

Dottorato in Medicina Molecolare - XIX ciclo -

Dipartimento di Scienze Mediche

Università del Piemonte Orientale

RELAZIONE DEL I ANNO DI DOTTORATO

**Studio della grelina durante lo
sviluppo embrionale e modelli *in vivo***

Dottoranda: Viola Felicita Gnocchi

Responsabile Scientifico: Prof. Andrea Graziani

INTRODUZIONE

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 grelina, 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*).

Esistono due differenti forme di grelina: 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 grelina 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 è si 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*). Tuttavia 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-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).

Considerati gli interessanti risultati ottenuti sulle cellule cardiache, ci siamo chiesti se GHR e des-GHR potessero avere un'azione anche su un altro tipo di cellule muscolari, le cellule di muscolo scheletrico. In questo modello sperimentale il nostro gruppo di lavoro ha dimostrato il potenziamento del processo di fusione in corso di differenziamento muscolare in mioblasti in linea C2C12 e in mioblasti primari sia da parte di GHR che des-GHR (Filigheddu et al, *manoscritto in preparazione*).

OBIETTIVI

Considerati gli effetti anti-apoptotici e pro-differenziativi osservati con GHR e des-GHR ci siamo posti essenzialmente due domande cui cercherò di dare risposta: i) se la grelina sia coinvolta nello sviluppo embrionale in quanto fattore differenziativo ii) se la capacità anti-apoptotica della grelina possa essere utile *in vivo* a proteggere da danno variamente indotto i sistemi cardio-vascolare e muscolo scheletrico.

Per verificare queste due ipotesi le linee di ricerca intraprese sono le seguenti: i) ibridazione *in situ* per rilevare l'espressione di grelina su sezioni di embrioni a diversi stadi di sviluppo e poter poi valutare la rilevanza funzionale di tale espressione ii) produzione di due diverse linee di topi transgenici per la grelina, l'una ad espressione cuore-specifica, l'altra ad espressione muscolo scheletrico-specifica per avere a disposizione dei modelli *in vivo* confrontabili con la controparte *wild type*.

MATERIALI E METODI

Tessuti, estrazione dell'RNA, retrotrascrizione, RT PCR. Embrioni di topi del ceppo CD1 sono stati prelevati e sacrificati a diversi tempi: E11.5, E13.5, E15, E16.5. Sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e successivamente trattati con Trizol (Gibco) per l'estrazione dell'RNA totale. L'RNA ottenuto è stato quantificato mediante misurazione allo spettrofotometro e 2 µg di ciascun campione sono stati retrotrascritti con SuperScript II RT (Invitrogen) per ottenere il cDNA, in presenza di random esameri. 1 µl 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' ATCGAAGGTGGAAGAGT GGG A 3'). A retrotrascrizione verificata, 1 µl di ciascun cDNA è stato utilizzato per effettuare RT PCR di grelina murina (primer: GHR-for 5' TTCAGGCACCATCTGCAGTTT 3' e GHR-rev 5' TTTGACCTCTTCCCAGAGGAR 3'). Tutti i primer sono a cavallo di almeno un introne e sono stati sintetizzati da MWG biotech; per tutte le RT-PCR è stata utilizzata la DyNAzyme EXT (Finnzymes) polimerasi.

Per le succitate reazioni di PCR e per tutte quelle descritte nei paragrafi seguenti è stato utilizzato un termociclatore PTC 100 MJ Research.

Real Time PCR. Ogni singola reazione di PCR quantitativa è stata condotta in un volume finale di 20 µl: Universal Master Mix 2X (UMM no UNG Applied Biosystems), primer + sonda di grelina murina 20X (Assay on Demand Mm00445450_m1 Applied Biosystems), 0,5 µl cDNA stampo, acqua a volume. Come normalizzatore attivo è stato utilizzato 18s

(mammalian 18s Pre Developed TaqMan Assay Reagents, Applied Biosystems). Ad ogni esperimento i singoli campioni sono stati amplificati in triplicato con la suddetta reazione ed ogni esperimento è stato a sua volta ripetuto tre volte. Lo strumento utilizzato è il 7000 Sequence Detection System, Applied Bioystems.

