

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE – XVI CICLO
UNIVERSITA' DEGLI STUDI "A. AVOGADRO" DEL PIEMONTE ORIENTALE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Relazione di dottorato
Anno Accademico 2003/2004

**AZIONE DI GRELINA E GRELINA DEACILATA SU MIOCITI
SCHELETRICI**

Responsabile scientifico
Prof. Andrea Graziani

Dottoranda
Nicoletta Filigheddu

INTRODUZIONE

Grelina è un ormone peptidico circolante secreto dallo stomaco che induce il rilascio di ormone della crescita tramite legame a GHSR-1a, un recettore accoppiato a proteina G precedentemente identificato come il recettore per i GH-secretagoghi (GHS), una classe di molecole sintetiche peptidiche e non che stimolano fortemente la secrezione somatotrofica (1, 2). Grelina possiede anche altre attività endocrine, tra cui la stimolazione dell'appetito, la regolazione del metabolismo lipidico e, seppure in modo minore, la secrezione di altri ormoni ipofisari (3-5). La sua espressione e i livelli in circolo vengono aumentati dall'ipoglicemia e dalla somministrazione di leptina e sono prontamente inibiti dalla somministrazione di cibo (3, 6). Grelina è un peptide di 28 aminoacidi esterificato con acido ottanoico sulla serina 3 (1, 7). L'acilazione è un requisito fondamentale per il legame al recettore GHSR-1a e per le attività endocrine di grelina. Infatti la grelina deacilata, che nel siero è 50 volte più abbondante della grelina, non lega GHSR-1a e non possiede alcuna attività GH-secretagoga (1, 7).

Sebbene il recettore GHSR-1a sia principalmente espresso nell'unità ipotalamo-ipofisi e in altre aree del sistema nervoso centrale, siti di legame per la grelina e per i GHS sono stati trovati in tessuti periferici endocrini e non endocrini, quali il sistema cardiovascolare e il muscolo scheletrico, e in linee cellulari (8, 9,10-13), fornendo l'ipotesi che l'azione di grelina possa non essere limitata a livelli centrali. E' stato infatti dimostrato che grelina e i GHS peptidici sintetici possiedono varie attività cardiovascolari indipendenti dalla loro attività GH-secretagoga (14). Sia grelina che hexarelin, un GHS peptidico sintetico, aumentano le performance cardiache in volontari sani e in pazienti ipopituitari con severa deficienza di GH (15, 16). In studi sperimentali *in vivo*, il trattamento cronico con hexarelin protegge da infarto del miocardio indotto *in vivo* tramite legamento delle coronarie (17) e da danno miocardico dovuto a ischemia-riperfusion indotto sia in ratti normali che GH-deficienti o vecchi (18, 19). E' stata anche riportata l'induzione di vasocostrizione coronarica in cuore perfuso a seguito di alte dosi di hexarelin (11). I meccanismi cellulari e molecolari che mediano questo ampio spettro di attività cardiache di grelina e dei GHS non sono stati ancora identificati. I GHS peptidici sintetici riconoscono anche siti di legame ad alta affinità nel cuore e nella linea di cardiomioblasti fetali H9c2 le cui proprietà farmacologiche differiscono da quelle di GHSR-1a (8, 13). D'altra parte grelina riconosce siti di legame ad alta affinità nelle membrane del cuore e l'mRNA di GHSR-1a è stato rilevato tramite RT-PCR nel cuore e nell'aorta (16). Nell'insieme questi dati suggeriscono che nel sistema cardiovascolare possono essere espressi diversi recettori per i GHS e per grelina che mediano le diverse attività cardiovascolari.

Abbiamo recentemente dimostrato che hexarelin previene la morte cellulare indotta da doxorubicina nelle H9c2 (13) e che sia grelina che grelina deacilata inibiscono la morte cellulare di cardiomiociti e cellule endoteliali indotta da trattamento con doxorubicina, da privazione di siero o da attivazione del recettore Fas. Abbiamo inoltre dimostrato che sia grelina che grelina deacilata condividono siti di legame ad alta affinità nelle H9c2 e che l'attività di sopravvivenza di grelina è mediata dall'attivazione di pathway di trasduzione del segnale intracellulare. I dati da noi raccolti suggeriscono che l'effetto cardioprotettivo sia mediato da un recettore distinto da GHSR-1a che deve essere ancora identificato.

