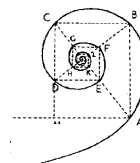




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVI

Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED/49

**Interazione Calcium-sensing receptor-Filamina A e
caratterizzazione del pathway di trasduzione del segnale**

Dottorando: Alessandra Mingione

Matricola N° R08143

TUTORE: Dott.ssa LAURA SOLDATI

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Prof. Mario Clerici

SOMMARIO

Introduzione: Il calcium sensing receptor (CaSR) è un recettore a sette domini transmembrana, un dominio extracellulare e una coda citoplasmatica, accoppiato a proteine G, con un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi del calcio. È in grado di sentire variazioni della concentrazione di calcio extracellulare ($[Ca^{2+}]_o$) e di attivare una complessa via di segnalazione che porta ad aumento dei livelli di inositolo-1,4,5-trifosfato e di calcio a livello intracellulare, all'attivazione della proteinasi C e della cascata delle MAPK, per la cui attivazione è necessaria l'interazione del CaSR con la proteina scaffold Filamina A (FLNA). Proprio all'interno della regione di legame con la Filamina A cade il polimorfismo della coda del recettore Arg990Gly, che induce un guadagno di funzione nell'attività del recettore, una maggiore sensibilità al calcimimetico R-568 ed una differente propagazione del segnale rispetto al CaSR WT. Inoltre entrambe le proteine sono coinvolte nei tumori delle paratiroidi ed è stato dimostrato che il CaSR è down-regolato in questi tumori.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è confermare l'ipotesi che il CaSR wild-type e polimorfico R990G seguano due differenti vie di trasduzione del segnale e di valutare il coinvolgimento della FLNA in questo processo. Inoltre è stata anche investigata l'interazione CaSR-FLNA in adenomi e carcinomi della paratiroide.

Materiali e Metodi: la FLNA è stata silenziata con uno specifico Short interfering RNA in cellule HEK-293 contemporaneamente trasfettate con il CaSR WT o polimorfico. L'attività del recettore è stata valutata misurando l'attività di ERK 1/2 tramite Western blot. L'espressione della FLNA e del CaSR sono state valutate con tecniche di immunofluorescenza in cellule embrionali renali in coltura HEK-293 e con tecniche di immunofluorescenza e immunohistochimica in adenomi e carcinomi della paratiroide. I livelli di mRNA di CaSR e FLNA sono stati misurati con Real-Time PCR in cellule HEK-293 e in 30 adenomi della paratiroide; gli stessi campioni di adenomi paratiroidi sono stati genotipizzati per lo SNP R990G utilizzando la tecnica Taqman genotyping assay.

Risultati: i dati Western Blot hanno mostrato una diminuzione sia dell'espressione che dell'attività di entrambe le forme recettoriali (CaSR WT e CaSR R990G) in assenza di FLNA. I risultati di Real-Time su cellule HEK-293 mostrano una diminuzione dell'espressione dell'mRNA sia del CaSR WT (0.55 ± 0.23 vs 1.56 ± 0.80 , p-value=0.07) che CaSR R990G (0.51 ± 0.37 vs 1.82 ± 1.43 , p-value=0.41) in assenza di FLNA, rispetto al controllo. La presenza del calciomimetico R-568 sembrerebbe mascherare le differenze in assenza di FLNA, mantenendo il guadagno di funzione del CaSR R990G. Il CaSR e la FLNA risultano entrambi down-regolati nei tumori delle paratiroidi. L'immunoistochimica di adenomi e carcinomi della paratiroide ha mostrato una diminuzione dell'espressione della FLNA correlata al grado di malignità tumorale. Inoltre la correlazione tra i livelli di mRNA del CaSR e della FLNA e l'allele minore dello SNP R990G in 30 adenomi ha mostrato un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA sia del CaSR (n=28 AA, 1.07 ± 0.97 ; n=2 AG, 3.39 ± 1.16 , p-value=0.003) che della FLNA (n=28 AA, 0.14 ± 0.08 ; n=2 AG, 3.35 ± 0.09 , p-value=0.002) in presenza del genotipo eterozigote AG.

Conclusione: Questo studio ci ha permesso di dimostrare che la FLNA è necessaria per l'attivazione del pathway di ERK1/2 attivato sia dal CaSR WT che polimorfico. Si può quindi ipotizzare che il guadagno di funzione del CaSR R990G possa essere dovuto all'interazione più stabile con la FLNA indotta dal polimorfismo non conservativo nella regione di legame con la FLNA. Inoltre possiamo concludere che l'interazione tra CaSR e FLNA è importante anche nei tumori paratiroidi, in cui abbiamo dimostrato una correlazione positiva dell'espressione delle due proteine, entrambe down-regolate nei tumori. La correlazione dell'espressione dell'mRNA di FLNA e CaSR con il polimorfismo R990G ha mostrato un aumento dei livelli di espressione di entrambe le proteine in presenza della variante polimorfica, lasciandoci ipotizzare un ruolo protettivo nei tumori delle paratiroidi, con un meccanismo ancora sconosciuto.

ABSTRACT

Background: Calcium sensing receptor (CaSR) is a seven-transmembrane domains G-protein coupled receptor, with a large extracellular domain and a intracellular tail. It is important for maintaining the calcium steady state. In fact, it is able to detect variations in the extracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_o$) and to activate a complex signal transduction pathway that causes increase of intracellular levels of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and calcium, activation of PKC and of MAPK cascade. The MAPK activation requires CaSR interaction with the scaffold protein Filamin A (FLNA). Just inside the binding region with the FLNA there is a polymorphism of the receptor tail, R990G, that induces a gain of function in the activity of the receptor, increasing the sensitivity to the calcimimetic R-568 and inducing different signal propagation compared to the WT CaSR. Moreover, both CaSR and FLNA are involved in tumors of the parathyroid glands and it has been demonstrated that CaSR activity is down-regulated in these tumors.

The aim of this thesis is to confirm the hypothesis that the wild-type and polymorphic CaSR follow two different signal transduction pathways and to investigate the involvement of FLNA in this process. Therefore, we investigate the interaction CaSR-FLNA in parathyroid adenomas and carcinomas.

Materials and Methods: FLNA was silenced with a Short interfering RNA in renal embryonic HEK-293 cells transfected with WT or polymorphic CaSR. The CaSR activity was assessed by measuring the activity of ERK 1/2 by Western blot. The expression of FLNA and CaSR were evaluated by immunofluorescence in HEK-293 cells and by immunofluorescence and immunohistochemistry in parathyroid adenomas and carcinomas. CaSR and FLNA mRNA levels were measured with Real-Time PCR in HEK-293 cells and in 30 parathyroid adenomas; parathyroid adenomas of the same samples were genotyped for the SNP R990G using the technique Taqman genotyping assay.

Results: Western Blot data showed a decrease of expression and activity in both forms of the receptor (WT CaSR and R990G CaSR) in the absence of FLNA. Real-Time results of HEK-293 cells show a decrease of mRNA expression in both WT CaSR (0.55 ± 0.23 vs 1.56 ± 0.80 , p -value=0.07) that R990G CaSR (0.51 ± 0.37 vs

1.82±1.43, p-value=0.41) in the absence of FLNA compared to the control. The presence of the calcimimetic R-568 seems to mask the differences in the absence of FLNA, keeping the gain of function of R990G CaSR. The CaSR and FLNA resulted down-regulated in parathyroid glands tumors. Immunohistochemistry of parathyroid adenomas and carcinomas showed a decrease of FLNA expression related to the degree of tumor malignancy. Furthermore, the correlation between CaSR and FLNA mRNA levels and R990G SNP in 30 adenomas showed a significant rise of mRNA expression of both CaSR type (n=28 AA, 1.07±0.97; n=2 AG, 3.39±1.16, p-value=0.003) and FLNA (n=28 AA, 0.14±0.08; n=2 AG, 3.35±0.09, p-value=0.002) in the presence of the heterozygous genotype AG.

Conclusion: this study has allowed us to show that FLNA is required for the CaSR-induced stimulation of ERK1/2 activity, both in WT CaSR and R990G CaSR. So we could hypothesize that the gain of function of the CaSR R990G could be due to a stronger interaction with FLNA, induced by non-conservative polymorphism in the binding region for FLNA. Furthermore, we can conclude that the CaSR and FLNA interaction is also crucial in parathyroid tumors, in which we demonstrated a positive correlation of two proteins expression, both down-regulated in tumors. The correlation of FLNA and CaSR mRNA expression with R990G polymorphism showed the increase of both proteins expression in the presence of the polymorphic variant, suggesting a protective role in the parathyroid glands tumors, with unknown mechanism.

LISTA SIMBOLI

CICN5=canale del Cloro 5; NPT2=Cotrasportatore Na^+/P_i dipendente tipo II; PCLN1=Paracellina 1; VDR=Recettore Vitamina D; PTH= Paratormone; CaSR= Calcium Sensing Receptor; FLNA= Filamina A; Ca^{2+} =Calcio; PO_4^- =Fosfato; GPCR=Recettore accoppiato a proteine G; mGluR=Recettore metabotropico del neurotrasmettitore glutammato; VR=Recettore vomeronasale; GABA=acido γ aminobutirrico; UTR=untranslator region; SP1= Specificity Protein 1; IL-1b= interleuchina 1b; VDRE=Elementi del recettore della vitamina D; DNA=acidodesossiribonucleico; NF-kB=Fattore Nucleare k delle cellule B attivate; ECD=Dominio extracellulare; Stat1= Segnale di trasduzione ed attivatore della trascrizione 1; TMD=Dominio Transmembrana; HEK=Human Embrionic Kidney Cell; VFTD=Venus Fly Trap Domain; PKC=fosfochinasi C; PKA=Fosfochinasi A; PLC=Fosfolipasi C; PLD=Fosfolipasi D; IP_3 =Inositolo trifosfato; DAG=Diacilglicerolo; PIP_2 =Fosfatidil-inositolo bifosfato; AA=Acido arachidonico; PI-4k=Fosfatidil inositolo 4 chinasi; MAPK=Mitogen Activated Protein Kinase; cAMP=Adenosina monofosfato ciclica; ERK=Extracellular signal regulated kinase; Mg^{2+} =Magnesio; Zn^{2+} =Zinco; Mn^{2+} = Manganese; Co^{2+} =Cobalto; Fe^{2+} =Ferro; Ni^{2+} =Nichel; Pb^{2+} =Piombo; K^+ =Potassio; Cl^- =Cloro; Na^+ =Sodio; NaCl=Cloruro di Sodio; P_i =Fosfato; NKCC2=Cotrasportatore Cloro-Sodio-Potassio; CLDN16=Claudina16; CLDN14=Claudina14; FHH=Ipercalcemia Ipcalcinuria Familiare; NSHPT=Iperparatiroidismo severo neonatale; PHPT= iperparatiroidismo primario; SHPT=Iperparatiroidismo secondario; ADH=Ipcalcemia autosomica dominante; SNP=Polimorfismo di singolo nucleotide; RNA=acido ribonucleico; WT=Wild type; siRNA= small interfering RNA; OR=Odds Ratio;

INDICE

SOMMARIO

ABSTRACT

LISTA SIMBOLI

1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Il calcium-sensing receptor</i>	2
1.2 <i>Struttura del gene</i>	3
1.3 <i>Struttura della proteina</i>	4
1.4 <i>Meccanismo d'attivazione del CaSR</i>	9
1.5 <i>Agonisti del CaSR</i>	10
1.6 <i>Pathway di segnalazione del CaSR</i>	11
1.7 <i>Espressione tissutale del CaSR</i>	18
I) <i>Paratiroide</i>	
II) <i>Tiroide</i>	
III) <i>Rene</i>	
IV) <i>Osso</i>	
V) <i>Apparato gastro-enterico</i>	
VI) <i>Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio</i>	
1.8 <i>Il CaSR e l'omeostasi del calcio</i>	29
1.9 <i>Fisiopatologia del CaSR</i>	31
I) <i>malattie monogeniche</i>	
II) <i>malattie complesse</i>	
1.10 <i>Il CaSR come target farmacologico: il CaSR e i calciomimetici</i>	36