Costruzione vettore per ibridazione *in situ*. Una porzione di 444 bp del cDNA di grelina murina (comprendente una parte di sequenza 3' non tradotta) è stata clonata con i seguenti primer contenenti i siti di restrizione rispettivamente per EcoRI ed XbaI: GHR-EcoRI_for 5' AGCGGAATTCTTCAGGCACCATCTGCAGTTT 3' e GHR-XbaI_rev 5' GCGCTCTAGAA AAGTGGTAGGAGAGTGCTGG 3'. Il clonaggio è avvenuto a partire da cDNA di stomaco di topo (precedentemente preparato) utilizzando DyNAzyme EXT (Finnzymes) polimerasi con la seguente reazione: 94°C 2', 94°C 30" - 54°C 30" - 72°C 30" (34 cicli), 72°C 7'. Il prodotto di PCR è stato fatto correre su gel d'agarosio 1,5% e, dopo verifica della taglia agli UV, la banda estratta da gel (NucleoSpin Extract, Macherey Nagel). I tagli enzimatici dell'inserto sono stati effettuati in sequenza, con corsa su gel d'agarosio ed estrazione della banda da gel ad ogni passaggio, utilizzando EcoRI (Invitrogen) ed XbaI (New England BioLabs) a 37°C per 2 ore.

Come vettore di clonaggio è stato utilizzato pBlueScript SK+ (Stratagene) tagliato EcoRI ed XbaI. Per la reazione di ligasi sono stati utilizzati 300 ng di inserto tagliato e 50 ng di vettore tagliato in un volume finale di 20 µl a 16°C over night in presenza di T4 DNA ligasi (New England BioLabs) e relativo buffer. La verifica di avvenuta ligasi è stata effettuata i) mediante taglio enzimatico con XbaI e corsa su gel d'agarosio, confrontando la taglia del solo vettore tagliato con quella del prodotto di ligasi ii) mediante RT PCR con primer posizionati sul vettore a monte e a valle del sito di clonaggio (for 5' AACTGTTGGGAAGG GCGAT 3' e rev 5' AGCGCAACGCAATTAATGTG 3'). Gli amplificati così ottenuti sono stati sequenziati dopo estrazione da gel; con il prodotto di clonaggio a sequenza corretta sono stati trasformati batteri competenti TOP10 (protocollo classico con shock termico a 42°C per 40") ed è stata effettuata una Midi Prep (Sigma) dopo crescita over night in 200 ml di terreno LB.

Preparazione sonda per ibridazione *in situ*. Per la produzione delle sonde di RNA per ibridazione *in situ* il vettore contenente la grelina clonata è stato tagliato con EcoRI e

trascritto con T3 RNA polimerasi o tagliato con XbaI e trascritto con T7 RNA polimerasi (entrambe Stratagene) per ottenere rispettivamente la sonda antisenso o senso. Entrambe le trascrizioni sono state effettuate in presenza di UTP marcata con digossigenina (DIG-UTP) e a seguire hanno subito trattamento con DNasi. I prodotti di tali reazioni sono stati passati in colonne Chroma Spin 100 DEPC (BD); la qualità e la quantità di RNA così ottenuto sono state verificate mediante corsa su gel d'agarosio.

Ibridazione in situ. Per l'ibridazione *in situ* sono state utilizzate sezioni su vetrino di embrioni murini a 10,5 e 16,5 dpc precedentemente ottenute al criostato e mantenute a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Una volta scongelate a temperatura ambiente, le sezioni a E16,5 sono state trattate con 8 µg/ml di proteinasi K. Per ogni vetrino sono stati preparati 75 µl di soluzione di ibridazione così composti: 1 µg di sonda senso o antisenso, salt solution 10X, formamide 50%, destran solfato 10%, Denhardt's solution 1X, tRNA 1 mg/ml, acqua a volume. I vetrini sono stati lasciati in soluzione di ibridazione ON a 65°C in posizione orizzontale in cameretta umidificata (acqua, 50% formamide). Dopo l'ibridazione è stato effettuato un primo lavaggio in soluzione di lavaggio (SSC 1X, formamide 50%) per 15' a 65°C con i vetrini in posizione verticale. Dopo questo primo lavaggio i coprivetrini sono stati eliminati e si è potuto procedere con altri due lavaggi, con la medesima soluzione, per 30' a 65°C. A seguire due lavaggi con MABT (acido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7.5) 30' a temperatura ambiente. Per ogni vetrino è stato necessario effettuare una reazione di *blocking* con 300 µl di blocking solution (MABT, 2% blocking reagent, 20% heat inactivated sheep serum) per 1 ora a temperatura ambiente in orizzontale in cameretta umida (solo acqua).