OBIETTIVI

Dopo aver dimostrato che grelina e grelina deacilata sono in grado di promuovere differenziamento e fusione di C2C12, una linea cellulare di mioblasti scheletrici, siamo passati allo studio degli effetti differenziativi di questi ormoni su cellule satelliti primarie estratte da muscolo scheletrico di topo. Abbiamo valutato inoltre l'ipotesi che grelina potesse avere effetti ipertrofici sul muscolo. Infine, abbiamo messo a punto un nuovo strumento per lo studio degli effetti di grelina su diversi tipi cellulari e tessuti costituito da un lentivirus esprimente grelina.

MATERIALI E METODI

Estrazione di cellule satelliti primarie – Rimossi i muscoli dall'animale, si procede alla digestione tramite una soluzione di collagenasi e dispasi. La soluzione ottenuta, dopo opportuni passaggi di centrifugazione per eliminare i detriti, viene piastrata su normali piastre da coltura cellulare e incubate over night. Durante questa incubazione si attaccano alla piastra soltanto i fibroblasti, mentre le cellule satelliti rimangono nel mezzo. Si recupera quindi il terreno contenente le cellule satelliti e lo si passa in una piastra trattata con gelatina in modo che le cellule satelliti aderiscano.

Differenziamento muscolare – Una volta in coltura, le satelliti vanno mantenute rade (max 40% confluenza) in un terreno ad alto siero (HAM F10 20% FCS, chicken embryo extract e bFGF)

finché non si decide di farle differenziare. A questo scopo si sostituisce il terreno di coltura con DMEM 5% HS per almeno tre giorni. I miotubi che così si formano, a differenza di quelli generati dalla fusione delle C2C12, si contraggono spontaneamente.

Noi abbiamo paragonato gli effetti dell'aggiunta di grelina e grelina deacilata al normale terreno di coltura con quelli osservabili differenziando le satelliti in DMEM 5% HS.

Il differenziamento è stato valutato:

- morfologicamente al microscopio a contrasto di fase;
- osservando la positività a MHC delle cellule in seguito ai trattamenti tramite microscopia a fluorescenza; ciò ha permesso di valutare indice di differenziamento e indice di fusione.

Proliferaazione e ipertrofia – L'analisi della proliferazione delle satelliti è stata condotta tramite incorporazione di timidina triziata. Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti, lasciate in terreno per 48 h per ottenere una condizione di "spent medium" e successivamente trattate con grelina e grelina deacilata per 24 h usando FCS come controllo positivo di proliferazione. Alla fine dei trattamenti le cellule sono state incubate con timidina triziata per 3 h, lisate e la timidina incorporata valutata tramite beta-counter. Per valutare l'ipertrofia, insieme ai trattamenti è stata somministrata leucina triziata e poi si è proceduto con l'aggiunta di timidina come per la proliferazione. Come controllo positivo di ipertrofia si è utilizzata l'angiotensina II.

Preparazione vettore lentivirale esprimente grelina – L'intero cDNA di grelina murina (da start codon a stop codon, 354 bp) è stato clonato a partire da cDNA di stomaco di topo (precedentemente preparato) con inserimento dei siti di restrizione per XhoI e BamHI utilizzando i seguenti primer: BamHI-mGHR 5' CCGGATCCCGATGCTGTCTTCAGGCACCAT 3' e mGHR-XhoI 5' CCGCTCGAGCGGTTACTTGTCAGCTGGCGCCTC 3' (reazione: 94°C 2', 94°C 30" - 60°C 30" - 72°C 30" (36 cicli), 72°C 7'). Il prodotto di PCR è stato fatto correre su gel per verificare le dimensioni del frammento che è stato quindi estratto da gel. Le digestioni enzimatiche con BamHI e XhoI sono state effettuate contemporaneamente a 37°C per 2 ore. A seguire corsa su gel ed estrazione della banda.

