite quiescenti ma indotto in seguito ad attivazione - potrebbe concorrere ad indurre l'inibizione della proliferazione necessaria per il differenziamento terminale.

In conclusione durante quest'anno ho notevolmente approfondito le mie conoscenze teoriche e pratiche nel campo della biologia del muscolo scheletrico, con particolare riguardo verso le più avanzate tecniche per isolare ed analizzare le cellule satellite, le cellule

staminali del muscolo scheletrico adulto. Lo studio di tali cellule e dei meccanismi che ne regolano l'attivazione sarà fondamentale per la messa a punto di terapie efficaci per un grande numero di malattie che colpiscono il muscolo, siano esse primarie (distrofie) o secondarie (cachessia conseguente ad altra patologia, denervazione, disuso).

BIBLIOGRAFIA

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.

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.

Cossu G, Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 16 (2005) 623-31

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.

Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghè C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote

differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Molecular Biology of the Cell* 18 (2007) 986-94

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* 148 (2007) 13-20

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.

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.

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.

Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9 (1961) 493-5

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.

Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31 (1995) 773-9.

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.

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102 (2000) 777-86.

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.

Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166 (2004) 347-57.

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.

PUBBLICAZIONI

Chianale F, Cutrupi S, Rainero E, Baldanzi G, Porporato PE, Traini S, Filigheddu N, **Gnocchi VF**, Santoro MM, Parolini O, van Blitterswijk WJ, Sinigaglia F, Graziani A. Diacylglycerol kinase- α mediates HGF-induced epithelial cell scatter by regulating Rac activation and membrane ruffling. *Molecular Biology of the Cell*. In press.

Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, **Gnocchi V**, Rainero E, Porporato P, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Parolini O, Bussolino F, Sinigaglia F, Graziani A. Diacylglycerol kinase- α phosphorylation by Src on Y335 is required for activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility. *Oncogene* (2007) Aug 13; [Epub ahead of print]

Perez-Ruiz A, **Gnocchi VF**, Zammit PS. Control of Myf5 activation in adult skeletal myonuclei requires ERK signalling. *Cell Signaling* 19 (2007) 1671-80.

Filigheddu N, **Gnocchi VF**, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghè C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Molecular Biology of the Cell* 18 (2007) 986-94

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* 24 (2006) 23-33.

CONGRESSI E WORKSHOP

Myores 3rd Workshop on Muscle Regeneration.

Cassis (France), May 3rd-7th, 2007.

Oral presentation.

FASEB Summer Research Conference on Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells.

Indian Wells, California (US). July 14th-19th, 2007.

“Outstanding Poster Award” per il poster presentato.

SEMINARI

Riunioni settimanali con lo “Skeletal Muscle Group”, con i gruppi di ricerca del Dr. Peter Zammit, Prof. Simon Hughes, Prof. Balijnder Mankoo. Le riunioni consistono in seminari di Research Report alternati a sessioni di Journal Club.