L'incubazione con l'anticorpo anti-DIG, coniugato con fosfatasi alcalina, diluito 1:2000 in blocking solution è stata condotta in cameretta umida a 4°C over night, in orizzontale. All'incubazione con anticorpo sono seguiti 4 o 5 lavaggi da 20' ciascuno con NTM (NaCl 100 mM, Tris acido 100mM, Tris base 100mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) e un lavaggio di 20' con NTMT (NTM + Tween 20 0,1%) sono stati effettuati a temperatura ambiente in debolissima agitazione. La reazione di *staining*, garantita dalla fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo, è stata ottenuta per incubazione in debole agitazione con NTMT + NBT 4,5 µl/ml (Sigma) + BCIP 3,5 µl/ml (Sigma). Una volta ottenuta la colorazione desiderata i

vetrini sono stati lavati più volte con PBS e coperti con un vetrino coprioggetti con l'ausilio di montante acquoso (DAKO).

Preparazione vettore d'espressione cuore-specifica per topo transgenico. 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 HindIII utilizzando i seguenti primer: GHR-XhoI for 5' CCGCTCGAG CGGATGCTGTCTTCAGGCACCAT 3' e GHR-HindIII rev 5' CCCAAGCTTGGGTTACTTGT CAGCTGGCGCCTC 3' (reazione: 94°C 2', 94°C 30" - 60 °C 30" - 72°C 30" (34 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 (NucleoSpin Extract, Macherey Nagel). I tagli enzimatici con XhoI e HindIII (New England BioLabs) sono stati effettuati contemporaneamente con buffer compatibile a 37°C per 2 ore. A seguire corsa su gel ed estrazione della banda.

Il vettore d'espressione cuore-specifico è stato gentilmente fornito dalla dottoressa M. Deacetis ed è così costruito: 2,9 kb di pBlueScript II SK+ (contenente origine di replicazione batterica e resistenza all'ampicillina), 3' UTR della β -MHC murina, regione promotrice della α -MHC murina (siti di legame a fattori trascrizionali cuore-specifici come MEF2, MCAT, MEF1 e altri, TATA box, primi tre esoni non tradotti), sito di clonaggio e segnale di poliadenilazione del GH umano, per un totale di circa 9 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) dopo crescita over night in 200 ml di terreno LB.

La verifica dell'avvenuta ligasi è stata effettuata mediante i) taglio enzimatico con EcoRI (Invitrogen) ii) RT-PCR utilizzando un primer forward posizionato sul promotore di α -MHC (for 5' TCCAGCCCTCTCTTTCTCTG 3') e un primer reverse posizionato all'interno della sequenza di grelina (rev 5' AGCTTGGGTTACTTGTTCAGCT 3'). Una volta verificata

l'avvenuta ligasi, la grelina 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.

Preparazione vettore d'espressione muscolo scheletrico-specifica per topo transgenico. Il cDNA di grelina murina per la preparazione del vettore ad espressione muscolo scheletrico-specifica è stato clonato e preparato per la ligasi in modo identico a quello già descritto per il vettore cuore-specifico.

Il vettore per espressione muscolo scheletrico-specifica è stato gentilmente fornito dal prof. G. Cossu ed 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.

Il vettore è stato tagliato in modo analogo al precedente e anche la reazione di ligasi è stata condotta nelle medesime condizioni. Alla trasformazione batterica con il prodotto di ligasi e successiva Midi Prep, come verifica è stato effettuato il solo taglio enzimatico. Anche in questo caso l'amplimero ottenuto con i primer di clonaggio è stato inviato a sequenziare.

RISULTATI

Espressione di grelina in embrioni totali. Con un RT PCR qualitativa è stata verificata la presenza del trascritto di grelina in retrotrascritti di embrioni totali di topi del ceppo CD1, prelevati e sacrificati a tempi diversi: E11.5, E13.5, E15, E16.5. Utilizzando primer a cavallo di un introne è stato possibile verificare la corretta taglia della banda ottenuta su gel d'agarosio ed escludere la presenza di un amplificato derivante da DNA genomico contaminante. Esperimenti ripetuti (n=3) di Real Time PCR in cui, nei medesimi campioni, la grelina è stata quantificata normalizzando i dati con la contemporanea quantificazione del 18s hanno dimostrato che i) l'espressione di grelina non è molto abbondante, essendo i cicli soglia (Ct) di tutti i campioni in tutti gli esperimenti compresi tra 30 e 36 ii) a 15 e 16.5

dpc (*days post coitum*) l'espressione risulta aumentata rispetto ai tempi precedenti di circa 6 volte (risultato statisticamente significativo).

Ibridazione *in situ*. Per effettuare l'ibridazione *in situ* sono state scelte sezioni su vetrino precedentemente preparate al criostato di embrioni a 10.5 e 16.5 dpc per poter confrontare due tempi in cui l'espressione totale della grelina fosse quantitativamente differente, sulla base dei risultati precedentemente ottenuti in Real Time PCR.