1.11 I polimorfismi del CaSR	38
1.12 Studio funzionale del polimorfismo R990G	40
2. SCOPO DELLA TESI	45
2.1 Obiettivo dello studio	46
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Colture cellulari	48
3.2 Trasfezione transiente	48
3.3 Silenziamento genico (RNA interference)	48
3.4 Western blot	49
3.5 Quantitative real time PCR	50
3.6 Genotipizzazione	51
3.7 Immunoistochimica (IH) Filamina A	51
3.8 Immunofluorescenza (IF) CaSR e FLNA	52
3.9 Analisi statistica	52
4. RISULTATI	53
4.1 Effetto del silenziamento della Filamina A sull'espressione del Calcium-sensing receptor	54
4.2 Effetto del silenziamento della FLNA sull'attività del Calcium-sensing receptor	59
4.3 Espressione della Filamina A nei tessuti tumorali paratiroidei	61
4.4 Espressione della Filamina A e del CaSR in cellule tumorali della paratiroide	63

<i>4.5 Correlazione dei livelli di mRNA di FLNA e CaSR in presenza dello SNP R990G del CaSR nei tumori delle paratiroidi</i>	65
<i>4.6 Discussione</i>	66
5. CONCLUSIONE	71
6.BIBLIOGRAFIA	73

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Calcium-sensing receptor

Già nel 1991 si affacciava l'idea dell'esistenza di una molecola in grado di percepire le variazioni di calcio extracellulare nelle ghiandole della paratiroide e di attivare una serie di risposte cellulari attraverso delle proteine G ⁽¹⁾. Nel 1993 è stato clonato per la prima volta da cellule paratiroidee bovine un recettore sensibile al calcio accoppiato a Proteine G, chiamato Calcium Sensing Receptor (CaSR) ⁽²⁾. Poco dopo, lo stesso recettore è stato identificato anche nelle paratiroidi e nel rene umano ^(3,4). Una serie di studi successivi hanno dimostrato che il recettore ha un'ampia distribuzione tra le specie: lo troviamo in uccelli, rettili, anfibi e mammiferi. Inoltre sembra avere un'origine ancestrale: lo si ritrova infatti con un'alta omologia in organismi come i pesci dove il recettore può essere utile non solo nel mantenere l'omeostasi del calcio, ma anche per l'orientamento tra le correnti saline del mare, essendo presente in organi olfattivi, come l'organo vomero-nasale nel pesce palla ⁽⁵⁾. Il recettore, infatti, è in grado di percepire non solo variazioni del calcio extracellulare, ma anche cambiamenti nella concentrazione salina ⁽⁶⁾.

Il CaSR fa parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), in particolare della famiglia C, a sua volta formata da 3 sottogruppi di recettori: al gruppo I appartiene il recettore metabotropico del neurotrasmettitore glutammato (mGluR), espresso nel sistema nervoso centrale, con un'alta omologia per il CaSR; il gruppo II comprende il CaSR e il recettore vomero-nasale (VR), espresso nell'organo vomeronasale anche dei ratti, atto alla percezione dei feromoni; nel gruppo III, infine, ritroviamo la sottofamiglia dei recettori per i neurotrasmettitori GABA. Questi recettori hanno un'alta omologia nella struttura proteica costituita da 3 domini: una regione extracellulare (ECD) che contiene il sito di riconoscimento per i rispettivi ligandi, un dominio transmembrana formato da 7 eliche idrofobiche e un'estremità C-terminale intracellulare che, attraverso il legame con le proteine G, porta all'attivazione della loro cascata di segnalazione. La conservazione lungo l'evoluzione della struttura dei recettori e la loro distribuzione in tante specie dà l'idea della rilevanza di molecole come il CaSR nelle funzioni cellulari ^(7,8).

1.2 Struttura del gene

Il gene umano del CaSR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q21-q24) (^{9,10}), è costituito da 102 Kb, di cui circa 5 Kb sono codificanti e formano 7 esoni: la regione codificante per il dominio extracellulare si estende dall'esone 2 al 5' dell'esone 7, mentre il resto dell'esone 7 codifica per i domini transmembrana e C-terminale. L'esone 1 e l'estremità 3' dell'esone 7 sono regioni non tradotte (figura 1).

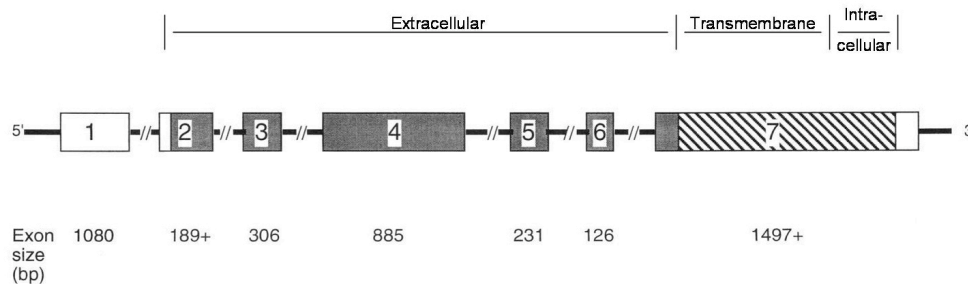


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura del gene del CaSR. Il gene umano del CaSR si espande per 102 Kb di DNA genomico ed è organizzato in 7 esoni, la cui dimensione è indicata in basso, e da 6 introni. La regione codificante per il dominio ECD si estende dall'esone 2 al 5' dell'esone 7 (regioni indicate in nero), mentre il resto dell'esone 7 codifica per il dominio TMD e Cterminale (regione tratteggiata). L'esone 1 e l'estremità 3' dell'esone 7 sono regioni non tradotte (regioni bianche). La figura è stata modificata da Pearce SHS et al, J Clin Inv 1995 (¹¹).

La regione regolatrice del gene presenta due promotori: quello più a monte ha una struttura più classica con le TATA e CAAT boxes, quello a valle è ricco di basi CG ma non ha la TATA box. Il motivo della presenza di due diverse regioni regolatrici non è ancora ben chiaro, ma potrebbe essere attribuito ad una trascrizione tessuto specifica o stimolo specifica (¹²). Entrambi i promotori contengono regioni regolatrici specifiche: sono presenti elementi responsivi alla vitamina D (VDRE), che inducono la trascrizione del recettore in presenza di 1,25-(OH)2D3 e regioni riconosciute da NFκB, attivate dalla citochina IL-1β. Questo spiega come anche la trascrizione del gene sia finemente regolata nel quadro generale dell'omeostasi del

calcio (^{13,14}). Sono note anche delle varianti di splicing a carico del gene del CaSR. Una dà origine ad un'inserzione di 30 nucleotidi (quindi 10 aminoacidi) nella regione ECD, che però non sembra avere effetti sull'attività del recettore (⁷). Un'altra variante di splicing produce un recettore tronco non funzionante, che potrebbe interferire con l'attività normale del recettore (¹⁵). Eventi di splicing alternativo dovuti a mutazioni, che causano la perdita di un esone, sono noti in diverse patologie (^{16,17}). Le mutazioni rare e le variazioni polimorfiche note a carico del gene sono molte: si tratta sia di variazioni nelle regioni codificanti che provocano o no cambi aminoacidici, sia di variazioni nelle regioni regolatrici.

Le mutazioni danno spesso origine a malattie rare a carattere ereditario, i polimorfismi possono essere invece coinvolti nell'insorgenza di patologie complesse (i polimorfismi più frequenti sono A986S, R990G e Q10011E, a livello della coda citoplasmatica del recettore: l'argomento verrà meglio approfondito successivamente).

1.3 Struttura della proteina

Il recettore maturo è costituito da 1078 aminoacidi (aa) che formano i 3 domini funzionali: l'ampio dominio N-terminale (612 aa), localizzato nella porzione extracellulare (extracellular domain, ECD), sede del sito di legame per il calcio; il dominio transmembrana (TMD), costituito da 7 eliche idrofobiche (250 aa), che ancora il recettore alla membrana, ed il dominio C-terminale, nel versante citoplasmatico (216 aa), responsabile della trasmissione del segnale (3) (Figura 2).

L'analisi diretta di sequenziamento del ECD ha rivelato la presenza di un peptide-segnale di 19 aminoacidi in posizione N-terminale che dirige il polipeptide nascente nel reticolo endoplasmatico (ER) e che viene successivamente rimosso durante la maturazione della proteina. Il recettore maturo, isolato da cellule HEK trasfettate con il cDNA umano del CaSR, inizia con una tirosina alla posizione aminoacidica 20 (¹⁸). Sulla superficie cellulare la proteina funziona in forma dimerica. I monomeri sono connessi attraverso interazioni covalenti e non covalenti. Le analisi dei western blot del CaSR hanno confermato la presenza di una banda di circa 120 kDa che corrisponde al monomero non glicosilato, di una banda di 140 kDa che

corrisponde al monomero glicosilato immaturo ed una banda di 160 kDa che corrisponde alla forma matura dello stato di glicosilazione (^{19,20}). Un'ulteriore banda a circa 250 kDa mostra la forma dimerica del recettore (²¹).

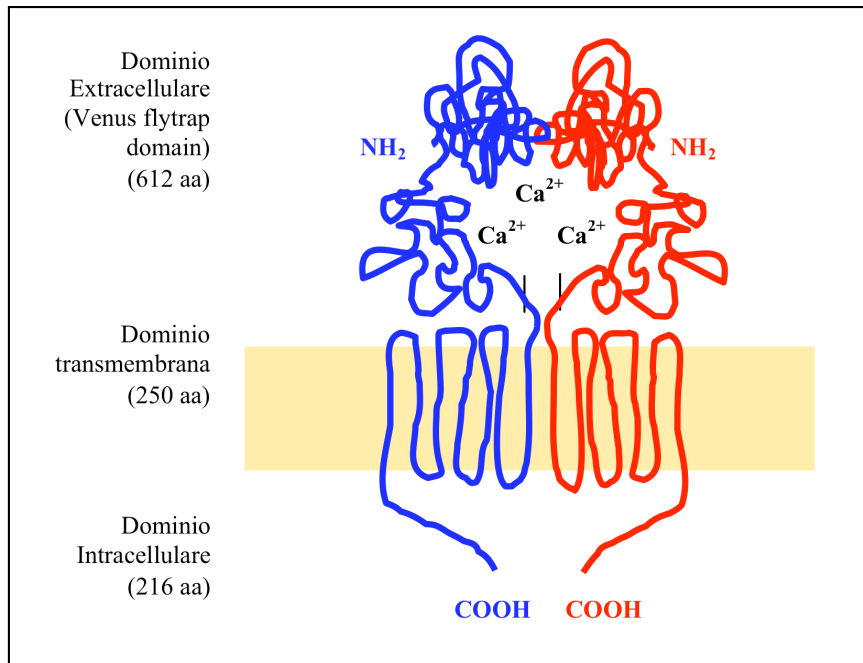


Figura 2. Struttura proteica del CaSR. Il recettore funziona come dimero e ogni elemento del dimero è costituito da un ECD (sito di legame del calcio), un TMD e un dominio C-terminale.

Il CaSR subisce una prima N-glicosilazione nel reticolo endoplasmatico (forma immatura da 140 kDa), viene poi trasportato all'apparato di Golgi dove subisce la glicosilazione definitiva (forma matura da 160 kDa), per poi essere trasportato sulla superficie cellulare. L'interazione del CaSR con le proteine RAMPS (receptor activity modifying proteins), una famiglia di proteine in grado di influenzare traffico intracellulare, glicosilazione, specificità di ligandi e produzione di secondi messaggeri in diversi recettori, sembra essere fondamentale per l'uscita dal reticolo endoplasmatico (²²). Esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno dimostrato che 8 sono i 10 siti che vengono efficientemente glicosilati (asparagine in posizione 90, 130, 261, 287, 446, 468, 488 e 541) e che l'eliminazione di 4 o 5 di

questi siti produce una sostanziale riduzione (50-90%) della presenza del recettore sulla membrana e della sua attività ⁽²⁰⁾. La glicosilazione può influenzare diverse funzioni in una proteina: folding, stabilità, traffico intracellulare, espressione cellulare e secrezione. Per quanto riguarda il CaSR, sembra che l'N-glicosilazione sia fondamentale per il traffico intracellulare e per l'esposizione sulla superficie cellulare, così come la dimerizzazione ⁽²¹⁾.