Il vettore lentivirale pCCL.sin.PPT.hPGK.GFP.Wpre di circa 8 kb contenente GFP e resistenza all'ampicillina è stato gentilmente fornito da Luigi Naldini.

Tale vettore è stato digerito a livello del sito di clonaggio con BamHI e Sall, 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 tra vettore e inserto è stata condotta a 16 °C over night.

Con il prodotto di ligasi sono stati trasformati batteri competenti TOP10 ed è stata effettuata una Maxi Prep dopo crescita over night in 200 ml di terreno LB.

La verifica dell'avvenuta ligasi è stata effettuata mediante i) taglio enzimatico con BamHI ii) RT-PCR utilizzando i primer con cui era stata clonata la grelina murina.

RISULTATI RAGGIUNTI

Ruolo di grelina nel differenziamento del muscolo scheletrico – I risultati degli esperimenti condotti portano a concludere che grelina e grelina deacilata hanno un ruolo non tanto nel differenziamento delle cellule satelliti primarie, bensì nella loro fusione in miotubi.

Proliferazione e ipertrofia – I risultati ottenuti suggeriscono che grelina possa indurre proliferazione ma non ipertrofia nelle cellule satelliti. Tuttavia, a causa delle difficoltà tecniche dell'uso di queste cellule, è necessario trovare ancora le condizioni migliori per assicurare l'assoluta ripetibilità degli esperimenti.

PROSSIMI ESPERIMENTI

Gli esperimenti nell'immediato futuro saranno dedicati all'approfondimento dei pathway intracellulari coinvolti nella fusione cellulare, con particolare riguardo al possibile ruolo di IL-4 e NFAT.

Inoltre valuteremo gli effetti dell'infezione delle satelliti con il vettore lentivirale esprimente grelina.

BIBLIOGRAFIA

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. 1999, *Nature* **402**:656-660.
2. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong

- SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH, and Smith R. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in Growth Hormone release. 1996, *Science* **273**:974-977.
3. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. 2000, *Nature* **407**:908-13.
 4. Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. 2001, *Nature* **409**:194-198.
 5. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli M, Dieguez C, Casanueva FF, *et al.* Endocrine activities of ghrelin, a natural GH secretagogue, in humans : a comparison with hexarelin, a non natural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. 2001, *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1169-74.
 6. Tosinai K., Mondal M., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Kojima M., Kangawa K., Matsukura S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia and leptin administration. 2001, *Biochem Biophys Res Commun* **281**:1220-5.
 7. Hosoda H, Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. 2000, *Biochem Biophys Res Commun*, **279**:909-13.
 8. Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. 2000, *J Clin Endocrinol Metab* **85**:3803-7.
 9. Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E and Muccioli G. Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. 2001, *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1738-45.
 10. Smith RG, Feighner S, Prendergast K, Guan X, Howard A. A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release. 1999, *Trends Endocrinol Metab* **10**:128-135.
 11. Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carriere P, Ghigo E, Sejlitz T, Sirois MG, Lamontagne D, Ong H. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. 1999, *Circ Res* **85**:796-802.
 12. Muccioli G, Broglio F, Valetto MR, Ghe C, Catapano F, Graziani A, Papotti M, Bisi G, Deghenghi R, Ghigo E. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. 2000, *Ann Endocrinol* **61**:27-31.
 13. Filigheddu N, Fubini A, Baldanzi G, Cutrupi S, Ghè C, Catapano F, Broglio F, Deghenghi R, Bosia A, Papotti M, Muccioli GP, Ghigo E, Graziani A. Hexarelin protects H9c2

- cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death. 2001, *Endocrine* **14**:113-119.
14. Ghigo E, Arvat E, Broglio F, Giordano R, Gianotti L, Muccioli G, Papotti M, Graziani A, Bisi G, Deghenghi R, Camanni F. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. 1999, *Horm Res* **51** Suppl 3:9-15.
 15. Bisi G, Podio V, Valetto MR, Broglio F, Bertuccio G, Aimaretti G, Pelosi E, Del Rio G, Muccioli G, Ong H, *et al.* Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. 1999, *Eur J Pharmacol* **381**:31-8.
 16. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M., Yamagishi M., Hosoda H., Oya H., Hayashi Y, Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. 2001, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **86**:1464-9.
 17. Tivesten A, Bollano E, Caidahl K, Kujacic V, Sun XY, Hedner T, Hjalmarson A, Bengtsson BA, Isgaard J. The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. 2000, *Endocrinology* **141**:60-6.
 18. De Gennaro Colonna V, Rossoni G, Bernareggi M, Muller EE, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. 1997, *Eur J Pharmacol* **334**:201-7.
 19. 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. 1999, *Endocrinology* **140**:4024-31.
 20. Forrest G.L., Gonzalez B., Tseng W., Li X.L., Mann J. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. 2000, *Cancer Research* **60**:5158-64.
 21. van Acker F.A.A., van Acker S.A.B.E., Kramer K., Haenen G.R.M.M., Bast A., van der Vijgh W.J.F. 7-monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced Cardiotoxicity When administered only once per week. 2000, *Clin Cancer Res* **6**:1337 -41.
 22. Nagaya N., Uematsu M., Kojima M., 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. 2001, *Circulation* **104**:1430-35.

PUBBLICAZIONI

1. Filigheddu N, Fubini A, Baldanzi G, Cutrupi S, Ghè C, Catapano F, Broglio F, Deghenghi R, Bosia A, Papotti M, Muccioli GP, Ghigo E, Graziani A. **Hexarelin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death.** 2001, *Endocrine* **14**:113-119.
2. 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.** 2002, *J Cell Biol* **159**:1029-37.
3. Baldanzi G, Mitola S, Cutrupi S, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Sinigaglia F, Bussolino F, Graziani A. **Activation of diacylglycerol kinase α is required for VEGF-induced angiogenic signaling *in vitro*.** 2004, *Oncogene* **23**:4828-38.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI 2003/2004

Associazione di Biologia Cellulare e del Differenziamento

“Meccanismi di trasduzione del segnale in adesione e differenziamento cellulare”

Roma, 19-21 marzo 2004

Ghrelin and des-acyl ghrelin induce differentiation of C2C12 myoblasts

N. Filigheddu, M. Cappelli, V. Gnocchi, S. Cutrupi, G. Baldanzi, F. Chianale, A. Graziani

HGF- and v-Src-induced activation of diacylglycerol kinase- α are required for epithelial-mesenchymal transition.

Santina Cutrupi, Federica Chianale, Paola Mirabelli, Gianluca Baldanzi, Nicoletta Filigheddu, Viola Gnocchi, Andrea Graziani

Gordon Research Conference

“Myogenesis”

Il Ciocco, Castelvechio Pascoli, 16-21 maggio 2004

Ghrelin and des-acyl ghrelin induce differentiation of C2C12 myoblasts

N. Filigheddu, M. Cappelli, V. Gnocchi, S. Cutrupi, G. Baldanzi, F. Chianale, A. Graziani

5° Convegno FISV

Riva del Garda, 30 settembre-3 ottobre 2004

Ghrelin and des-acyl ghrelin induce differentiation of C2C12 myoblasts and satellite cells

N. Filigheddu, V. Gnocchi, S. Cutrupi, G. Baldanzi, F. Chianale, A. Graziani

Proteomic analysis of α -diacylglycerol kinase associated proteins and effectors

Brignoli G, Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, Filigheddu N, Gnocchi V, Sinigaglia F. and Graziani A.