Sono state prodotte mediante trascrizione con T3 o T7 RNA polimerasi sia la sonda senso che la sonda antisenso, entrambe marcate con DIG. Una corsa su gel prima dell'ibridazione ha consentito di appurare la buona qualità dell'RNA così prodotto.

La sonda senso è stata utilizzata come controllo, per escludere la possibilità di un'ibridazione aspecifica. I risultati ottenuti hanno confermato l'assenza di ibridazione in presenza della sonda senso con sezioni di entrambi gli stadi di sviluppo embrionale selezionati.

La sonda antisenso ha dimostrato un'ibridazione specifica e confinata.

A 10,5 dpc la grelina risulta espressa esclusivamente a livello del tubo neurale dell'embrione, in modo specifico e ripetitivo. Non è stata osservata espressione in nessun altro organo o tessuto.

A 16,5 dpc l'embrione è già nelle fasi finali dello sviluppo; a questo stadio l'espressione di grelina con la sonda antisenso è stata rilevata i) a livello dello stomaco, in cellule di rivestimento epiteliali o comunque cellule a diretto contatto con il lume gastrico ii) a livello intestinale, anche in questo caso in cellule a contatto con il lume. Non è stata osservata alcuna ibridazione in cellule o tessuti derivanti da cresta neurale, come ci si sarebbe potuti aspettare considerando l'espressione a E10,5.

Costruzione vettori per topi transgenici. L'intero cDNA della grelina murina è stato clonato all'interno di due diversi vettori per l'espressione rispettivamente cuore-specifica e muscolo scheletrico-specifica. La specificità di espressione è garantita dalla presenza di sequenze promotrici (α -MHC per il cuore e MLC1f per il muscolo scheletrico) ed enhancer (MLC per il muscolo scheletrico).

Il sequenziamento del frammento clonato all'interno di entrambi i vettori garantisce che i costrutti sono ora pronti per essere utilizzati.

COMMENTI E PROSPETTIVE

Per quanto riguarda la prima parte del progetto, ovvero lo studio di un'eventuale funzione di grelina durante lo sviluppo, i risultati ottenuti confermano quanto già osservato nell'adulto, cioè una preponderante espressione a livello del sistema gastro-intestinale, per lo meno ad uno stadio di sviluppo relativamente avanzato. Più interessante è invece l'espressione precoce a livello del tubo neurale. Per utilizzare al meglio questi dati e procedere con il progetto ci proponiamo di i) analizzare -sempre con ibridazione *in situ*- altri stadi dello sviluppo embrionale per avere un quadro più dettagliato della situazione ai diversi tempi ii) confermare in immunostochimica la reale presenza della proteina laddove è stata osservata l'espressione di mRNA iii) analizzare il significato funzionale dell'espressione di grelina, soprattutto a livello di tubo neurale o, più precocemente, di cresta neurale. Intendiamo sviluppare quest'ultimo punto con l'ausilio di colture *in vitro* di cellule derivate da cresta neurale sulle quali andare a valutare effetti quali il movimento di calcio, la protezione da apoptosi variamente indotta, l'induzione della proliferazione.

Per quanto riguarda invece la produzione di topi transgenici, sarà necessario effettuare la microiniezione in oociti dopo aver eliminato la porzione di vettore contenente le sequenze per la replicazione in batteri. Gli oociti microiniettati verranno reimpiantati in una madre surrogata. Alla nascita della prima generazione, dal momento che l'inserzione del transgene avviene in modo casuale, sarà necessaria la selezione dei topi che i) abbiano inserito il transgene nella linea germinale ii) abbiano inserito il transgene in una porzione trascrivibile di cromosoma (ad es. no centromeri, no telomeri...) senza danneggiare nessun altro gene fondamentale per lo sviluppo o il cui danneggiamento potrebbe mascherare gli effetti del transgene. Questa prima selezione verrà effettuata in RT PCR con primer specifici per il costrutto transgenico e/o mediante Southern blot.

Una volta selezionata la linea di topi transgenici desiderata, le prime osservazioni saranno a livello macroscopico: se e come la presenza del transgene influenzi lo sviluppo embrionale, se una volta nati i topi abbiano caratteristiche o difetti evidenti.

Il maggior interesse per il nostro gruppo di lavoro sarà però la verifica delle potenzialità protettive dell'espressione tessuto-specifica di grelina. Gli esperimenti verranno condotti inducendo un danno cardiaco (ad esempio somministrazione di doxorubicina per causare cardiotossicità o ligazione aortica per causare ischemia) o muscolare (danno meccanico al

muscolo stesso o al nervo innervante il muscolo) e confrontando topi transgenici e wild type per la capacità di recuperare dopo il danno.

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.

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.

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.

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.

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.