I dimeri del CaSR si formano già a livello del reticolo endoplasmatico ⁽²³⁾ e sono legati da ponti di-zolfo, infatti sono presenti ben 20 residui di cisteina (17 nel ECD, 1 nel primo e 1 nel secondo loop extracellulare del TMD e 1 nella quinta elica TMD); studi recenti hanno mostrato che le cisteine in posizione 129 e 131 sono fondamentali per la dimerizzazione ^(24, 25). Per la stabilità del dimero risultano altrettanto importanti interazioni non covalenti a carico delle leucine in posizione 112 e 156, capaci di supplire anche a mutazioni a carico delle due cisteine ⁽²⁶⁾ (figura 3). La dimerizzazione è fondamentale per mantenere il recettore nella conformazione inattiva. Il dominio extracellulare in forma dimerica assume una conformazione a due lobi, chiamata Venus Fly Trap Domain (VFTD), cioè dominio ad ali di farfalla, le quali restano aperte quando non c'è il ligando (forma inattiva) e si chiudono dopo il contatto con esso (forma attiva) proprio grazie ai cambiamenti dei legami tra i due dimeri ^(27, 28). All'interno del VFTD sono state identificate sequenze necessarie per il corretto folding del recettore (residui 48-59, loop I del primo lobo) e sequenze che controllano il passaggio del recettore nella forma attiva dopo il contatto con il ligando (residui 117-137, loop II del primo lobo) ⁽²⁹⁾. I residui responsabili del legame con il calcio sono le serine 147 e 170 ⁽³⁰⁾, ma studi di cristallografia hanno mostrato che sono coinvolti anche la treonina 138 e il glutammato 297 ⁽¹⁹⁾.

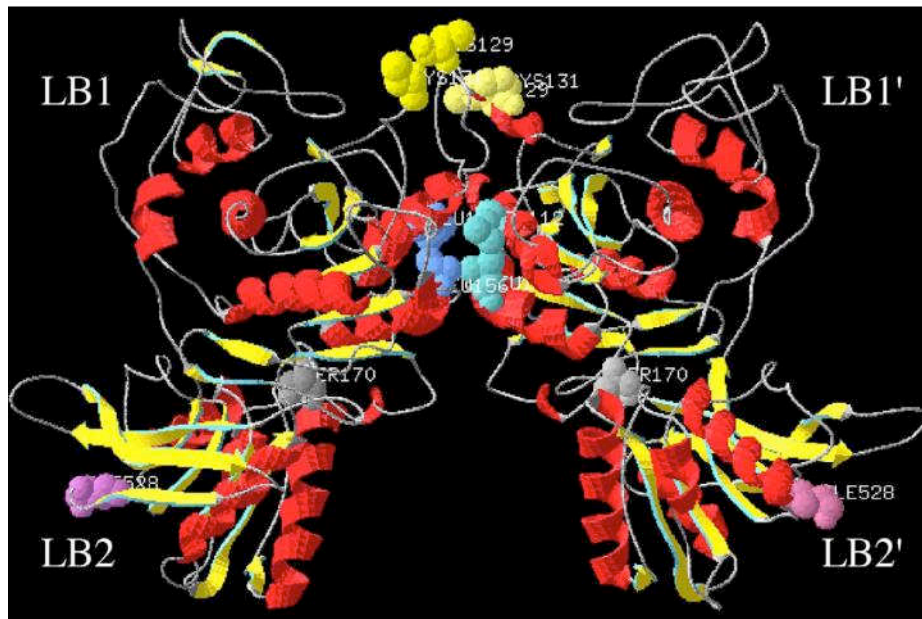


Figura 3. Modello molecolare della struttura dimerica dei domini ECD del CaSR. Ogni dominio ECD è costituito da due lobi (LB1 e LB2). Nel primo lobo sono indicati i residui di cisteina 129 e 131 (sfere in giallo), responsabili della formazione dei ponti di-solfuro, e i residui di leucina 112 e 156 (sfere azzurre), responsabili della formazione di interazioni non covalenti. Nel secondo lobo sono indicate le serine 170 (sfere grigie) coinvolte nel legame del calcio. In rosa è invece indicato l'ultimo residuo dell'ECD. Figura da Bai M, Cell Calcium, 2004 (8).

Il dominio transmembrana ha come funzione principale l'ancoraggio del recettore alla membrana, ma riveste un importante ruolo nelle interazioni con i ligandi e i trasduttori del segnale a valle, grazie ai tre loop extracellulari da una parte e ai tre loop intracellulari dall'altra. I loop esterni EC-2 e 3 sono siti di legame per gli agonisti (^{31, 32, 33, 34}) mentre i loop interni IC-1, 2 e 3 sono siti di contatto con le proteine G, PKC e PLC, cioè con i primi anelli di contatto della catena di segnalazione del CaSR (^{35, 36}). La regione C-terminale inizia al residuo leucina 863 e si estende nel citoplasma per 216 aminoacidi. Questa regione, insieme al peptide segnale, è quella meno conservata nelle specie, ma in realtà i primi 83 residui (fino al 946) sono risultati fondamentali per la trasduzione del segnale: mutagenesi a

carico di alcuni di questi residui risultavano in una mancata risposta al calcio esterno (^{37, 38, 39}). La proteina trunca al residuo 888 non è più in grado di attivare il pathway della PKC (^{40, 41}). Sono 3 i siti di fosforilazione per PKC a carico della coda C-terminale (altri due sono nei loop intracellulari del TMD) e si trovano a livello dei residui 888, 895 e 915 (⁴²). Inoltre sono presenti due possibili siti di fosforilazione per PKA (Ser899 e Ser900), la cui funzione rimane ancora poco chiara (^{4,5}). La coda citoplasmatica del CaSR interagisce direttamente anche con una proteina del citoscheletro, la filamina A, coinvolta nell'attivazione delle MAP chinasi nel pathway del recettore (^{43, 44}) (figura 4).

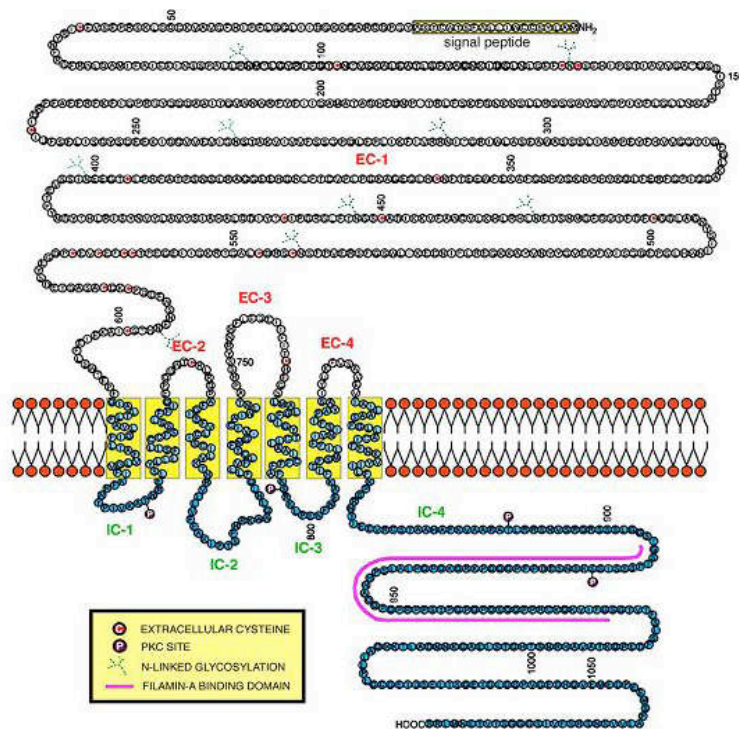


Figura 3. Funzione dei domini proteici del CaSR. Possiamo distinguere nel dominio extracellulare N-terminale (EC-1) 20 residui di cisteina ed i siti N-glicosilazione; nel dominio transmembrana caratterizzato da 3 loops extracellulari (EC-2,3,4) e da 3 loops intracellulari (I-1,2,3) sono visibili 2 siti di fosforilazione per la PKC, infine nel dominio C-terminale (IC-4) possiamo vedere altri siti di fosforilazione per la PKC ed un sito di legame per la Filamina A. Figura da Chang W, Cell Calcium, 2004 (⁴⁵).

1.4 Meccanismo d'attivazione del CaSR

Il modello proposto per spiegare l'attivazione del CaSR in seguito ad interazione con il calcio, o con altri agonisti, si basa su analisi di cristallografia fatte sul recettore mGluR1⁽⁴⁶⁾, che ha elevata omologia con il CaSR. Il modello prevede l'esistenza di due stati del recettore: uno stato aperto e inattivo (recettore non legato) e uno stato chiuso e attivo (recettore legato) (figura 5). Nello stato aperto e inattivo i donatori di elettroni del CaSR, quali i gruppi carbossilici di residui acidi e/o i gruppi idrossilici di serine e treonine, sono protetti da legami ad idrogeno con l'acqua. Quando aumenta la concentrazione di calcio a livello extracellulare, il calcio comincia a sostituire le molecole di acqua attorno ai donatori di elettroni. Grazie alla sua multivalenza, il calcio è in grado di chelare due o più donatori di elettroni in punti diversi del recettore; questo stabilizza la struttura chiusa del recettore, che permette l'attivazione del signaling a valle del CaSR⁽⁴⁷⁾. Studi di mutagenesi hanno permesso di identificare due serine nel dominio extracellulare N-terminale del CaSR umano, le serine 147 e 170, che risultano particolarmente critiche per l'attivazione del recettore⁽³⁰⁾ e che sono probabilmente i donatori di elettroni che interagiscono con il Ca²⁺. Anche il pH è in grado di influenzare la capacità degli agonisti di attivare il CaSR⁽⁴⁸⁾; ciò può essere dovuto al fatto che cambiamenti di pH possono produrre cambiamenti conformazionali del recettore e/o cambiamenti nell'energia di idratazione di cationi e donatori di elettroni sul recettore. Un pH alcalino potenzia la capacità degli agonisti di attivare il CaSR, mentre un pH acido ne riduce la capacità attivatoria. Infatti, in un pH alcalino, l'aumento di ioni OH⁻, quindi di cariche negative, potrebbe indebolire i legami ad idrogeno tra molecole di acqua e donatori di elettroni, facilitando l'interazione del calcio con questi ultimi. Al contrario, in un pH acido, l'aumento di ioni H⁺, quindi di cariche positive sfavorisce l'interazione del calcio con il recettore⁽⁴⁵⁾.

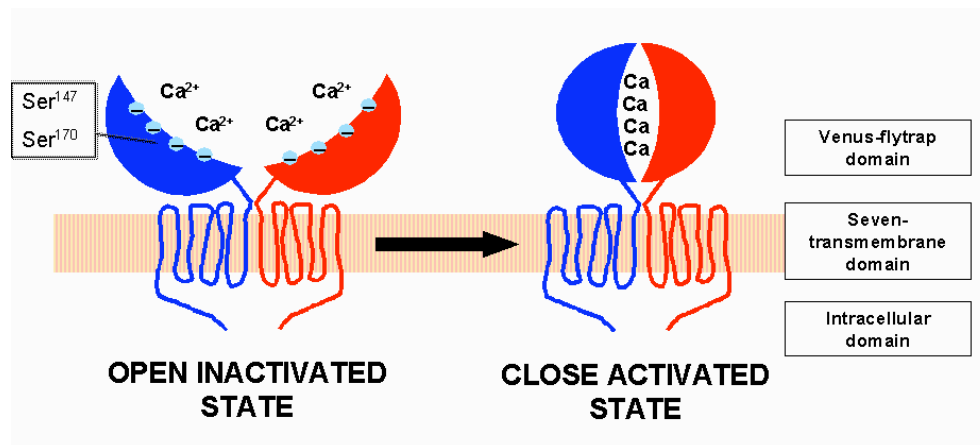


Figura 5. Modello di attivazione del CaSR: nella figura sono riportati i due presunti stati del recettore, uno stato aperto e inattivato, dove il recettore non lega il calcio, e uno stato chiuso e attivato, in cui il recettore lega il calcio. Sono indicate le serine 147 e 170, che sembrano essere particolarmente importanti per il legame con il calcio.