SIC "XLVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia"

Pisa 2004

Diacylglycerol kinase- α is involved in HGF-induced invasion of mammary cells

Santina Cutrupi, Viola Gnocchi, Fortina Elisabetta, Piantanida Paola, Gianluca Baldanzi, Federica Chianale, Nicoletta Filigheddu, Nicola Surico, Andrea Graziani

Lussemburgo, gennaio 2004

Diacylglycerol kinase- α is a potential target for angiogenesis and metastasis control

Gianluca Baldanzi, Stefania Mitola, Santina Cutrupi, Nicoletta Filigheddu, Federica Chianale, Federica Pontiroli, Federica Maccarini, Wim J van Blitterswijk, Fabiola Sinigaglia, Federico Bussolino, Andrea Graziani

1st italian RNA interference symposium

Milano, 2004

New tools for α -DGK inhibition

G. Baldanzi, S. Mitola, S. Cutrupi, N. Filigheddu, F. Chianale, V. Gnocchi, A. Graziani.

FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference

Cavtat (Croatia) 2004

HGF- and v-Src-induced activation of diacylglycerol kinase- α are required for epithelial-mesenchymal transition.

S. Cutrupi, F. Chianale, P. Mirabelli, G. Baldanzi, N. Filigheddu, V. Gnocchi, A. Graziani.

Workshop Molecular advances in DAG signalling

Madrid (Spain) 2004

Mechanism of activation and role of alpha-diacylglycerol kinase in HGF signalling in epithelial cells.

Cutrupi S, Baldanzi G, Chianale F, Filigheddu N, Gnocchi V and Graziani A

SEMINARI SEGUITI

Prof Magnus Ingelman-Sundberg

PHARMACOGENETICS: A TOOL FOR A MORE EFFICIENT AND SAFE DRUG THERAPY

Rita Clementi

ALTERAZIONI DEL GENE DELLA PERFORINA NELLE PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE

Dr.ssa Bice Chini

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L' OSSITOCINA: MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Prof. Guido Valesini

TNF, ANTI-TNF ED AUTOIMMUNITÀ

Dr Antonia Follenzi

ESPRESSIONE EPATO-SPECIFICA DEL FATTORE IX ANTIEMOFILICO MEDIANTE L'USO DI VETTORI LENTIVIRALI

Frédéric RIEUX-LAUCAT

GENETIC BASES OF THE AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME (ALPS) SUBTYPES

Prof. Angiolo Benedetti

IL RETICOLO ENDOPLASMATICO: UN LABIRINTO METABOLICO

Dr David Murphy

FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY

Dr David Murphy

BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS: PRINCIPLES, PROSPECTS AND PROBLEMS

Prof Emilio Hirsch

LA FOSFATIDIL-INOSITOLO 3-CINASI g REGOLA LA CONTRATTILITA' E L'IPERTROFIA CARDIACA MEDIANTE FUNZIONI DIPENDENTI E INDIPENDENTI DALLA ATTIVITA' LIPIDE-CINASICA

Antonio Puccetti

VIRUS E MALATTIE AUTOIMMUNI

Alberto Martini

LE ARTRITI CRONICHE DEL BAMBINO

Prof. Christopher Day

PITFALLS OF GENETIC STUDIES IN LIVER DISEASE

Manlio Ferrarini

MECCANISMI PATOGENETICI DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Prof. Martin Ronis

ETHANOL METABOLISM AND TOXICITY IN PREGNANCY

Prof. Martin O. Savage

CUSHING'S SYNDROME IN CHILDHOOD

Dr. ssa Luisa Pugliese

ANALISI DI SEQUENZE E STRUTTURE DI PROTEINE SU LARGA SCALA: UNA NUOVA
TECNOLOGIA PER INTERPRETARE DATI ORIGINATI DI GENOMICA E PROTEOMICA E
OTTIMIZZARE LA SELEZIONE DEGLI OBIETTIVI FARMACOLOGICI

Dr Anne Boullerne

PROLIFERATION OF HUMAN OLIGODENDROCYTE PROGENITORS FROM THE ADULT
BRAIN IN LONG-TERM CULTURE and MULTIPLEX ROLE OF NITRIC OXIDE IN
MULTIPLE SCLEROSIS

Prof. Antonio De Flora

TRAFFICO INTRA- ED EXTRA-CELLULARE DI NUCLEOTIDI-SEGNALE ATTIVI NELLA
REGOLAZIONE DEL CALCIO CELLULARE

SEMINARIO DI CULTURA BREVETTUALE