1.5 Agonisti del CaSR

Il calcio è il principale agonista del CaSR. A prima vista non sembra essere un agonista particolarmente potente, infatti produce la massima attivazione del CaSR ad una concentrazione circa 3.5 mM, mentre la $[Ca^{2+}]$ extracellulare in condizioni fisiologiche è tipicamente 1.3 mM ⁽⁷⁾. Il legame del Ca^{2+} al CaSR è però un processo fortemente cooperativo (il coefficiente di Hill è circa 3) ⁽⁴⁹⁾ e questo rende il CaSR sensibile a piccoli incrementi e decrementi (~200 μM) della $[Ca^{2+}]$ extracellulare. La configurazione dimerica del recettore può contribuire a questa proprietà. Oltre al calcio, altre molecole sono in grado di agire come agonisti e attivare il CaSR. Possiamo distinguere due classi di agonisti, quelli di tipo I e quelli di tipo II. Gli agonisti di tipo I sono in grado di attivare il CaSR in assenza di calcio extracellulare; di questa classe fanno parte: metalli di e trivalenti come Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , La^{3+} e Gd^{3+} ⁽⁵⁰⁾, che attivano il CaSR con diversa efficacia, per esempio il Mg^{2+} produce incrementi di $[Ca^{2+}]_i$ due/tre volte inferiori rispetto a quelli prodotti dal Ca^{2+} ⁽⁵⁾; cationi polivalenti come polilisine e poliarginine ⁽⁵¹⁾; composti policationici come gli antibiotici aminoglicosidici, tra cui neomicina ^(52, 53) gentamicina e tobramicina ⁽⁵⁴⁾. Gli agonisti di tipo II invece non

sono in grado di attivare il CaSR in assenza di calcio extracellulare, ma si comportano come modulatori allosterici modificando l'affinità del recettore verso il Ca^{2+} ; di questa classe fanno parte calciomimetici e calciolitici. I calciomimetici aumentano l'affinità del recettore verso il calcio e hanno quindi un'azione attivante. Sono calciomimetici naturali le poliamine (spermina, spermidina e putrescina), le fenilalchilamine e gli L-aminoacidi, che sono stati poi modificati per produrre farmaci che agiscono sul CaSR (calciomimetici di sintesi). Gli aminoacidi, in particolare gli aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina), stimolano il recettore sia in presenza che in assenza di Ca^{2+} ⁽⁵⁵⁾. I calciolitici agiscono invece nel modo opposto, determinando riduzione dell'affinità del recettore verso il calcio, e hanno quindi un'azione inibente. Il sito di legame per i vari agonisti è diverso; gli agonisti di classe I si legano nel dominio ECD, quelli di classe II, poliamine e aminoacidi, si legano nell'ECD, mentre gli altri calciomimetici e i calciolitici risultano interagire con il CaSR prevalentemente a livello dei domini trans-membrana 6 e 7 (TM6-TM7); sembra che i residui particolarmente critici per l'interazione, sia con i calciomimetici che con i calciolitici, siano Trp818, Phe821, Glu837, Ile841, mentre ci sono evidenze che suggeriscono che i calciolitici interagiscano anche con residui a livello del TM3 (Arg680, Phe684, Phe688), il che lascia supporre che i siti d'interazione di calciomimetici e calciolitici siano parzialmente sovrapposti ma non identici ^(56, 57). Sia i calciomimetici che i calciolitici possono trovare applicazione nella pratica clinica di patologie legate al metabolismo del calcio. La concentrazione salina ⁽⁵⁸⁾ e il pH ⁽⁵⁹⁾ sono inoltre due fattori in grado di modificare la funzione del recettore: l'aumento della forza ionica e la riduzione del pH riducono la sensibilità del recettore.

1.6 Pathway di segnalazione del CaSR

L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} extracellulare, o l'esposizione ad altri agonisti del CaSR, si traduce nell'attivazione di un complesso network di segnalazione intracellulare (non completamente definito in ogni dettaglio) (figura 6) che ha come effetto immediato l'innalzamento dei livelli di calcio intracellulare, dovuto sia a rilascio di calcio dagli stores intracellulari ⁽²⁾, sia all'ingresso di calcio extracellulare attraverso canali ionici non selettivi ⁽⁶⁰⁾. Il CaSR, essendo un GPCR,

attiva pathway attraverso le G-protein eterotrimeriche e in particolare attraverso le $G_{q/11}$, G_i e $G_{12/13}$ (⁵), ma data l'ampia gamma di G-protein esistenti nel genoma umano, gli studi di interazione CaSR-G-protein sono ancora in corso. Il CaSR utilizza le diverse G-protein per attivare pathway differenti. I primi fattori attivati sono le fosfolipasi C, A₂ e D (PLC, PLA₂, PLD), enzimi responsabili dell'idrolisi dei fosfolipidi di membrana. La PLC, attivata attraverso le $G_{q/11}$, idrolizza il fosfatidilinositolo bi-fosfato (PIP₂) in inositolo tri-fosfato (IP₃) e diacil-glicerolo (DAG) (⁶¹). L'IP₃ si lega ai suoi recettori sul reticolo endoplasmatico e porta all'apertura dei canali di calcio con conseguente liberazione del Ca²⁺ contenuto negli stores intracellulari.

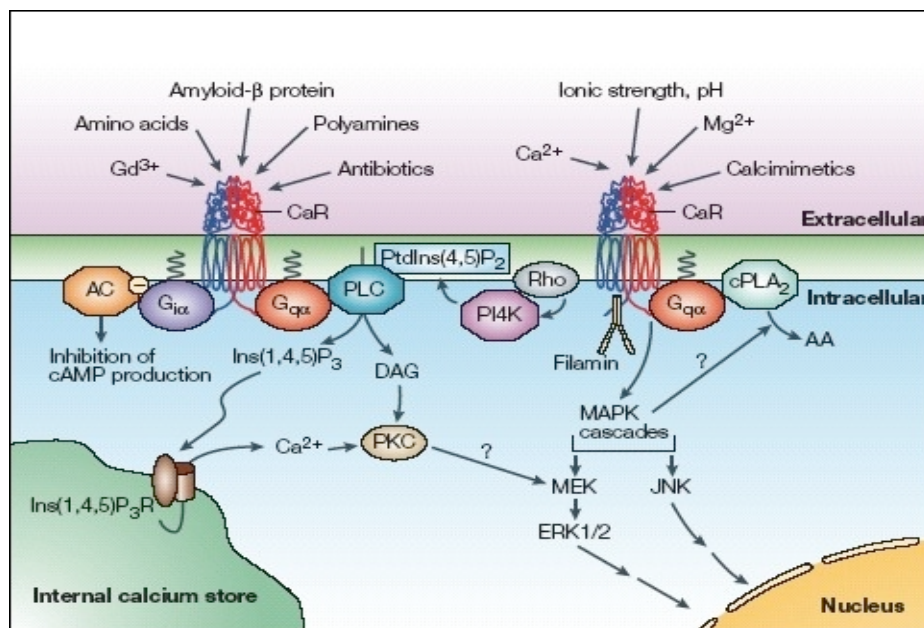


Figura 6. Rappresentazione schematica della trasduzione del segnale del CaSR. Figura da Hofer AM, Nature Rev Mol Cell Biol, 2003 (⁵).

È stato dimostrato che buona parte del Ca²⁺ rilasciato nel citosol viene poi estruso dalla cellula attraverso le calcio-ATPasi della membrana plasmatica (PMCA) (^{62, 63}). Lo svuotamento degli stores intracellulari provoca la successiva apertura di store-operated calcium channels (SOCs), canali della membrana plasmatica, selettivi per il calcio, attraverso cui il calcio rientra nella cellula e, grazie ad un'altra

pompa ATPasica, la pompa SERCA presente sulla membrana del reticolo endoplasmatico, viene di nuovo immagazzinato negli stores intracellulari. È stato ipotizzato che l'attivazione di questo pathway di afflusso ed efflusso del calcio permetta, attraverso il CaSR, la comunicazione con altre cellule (^{64, 65}) e che quindi il calcio abbia una putativa funzione di terzo messaggero. Il rilascio di calcio da parte di cellule stimulate, infatti, determina un aumento della concentrazione di calcio a livello extracellulare sufficiente ad attivare, sempre attraverso il CaSR, le cellule adiacenti (⁶⁴) o a riattivare la stessa cellula stimolata (⁶⁶). Sono però necessarie ulteriori investigazioni per dimostrare che il calcio abbia effettivamente questo ruolo (Figura 7).

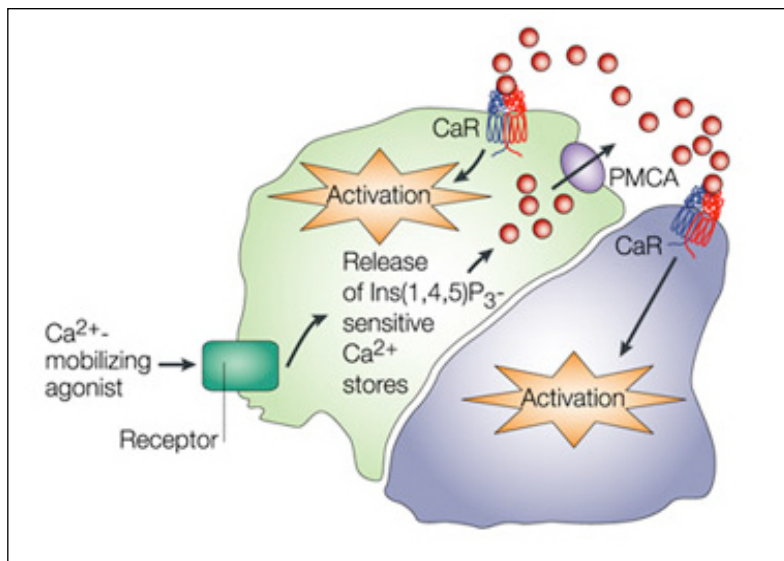


Figura 7. Il calcio come potenziale terzo messaggero. Questo modello mostra come il calcio (cerchi rossi) possa potenzialmente funzionare come terzo messaggero nella stimolazione del CaSR di cellule adiacenti o della stessa cellula, funzione mediata dall'esportazione di calcio attraverso la calcio-ATPasi PMCA. Figura da Hofer AM, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003 (⁵).

L'aumento di calcio intracellulare, insieme alla produzione di DAG, porta all'attivazione della protein chinasi C (PKC) (⁵). Il PIP2 viene riformato ad opera della fosfatidil-inositolo 4-chinasi (PI4K) che risulta essere più attiva dopo la

stimolazione del CaSR e che sembra interagire con il CaSR attraverso le $G_{12/13}$ Rho-dipendenti (⁶⁷). Sempre attraverso le subunità stimolatorie q- α delle proteine G viene attivata la fosfolipasi A2 (PLA2) che porta alla liberazione, dai fosfolipidi di membrana, di acido arachidonico (AA) e dei suoi metaboliti: prostaglandine (PGs) nella via delle ciclossigenasi (COX) e idroperossidi (HPETEs) nella via delle lipossigenasi (LOX) (^{68, 69}). Infine, viene attivata anche la fosfolipasi D (PLD), che produce acido fosfatidico (PA), anch'essa attraverso le $G_{12/13}$ Rho-dipendenti. Il CaSR interagisce anche con proteine G inibitorie ($G_{i\alpha}$), attraverso le quali inibisce l'adenilato ciclasi (AC) e determina quindi una riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) (⁷⁰). A questo livello della segnalazione sembra dover essere coinvolta la PKA, la cui attivazione è cAMP dipendente, ma il cui ruolo nel pathway del CaSR risulta poco chiaro.

Il CaSR è inoltre correlato alla cascata d'attivazione delle mitogen-activated protein kinases (MAPKs). La famiglia delle MAPKs include ERK1 e ERK2 (extracellular signal-regulated kinase), p38 e JNK (stress-activated cJun N-kinases) (Figura 6). Tale cascata viene innescata dall'attivazione della proteina G a basso peso molecolare Ras (p21) (^{71, 72}) e attraverso fosforilazioni a catena porta all'attivazione di ERK, p38 e JNK. Le MAPKs sono serina/treonina chinasi attivate mediante duplice fosforilazione su tirosina e su residui adiacenti di serina o treonina e sono coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari (⁷³). È stato dimostrato che la stimolazione del CaSR mediante incremento della $[Ca^{2+}]_o$ determina aumento dell'attività di JNK, e che ciò è mediato da proteine G della classe $G_{i\alpha}$ (⁷⁴). L'attivazione di p38 e JNK sembra essere legata al meccanismo di secrezione del paratormone (PTH) (⁷⁵). Per quanto riguarda ERK, è stato dimostrato che la stimolazione del CaSR con Ca^{2+} extracellulare determina aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2, quindi il CaSR ne promuove l'attivazione. L'attivazione di ERK è molto complessa, coinvolge Ras, $G_{i\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$, la via PLC-IP3 e PKC (⁶⁹). Sembra inoltre che per l'attivazione della cascata delle MAPKs sia fondamentale l'interazione del CaSR con la proteina del citoscheletro filamina-A. Il CaSR risulta localizzato prevalentemente a livello delle caveole della membrana plasmatica (microdomini della membrana a forma di fiasca, ricchi di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale), dove la principale proteina presente è la caveolina-1. È

stato dimostrato che la filamina-A interagisce direttamente sia con il CaSR (regione compresa tra gli aa 907-997 al C-terminale del CaSR, regione compresa tra gli aa 1566-1875 nella filamina-A) ⁽⁴³⁾ che con la caveolina-1 ⁽⁷⁶⁾, oltre che con varie componenti della cascata delle MAPKs; inoltre il CaSR è incapace di attivare ERK in assenza di filamina-A ⁽⁷⁷⁾. Sembra quindi che la filamina-A sia in grado di mediare l'interazione del CaSR con le MAPK e influenzare l'attivazione della via di segnalazione del recettore, anche se l'attivazione della PLC non sembra essere influenzata dalla filamina-A ⁽⁴³⁾.

Un fenomeno successivo all'attivazione del recettore è la comparsa di oscillazioni di calcio. Studi sull'attivazione del CaSR, condotti a livello di singola cellula, hanno mostrato che piccoli incrementi della concentrazione di calcio extracellulare (0.5 mM) sono in grado di indurre oscillazioni della concentrazione di calcio intracellulare, ovvero continue variazioni della $[Ca^{2+}]_i$, che si presentano come una sequenza di picchi che si ripetono ogni 40-50 secondi e si mantengono per 30-40 minuti ⁽⁷⁸⁾. Il pattern oscillatorio e la frequenza di oscillazione del calcio intracellulare svolgono un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, nella regolazione della protein chinasi calcio e calmodulina dipendente PKII ⁽⁷⁹⁾ e di PKC ⁽⁸⁰⁾, nel metabolismo mitocondriale ⁽⁸¹⁾ e nell'attività trascrizionale ^(82, 83, 84, 85); ci sono inoltre ipotesi che suggeriscono che questo sia un meccanismo mediante il quale il recettore sopporta l'esposizione prolungata ad elevate concentrazioni di calcio, prevenendo quindi la sua desensitizzazione. Molti modelli sono stati proposti per spiegare il meccanismo di generazione delle oscillazioni, ma tuttora non è ancora stato definito con certezza il meccanismo mediante il quale il calcio extracellulare evoca l'oscillazione dei livelli di quello intracellulare. Sembra ormai certo che il ciclo di calcio dentro e fuori dagli stores intracellulari, mediato da PLC-IP3, e l'integrità degli stessi stores intracellulari, siano fondamentali per le oscillazioni. A sostegno di tale ipotesi c'è il fatto che le oscillazioni di calcio sono state osservate non solo per il CaSR ma anche per altri GPCR che attivano il pathway PLC-IP3, ma soprattutto il fatto che il trattamento con tapsigargina, un inibitore che causa il completo e irreversibile svuotamento degli stores intracellulari, arresta il fenomeno oscillatorio ⁽⁷⁸⁾. Anche PKC sembra essere coinvolta nel fenomeno oscillatorio, ma sull'argomento ci sono due teorie

nettamente contrapposte. Evidenze sperimentali hanno mostrato che il trattamento con inibitori di PKC (GF I e Ro 31-8220) blocca le oscillazioni, mentre l'esposizione ad attivatori di PKC (PDBu) riduce la frequenza di oscillazione (⁸⁶). La teoria più accreditata sostiene che l'azione di PKC consista in un meccanismo a feed back negativo sul CaSR, mediante fosforilazione in corrispondenza della Thr888, e che ciò sia fondamentale per indurre l'oscillazione del calcio intracellulare; a supporto di tale ipotesi è il fatto che la mutazione della Thr888 causa il blocco delle oscillazioni (⁸⁶). Allo stesso tempo però sono state proposte teorie che invece escludono il coinvolgimento di PKC nelle oscillazioni di calcio, poiché il trattamento con inibitori della stessa PKC non ha prodotto nessun effetto sulle oscillazioni, ma solo una riduzione dei valori massimi dei picchi in alcuni esperimenti, senza influenzare la frequenza oscillatoria (⁷⁸). Ulteriori indagini saranno necessarie per stabilire quale sia l'esatto ruolo di PKC nell'induzione e nel mantenimento delle oscillazioni di calcio intracellulare. Attivatori allosterici del CaSR, quali i calciomimetici e gli aminoacidi, sono in grado di potenziare la risposta oscillatoria derivante dall'attivazione del recettore (^{87, 88}). Gli aminoacidi inducono però oscillazioni che hanno frequenza minore rispetto a quelle indotte dal calcio e sono sensibili ad agenti farmacologici diversi (⁸⁸); inoltre gli aminoacidi non sono in grado di indurre aumento dei livelli di IP3 e DAG. Sembra infatti che le oscillazioni indotte dagli aminoacidi siano indipendenti dalla via PLC-IP3 e coinvolgano invece un pathway in cui sono richiesti Rho, il C-terminale del recettore, la filamina-A e una riorganizzazione del citoscheletro di actina (⁸⁹).

L'attivazione del recettore, dipendente dall'agonista, è generalmente seguita dall'inizio di un meccanismo regolativo che porta all'attenuazione del segnale e che viene definito desensitizzazione funzionale. Si tratta di un meccanismo non completamente chiarito che coinvolge chinasi dipendenti da secondi messaggeri (PKC e PKA), G-protein coupled receptor kinases (GRKs) e β -arrestine. Evidenze sperimentali hanno mostrato che sia PKC che PKA hanno un ruolo inibitorio sul signaling del CaSR, infatti l'uso di inibitori di queste chinasi determina incrementi dei livelli di IP3 accumulati; sembra però che PKA abbia un ruolo minoritario rispetto a PKC (⁹⁰). PKC viene attivata dall'aumento di calcio intracellulare, mediato dalla via PLC-IP3, e dalla produzione di DAG, e si pensa che agisca a feed-back

negativo sul CaSR mediante fosforilazione. Il CaSR umano contiene cinque potenziali siti di fosforilazione per PKC: due si trovano nei loops intracellulari (Thr646 e Ser794) e tre sono invece del dominio intracellulare (Thr888, Ser895 e Ser915) ⁽³⁾. Si è osservato che l'attivazione della PKC (in seguito a trattamento con attivatori o ad aumento della $[Ca^{2+}]_o$) determina aumento dei livelli di fosforilazione del CaSR, soprattutto in corrispondenza della Thr888 ⁽⁹¹⁾ che sembra essere indispensabile per quest'azione della PKC; infatti è proprio attraverso la fosforilazione della Thr888 che PKC blocca l'interazione del C-terminale del CaSR con le proteine G responsabili della mobilizzazione del calcio contenuto negli stores intracellulari ⁽⁴¹⁾; inoltre mutazioni a livello della Thr888 sono in grado di bloccare l'effetto inibitorio di PKC ⁽⁴⁰⁾. Sembra che nel dominio intracellulare siano inoltre presenti due potenziali siti di fosforilazione per PKA (Ser899 e Ser900), con funzione regolativa; è stato ipotizzato che il modesto effetto inibitorio prodotto da PKA rispetto alla forte inibizione prodotta da PKC dipenda proprio dalla presenza di un numero minore di siti di fosforilazione per questa chinasi, ma non è ancora stato dimostrato ⁽⁹⁰⁾.

Le G-protein coupled receptor kinases (GRKs) sono una famiglia di serina/treonina chinasi che riconoscono e fosforilano in modo specifico recettori attivati da agonisti e accoppiati a G-proteine. La famiglia delle GRKs è composta da 7 diverse chinasi (GRK1-7): GRK 2,3,5,6 sono ampiamente espresse nei tessuti di mammifero, GRKs 1 e 7 si trovano a livello delle cellule del sistema visivo, mentre GRK 4 è espressa nel cervello, nel testicolo e nel rene ^(92, 93, 94). GRK 2 e 3 sono citosoliche, mentre tutte le altre sono associate alla membrana ⁽⁹⁵⁾. L'azione delle GRKs consiste nella fosforilazione di clusters di residui di serine e treonine presenti nel C-terminale e/o nel terzo loop intracellulare di GPCR attivati da ligando: tale fosforilazione permette il reclutamento delle β -arrestine, che mediano il distacco del recettore dalla proteina G interagente e indirizzano il recettore stesso all'endocitosi, un processo che ne permette la defosforilazione, resensitizzazione e il riciclo sulla membrana plasmatica ^(96, 97). La famiglia delle arrestine è costituita da 4 membri (arrestine 1-4): le arrestine 1 e 2 si trovano a livello delle cellule del sistema visivo, mentre le arrestine 3 e 4, meglio conosciute come β -arrestina 1 e β -arrestina 2, sono ubiquitariamente espresse ⁽⁹⁸⁾. GRKs e β -arrestine sono

coinvolte nella regolazione di molti recettori accoppiati a proteine G. L'idea che anche il CaSR sia soggetto a tale regolazione nasce da osservazioni sperimentali che hanno dimostrato l'espressione di GRKs e β -arrestine in paratiroidi umane e corteccia renale, tessuti in cui il CaSR è fortemente espresso, ma che soprattutto hanno evidenziato come l'overespressione di tali molecole fosse in grado di ridurre l'attività del CaSR (⁹⁹). Sembra che GRK 2, 3 e 4 siano quelle maggiormente coinvolte nella desensitizzazione del CaSR; in particolare per GRK2 è stato ipotizzato un meccanismo inibitorio indipendente sia dalla fosforilazione del recettore che dall'associazione delle β -arrestine, che si basa invece sull'interazione diretta di GRK2 con le G-proteine (prevalentemente con le Gq) che riduce così l'interazione del CaSR con quest'ultime (¹⁰⁰). È stato dimostrato che il C-terminale del CaSR interagisce sia con la β -arrestina 1 che con la β -arrestina 2; inoltre si è osservato che la stimolazione con calcio determina traslocazione delle β -arrestine a livello del CaSR (⁹⁹). Evidenze sperimentali mostrano che il CaSR è continuamente endocitato e riciclato sulla membrana plasmatica e ci sono meccanismi che invece ne promuovono la degradazione; poiché i livelli proteici del CaSR rimangono pressoché costanti, deve esserci un equilibrio tra sintesi e degradazione del recettore (¹⁰¹).

1.7 Espressione tissutale del CaSR

I) Paratiroide

La paratiroide è l'organo bersaglio principale dell'azione del CaSR ed è il tessuto in cui il CaSR è espresso più abbondantemente. Un largo numero di studi ha chiaramente dimostrato il ruolo centrale del CaSR nella regolazione della secrezione di paratormone (PTH) (¹). L'aumento del calcio extracellulare viene sentito dal CaSR presente sulla membrana plasmatica delle paratiroidi, il recettore stimolato attiva il pathway di segnalazione del IP₃ con aumento della [Ca²⁺]_i ed inibizione della secrezione di PTH (Figura 8). Non è noto se il meccanismo d'inibizione agisca sull'espressione genica bloccando la produzione del PTH o se blocchi la secrezione dell'ormone già formato contenuto nei granuli secretori (¹⁰²). La diminuzione del livello circolante di PTH porta ad aumento dell'escrezione di

calcio, riduzione dell'assorbimento intestinale e minore liberazione di calcio dalle riserve ossee (¹⁰³). Il CaSR modula anche la proliferazione delle cellule paratiroidee, riducendola in presenza di elevato calcio extracellulare, infatti, in casi di mutazioni inattivanti il recettore, spesso si verificano fenomeni di iperplasia ghiandolare (¹⁰⁴).

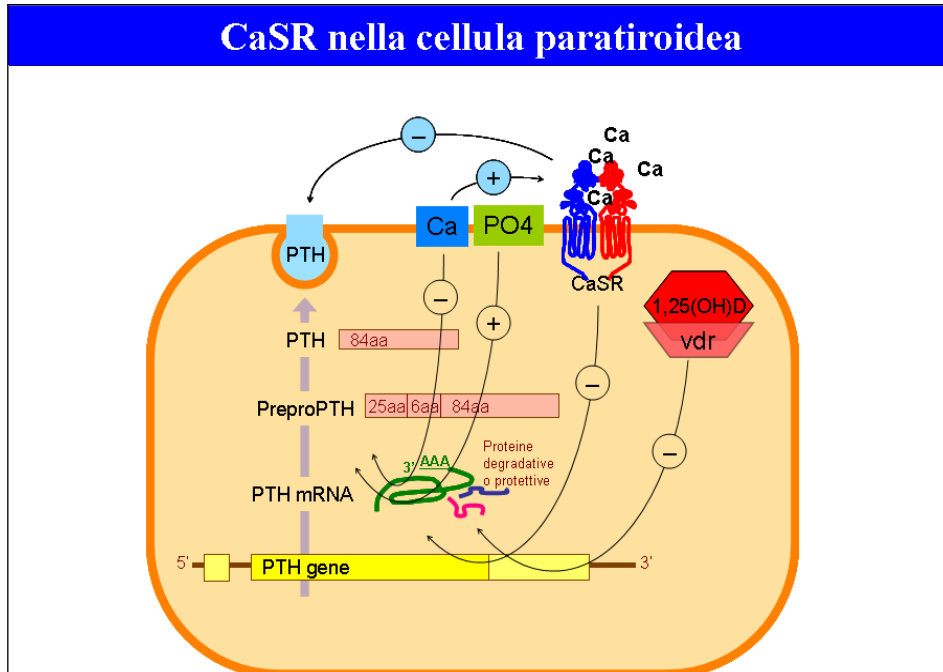


Figura 8. Ruolo del CaSR nella secrezione e sintesi del PTH a livello della cellula paratiroidea. Il CaSR media l'inibizione della sintesi e secrezione del PTH prodotta dall'incremento della calcemia.

II) Tiroide

Un certo livello di espressione del CaSR si trova anche nella tiroide, anche se il ruolo nello stimolare la produzione di calcitonina non sembra così centrale, come per il PTH nelle paratiroidi. La secrezione di calcitonina da parte delle cellule C della tiroide è modulata dalla concentrazione di calcio nel sangue: con un meccanismo opposto a quello del PTH, un incremento dei livelli sopra la norma porta alla liberazione di calcitonina. A livello cellulare si verificano per lo più grossi

influssi cellulari attraverso canali voltaggio-dipendenti, ma è stata dimostrata la presenza del CaSR su queste cellule (¹⁰⁵), anche se non tutti gli antagonisti del CaSR attivi nelle paratiroidi agiscono sulla secrezione di calcitonina, per esempio il Mg²⁺ sembra non avere alcun effetto (¹⁰⁶). Il modello proposto è che il CaSR, attivato dall'aumento di calcio extracellulare, attivi dei canali Na⁺-Ca²⁺ attraverso la via PLC-DAG-PKC. I canali porterebbero all'entrata di Na⁺ e Ca²⁺, producendo una depolarizzazione cellulare che attiverebbe i canali Ca²⁺ voltaggio dipendenti. L'aumento di [Ca²⁺]_i porterebbe ad incremento della secrezione di calcitonina (¹⁰⁷) (Figura 9).

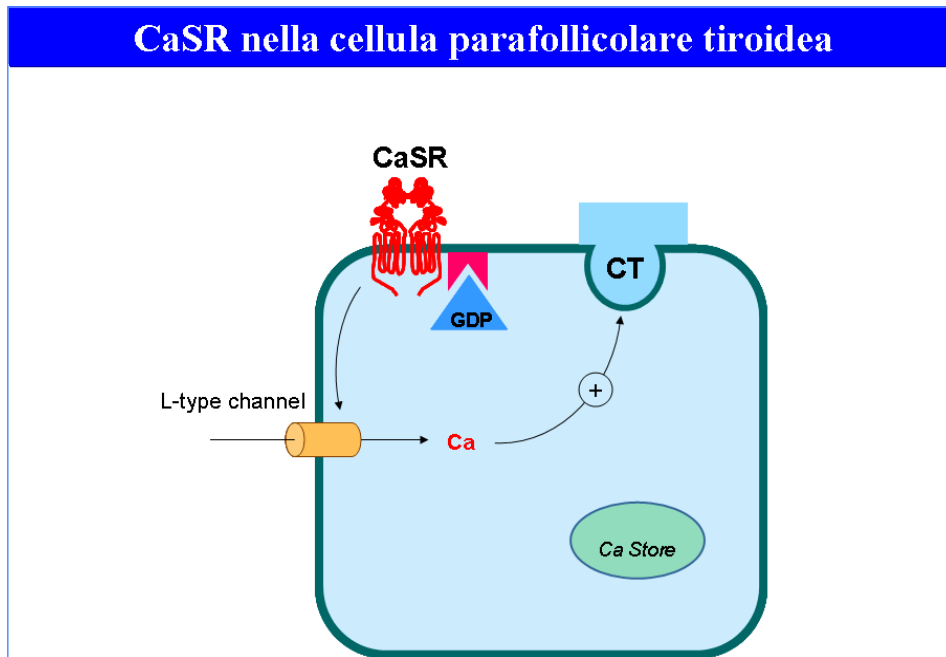


Figura 9. Ruolo del CaSR nella secrezione di calcitonina a livello della cellula paratiroidea. La stimolazione del CaSR da parte del calcio extracellulare determina l'apertura di un canale L del calcio che è seguita dall'ingresso di ioni, con conseguente secrezione di calcitonina.

III) Rene

Cambiamenti nei valori di Ca^{2+} plasmatici alterano molti aspetti della funzionalità renale (¹⁰⁸). Studi immunistochemici usando anticorpi anti-CaSR hanno dimostrato che il CaSR è distribuito lungo tutto il nefrone e la polarizzazione appare specifica nei vari segmenti del tubulo (¹⁰⁹). Il recettore ha una posizione luminale nel tubulo prossimale e nel dotto collettore mentre ha una posizione basolaterale nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e nel tubulo distale. Questa localizzazione suggerisce che il CaSR può rilevare cambiamenti di concentrazione sia nello spazio urinario che nell'interstizio plasmatico, con funzioni diverse che sono state caratterizzate in ogni singolo segmento tubulare.

Nel tubulo prossimale il CaSR è localizzato sulla membrana apicale dell'epitelio tubulare dove è coinvolto nel riassorbimento dei fosfati (P_i) mediato dal PTH. Il PTH inibisce il riassorbimento prossimale dei P_i diminuendo, con un meccanismo cAMP-mediato, l'esposizione dei cotrasportatori del Na^+ e P_i (NPT2) sulla membrana luminale dei tubulociti. La stimolazione del CaSR causa una diminuzione dei livelli cellulari di cAMP intracellulari, con un conseguente aumento di esposizione dei cotrasportatori che riassorbono il P_i sulla membrana plasmatica (¹¹⁰). Il CaSR può inoltre produrre un effetto antifosfaturico attraverso la riduzione del PTH circolante. Il tubulo prossimale è anche la sede della sintesi di vitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], indotta dal PTH. In caso di elevazione dei livelli plasmatici del Ca^{2+} il recettore inibisce la sintesi e la secrezione di PTH e di conseguenza anche di vitamina D (¹¹¹) (Figura 10a).

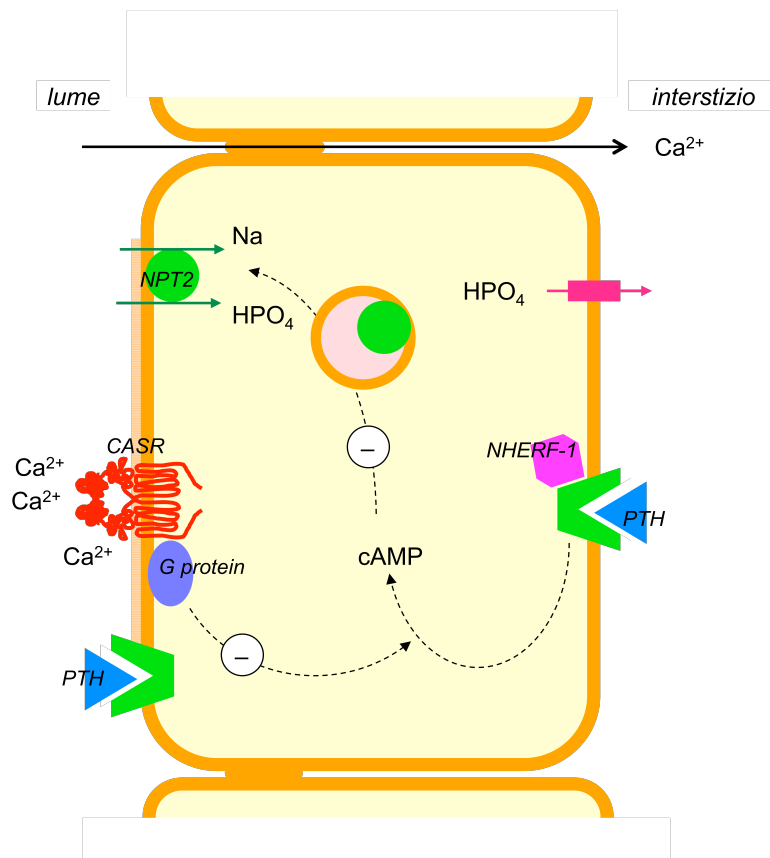


Figura 10a. Ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo prossimale. La sua attivazione determina un aumento dell'espressione del trasportatore del fosfato (NPT2) cAMP-dipendente sulla membrana apicale del tubulocita che determinerà un maggiore riassorbimento di fosfato ed un effetto antifosfaturico finale.

L'ansa di Henle è il tratto renale in cui il CaSR è espresso più abbondantemente. E' localizzato sulla membrana baso-laterale, dove controlla il riassorbimento dei minerali bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}), che avviene per lo più per via paracellulare grazie al gradiente elettrico dovuto al voltaggio positivo del tubulo. Il cotrasporto Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC2) riassume Na^+ , K^+ e Cl^- dal tubulo, gli ioni Na^+ e Cl^- escono poi attraverso la membrana basolaterale grazie al canale per il Cl^- e alla pompa Na^+ - K^+ -ATPasica. Il K^+ viene riciclato anche grazie ai canali K^+ (ROMK) posti sulla membrana apicale del tubulocita, permettendone la fuoriuscita. Questo fa sì che

sia garantito un eccesso di cariche positive nel lume e quindi che Ca^{2+} e Mg^{2+} passino dal lume tubulare all'interstizio per riassorbimento passivo. Eventuali aumenti nel calcio extracellulare plasmatico attivano il recettore sulla membrana basolaterale che, attraverso la via della PLA_2 e dei metaboliti dell'acido arachidonico (20-HETE), inibisce il canale K^+ (¹¹²), riducendo la positività del lume e sfavorendo così il riassorbimento di Na^+ e di Ca^{2+} (Figura 10b).

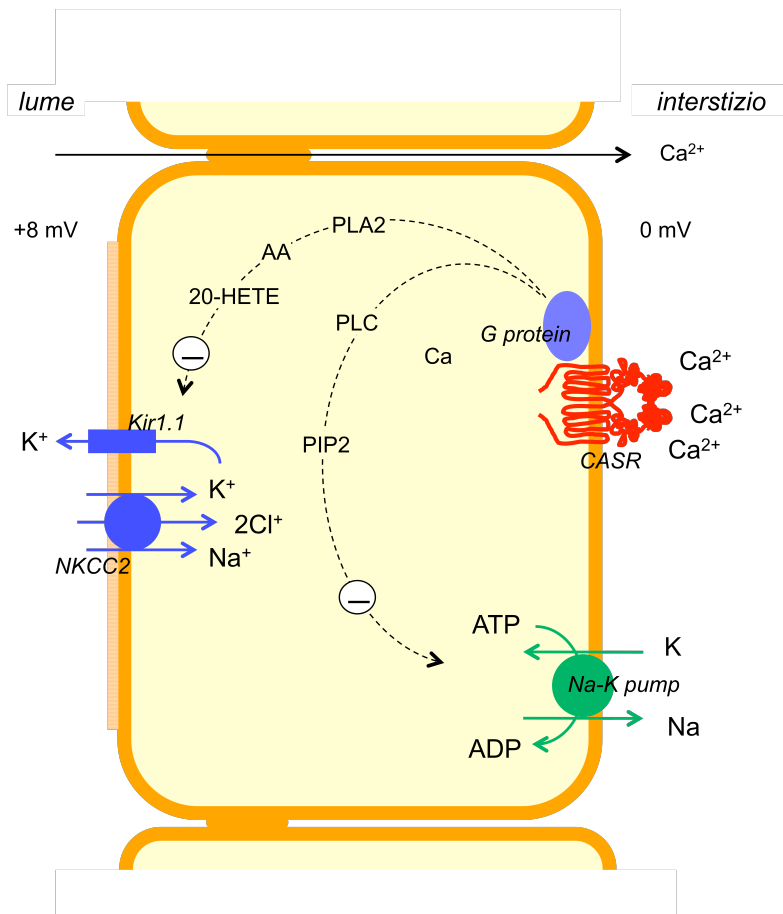


Figura 10b. Ruolo fisiologico del CaSR a livello dell'ansa di Henle. A questo livello, il CaSR opera il riassorbimento dei minerali bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}) che avviene per lo più per via paracellulare grazie al gradiente elettrico dovuto al voltaggio positivo del tubulo. Gli aumenti nel calcio extracellulare attivano il recettore sulla membrana basolaterale che, attraverso la via della PLA_2 e del 20-HETE inibisce il canale del K^+ , riducendo la positività del lume e sfavorendo il riassorbimento di Ca^{2+} .

In aggiunta, recenti studi hanno dimostrato che il Ca^{2+} ed i suoi agonisti inducono traslocazione lisosomiale della claudina-16 (CLDN-16). La CLDN-16 è un componente delle giunzioni strette che insieme alla claudina-19 (CLDN-19) forma un canale permeabile al Ca^{2+} e di Mg^{2+} , aumentando il riassorbimento di questi due ioni per via paracellulare (¹¹³). L'attivazione del CaSR, impedendo l'esposizione della CLDN-16 nelle giunzioni strette, contribuisce alla riduzione del riassorbimento di Ca^{2+} e Mg^{2+} (¹¹⁴) (Figura 10c). Inoltre, in un recente lavoro, è stato dimostrato che il CaSR influenza anche l'espressione della Claudina-14 (CLDN14) attraverso un meccanismo mediato da microRNA (miRNA). La Claudina-14 interagisce con la Claudina-16 bloccando la formazione del canale permeabile al calcio e al magnesio e inibendo il riassorbimento di calcio.

Gong et al. hanno identificato 2 miRNA (miR-9 e miR-374) in grado di sopprimere la traduzione della CLDN14 degradando il suo mRNA in modo sinergico. Il CaSR sembrerebbe downregolare in modo significativo i livelli di espressione dei 2 miRNA in cellule del tratto ascendente dell'ansa di Henle, provocando un aumento dei livelli di espressione di CLDN14 e contribuendo alla riduzione del riassorbimento di calcio (¹¹⁵).

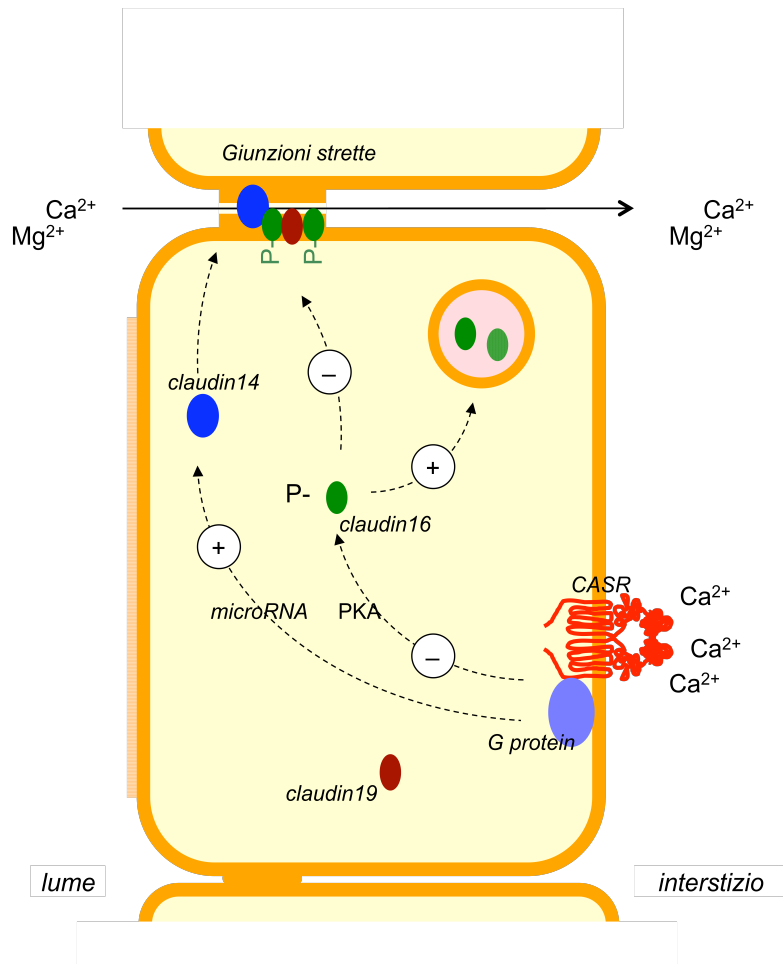


Figura 10c. Ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo convoluto. L'attivazione del CaSR impedisce l'esposizione della CLDN-16 a livello delle giunzioni strette diminuendo il riassorbimento paracellulare di Ca^{2+} .

Nel tubulo convoluto distale, il CaSR è espresso sulla membrana basolaterale. In questo segmento il gradiente elettrochimico è molto basso ma viene riassorbito il 15% del Ca^{2+} totale. In questo caso il Ca^{2+} viene riassorbito attraverso canali specifici (ECaCs) presenti sulla membrana apicale, viene poi trasportato nel citoplasma da proteine specifiche per il calcio come le calbindine (¹¹⁶), e estruso nell'interstizio dallo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ e dalla pompa $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasica}$ (PMCA). Sulla PMCA agisce il CaSR con effetto inibitorio in caso di eccesso di Ca^{2+}

interstiziale.

Infine nel dotto collettore il CaSR si trova nella membrana apicale e va ad attivare la pompa idrogenionica con conseguente effetto di acidificazione urinaria (Figura 10d). Inoltre, in questa sede il CaSR inibisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana apicale, dove si localizza sotto lo stimolo dell'ormone anti-diuretico vasopressina. La vasopressina favorisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana luminale attraverso il signalling intracellulare del cAMP. In questo modo la vasopressina controlla il riassorbimento di acqua e la concentrazione delle urine. Il CaSR va a bloccare il sistema impedendo la produzione di cAMP, fondamentale nella comunicazione tra la vasopressina e le acquaporine; operando così un effetto diuretico (¹¹⁷) (Figura 10e).

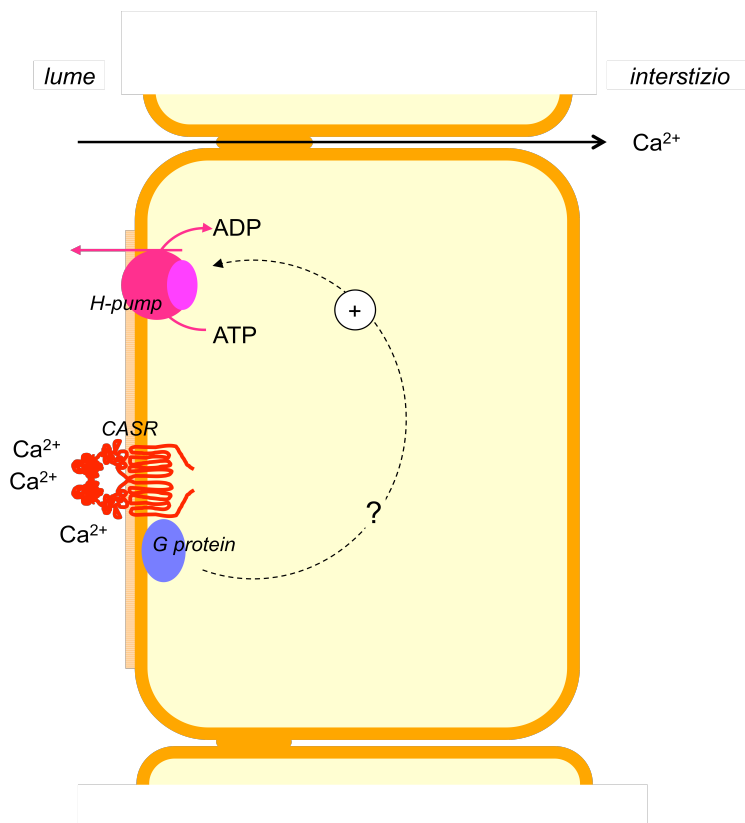


Figura 10d. Ruolo del CaSR nel dotto collettore. In questa sede il CaSR attiva la pompa idrogenionica ATP-dipendente con un effetto finale di acidificazione urinaria.

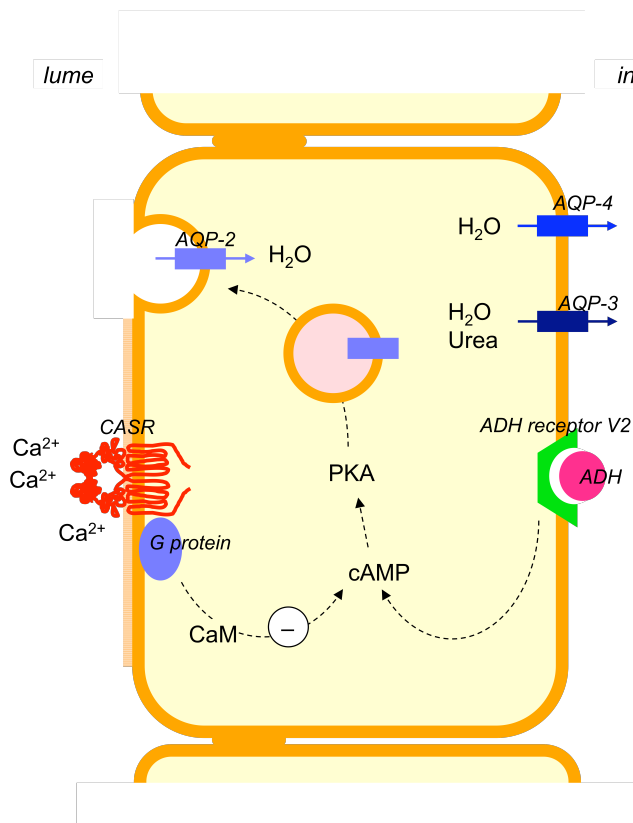


Figura 10e. Ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo collettore. Il CaSR attivato inibisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana apicale, interferendo a livello della via del cAMP e generando perciò un effetto diuretico.

IV) Ossa

La presenza ed il ruolo del CaSR nelle cellule ossee è stato oggetto di controversie. Recenti evidenze supportano l'ipotesi di una sua espressione sia negli osteoblasti che negli osteoclasti (Figura 11). Nell'osso il CaSR sembra stimolare l'osteoclastogenesi ed alti livelli di calcio (5-20mM) nel fluido extracellulare osseo provocano l'apoptosi dell'osteoclasta attraverso l'attivazione della PLC e la traslocazione nel nucleo di NF-kB (¹¹⁸). Gli osteoblasti sembrano rispondere alle stimolazioni con calcio esterno aumentando la loro proliferazione e la chemiotassi in un range di concentrazioni di Ca²⁺ fino a 5 mmol/l, rispondendo così alle esigenze di sintesi ossea. Anche i condrociti sembrano percepire le variazioni di calcio esterno e modificare le loro riserve intracellulari di calcio. La

cartilagine non è un tessuto che prende parte all'omeostasi del calcio, ma gioca un ruolo chiave nella formazione di nuovo tessuto osseo, quindi la capacità di sentire la disponibilità di Ca^{2+} è importante per assicurare una corretta crescita e differenziamento della cartilagine in tessuto osseo (¹¹⁹).

E' stato recentemente trovato un nuovo sensore del calcio sugli osteoblasti. Quest'ultimo appartiene ad una nuova classe di recettori accoppiati alle G proteine, chiamato GPRC6, ed è sensibile allo ione in un range di concentrazione tra 5 e 40 mmol/l. La funzione di questo recettore non è ancora nota anche se le particolari caratteristiche funzionali lo rendono particolarmente interessante per l'osso (^{120, 121}).

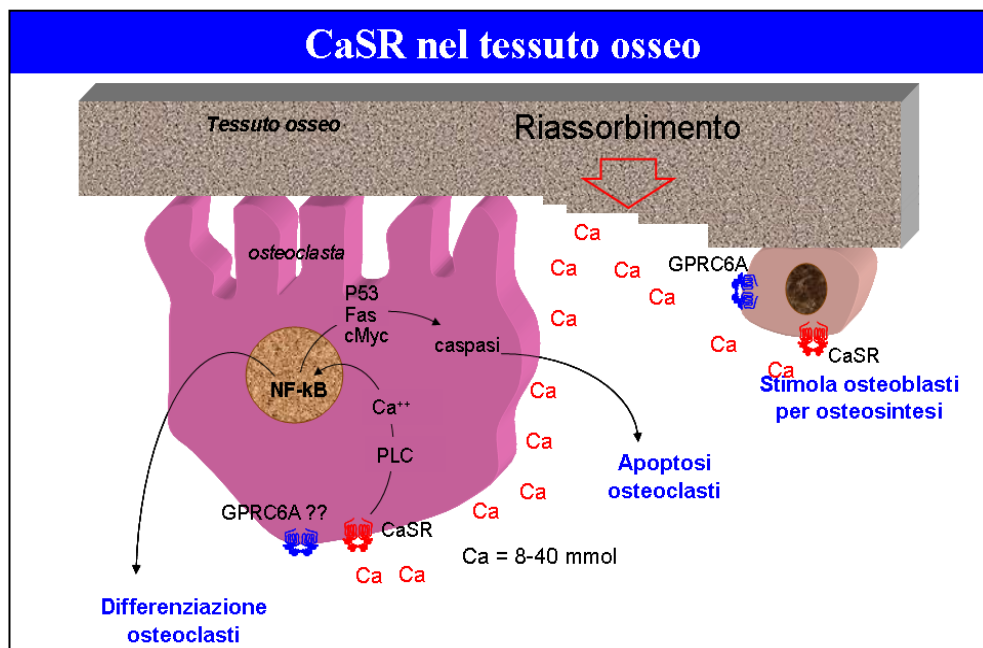


Figura 11. Espressione del CaSR a livello del tessuto osseo. L'osteoclasta riceve stimoli in senso apoptotico quando la concentrazione dello ione calcio si eleva e il meccanismo sembra essere mediato dall'attivazione della PLC e la traslocazione nel nucleo di NF-kB. Il recettore del calcio è espresso anche a livello osteoblastico, dove la presenza dello ione e i suoi aumenti di concentrazione sembrerebbero indurre uno stimolo alla proliferazione.

V) Apparato gastro-enterico

Il CaSR è espresso nelle cellule che tappezzano la cavità gastrica e la sua

attivazione da parte dell'aumento di calcio extracellulare provoca secrezione di gastrina e quindi aumento dell'acidità gastrica. Il duodeno e in parte il colon prossimale sono i siti di maggior riassorbimento di calcio nell'intestino. Questo meccanismo opera attraverso la calbidina, la pompa per il calcio e lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, regolati dalla vitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]. Il CaSR è espresso in entrambi i tessuti e potrebbe partecipare anch'esso alla regolazione dell'assorbimento di calcio, ma le informazioni al riguardo sono ancora scarse (^{122,123}). La capacità del CaSR di essere stimolato anche dagli aminoacidi suggerisce un legame tra il metabolismo del calcio e quello delle proteine; cambiamenti nell'apporto dietetico di proteine hanno degli effetti sull'escrezione di calcio ed è possibile che il primo step di questa regolazione avvenga a livello dell'apparato gastro-intestinale. Inoltre il CaSR sembra avere un ruolo anche nella secrezione dei fluidi nel colon e un effetto antiproliferativo sull'epitelio intestinale (¹²⁴).

VI) Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio

Il CaSR è espresso anche in numerosi tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio, tanto che qualche autore inizia a definire il CaSR un gene ubiquitario (¹²⁵). Il recettore è presente in numerosi compartimenti del sistema nervoso centrale, nell'ippocampo, nel cervelletto, nei bulbi olfattivi (¹²⁶). È stata evidenziata l'espressione del CaSR anche nell'epitelio delle lenti oculari (¹²⁷), in molte cellule del midollo osseo (¹²⁸) e nelle cellule mature del sangue (monociti e piastrine).

1.8 Il CaSR e l'omeostasi del calcio

Il calcio è un elemento chiave nell'omeostasi dell'organismo: il calcio intracellulare funziona come secondo messaggero e cofattore per molte proteine ed enzimi; il calcio extracellulare è cofattore delle molecole di adesione, regola l'eccitabilità dei neuroni, è parte essenziale della fase minerale ossea. Non sorprende quindi che i livelli di calcio nel nostro organismo siano finemente regolati: un asse calcitonina-PTH-vitamina D mantiene questo equilibrio finissimo, coordinando l'azione degli organi coinvolti nell'omeostasi del calcio: paratiroidi, tiroide, reni, ossa e apparato gastro-intestinale.

In un essere umano il coefficiente di variazione del calcio plasmatico ionizzato è circa del 2%, grazie alla capacità di questi organi di sentire anche minime variazioni di calcio ed attivare il meccanismo che le elimini. In caso di riduzione di calcio plasmatico (ipocalcemia), si verifica una secrezione di PTH dalle cellule paratiroidee che stimola il riassorbimento tubulare di calcio dal rene, il riassorbimento osseo e la produzione della forma attiva di vitamina D [1,25(OH)₂D₃] che fa aumentare l'assorbimento intestinale. Al contrario, nel caso in cui si verifichi un aumento di calcio (ipercalcemia), la tiroide secreta calcitonina che fa scendere i livelli di calcio plasmatici, inibendo il riassorbimento osseo ed accelerando l'escrezione di calcio; contemporaneamente la secrezione di PTH viene inibita.

Il recettore non è espresso solo negli organi che sentono le variazioni di calcio e secernono gli ormoni calciotropici (paratirodi e tiroide), ma anche negli organi bersaglio di questi ormoni (rene, osso, intestino). Nel rene il CaSR regola direttamente, come abbiamo visto, l'escrezione di calcio e acqua, come anche negli osteoclasti inibisce la loro proliferazione e, al contrario, stimola le funzioni degli osteoblasti, portando ad un aumento delle riserve ossee di calcio. Inoltre la presenza del recettore nel sistema nervoso centrale, in particolare nell'ipotalamo, sede della sensazione di sazietà, è un dato interessante su cui indagare: si potrebbe ipotizzare un controllo da parte del cervello dell'assunzione di cibi e quindi dell'intake di calcio, in casi di ipercalcemia (7, 129, 130).

Il CaSR è coinvolto anche nella regolazione dell'omeostasi del Mg²⁺, che è un suo agonista, anche se con una forza inferiore rispetto al calcio: un aumento di Mg²⁺ inibisce la secrezione di PTH e fa diminuire il riassorbimento renale di Mg²⁺. Il recettore ha anche un controllo indiretto sull'escrezione di Na⁺, andando ad inibire il cotrasporto Na⁺-K⁺-2Cl⁻ nell'ansa di Henle, motivo per cui il CaSR è implicato anche nella modulazione della pressione arteriosa. Per cui possiamo pensare al recettore del calcio come ad uno degli elementi che coordina molti dei sistemi di omeostasi del nostro organismo (Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e acqua) sotto la stimolazione del Ca²⁺ esterno (Figura 12).

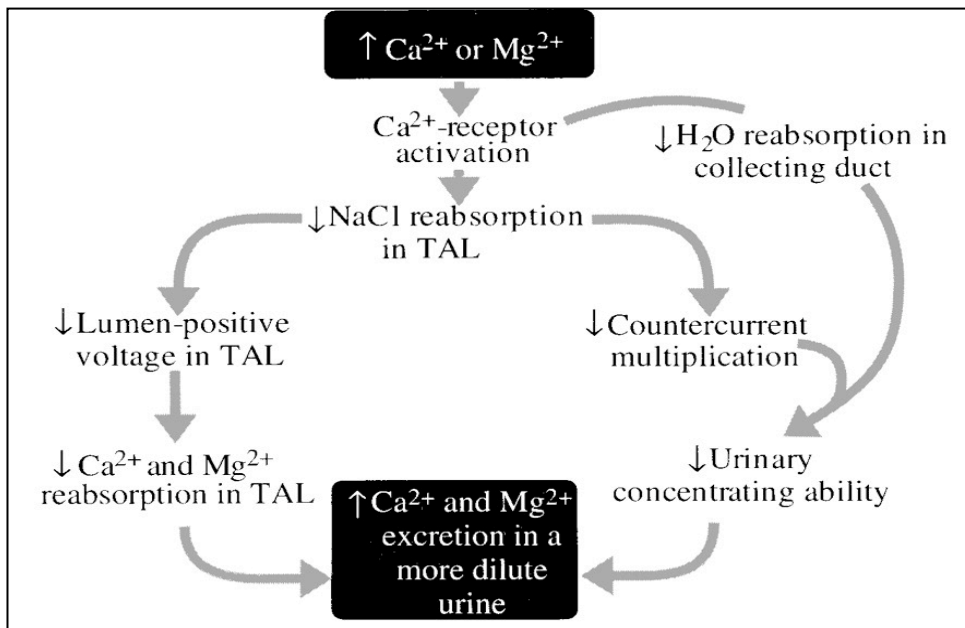


Figura 12. Schematizzazione dell'azione del CaSR a livello renale per la regolazione dell'omeostasi del calcio, del magnesio e dell'acqua. TAL= thick ascending limb.

1.9 Fisiopatologia del CaSR

l) Malattie monogeniche

Appena identificato il gene del CaSR, sono state scoperte varie mutazioni che causano patologie con disfunzioni più o meno gravi del sistema di omeostasi del calcio. La maggior parte delle mutazioni sono state trovate nel ECD, e quindi causano difetti nel legame del ligando, altre nel TMD e nel dominio C-terminale, che portano a errori nella segnalazione intracellulare. Le mutazioni possono essere inattivanti il recettore, dove si ha una perdita di funzione, o attivanti, dove si verifica un'ipersensibilizzazione agli stimoli (^{16, 131, 132, 133, 134}).

Le patologie più frequenti associate a queste mutazioni sono tre: due in cui il recettore viene inattivato completamente o parzialmente, l'ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) e l'iperparatiroidismo severo neonatale (NSHPT), e una in cui è stata rilevata un'iperattivazione del recettore, l'ipocalcemia autosomica dominante (ADH) (Figura 13). La FHH è un disordine a carattere autosomico

dominante, presente in eterozigosi nei pazienti e dovuta alla perdita di funzione del recettore. Le mutazioni hanno un effetto dominante-negativo sull'allele sano, cioè le molecole non funzionanti influenzano anche le molecole funzionanti che non riescono a sopperire da sole alle funzioni del recettore. La patologia è caratterizzata da un'ipercalcemia asintomatica, con una lieve ipermagnesemia, livelli normali o quasi di PTH e una scarsa escrezione di calcio. I fenotipi sono variabili da un caso all'altro, anche se sostanzialmente la FHH è una patologia benigna. Al contrario la NSHPT è una patologia ben più grave che si presenta nei primi mesi di vita; è dovuta a mutazioni inattivanti presenti in omozigosi, può incorrere nella progenie di soggetti con FHH. I sintomi sono più rilevanti: ipercalcemia grave, iperparatiroidismo, iperplasia paratiroidea, demineralizzazione ossea con fratture multiple, ipocalciuria, con livelli di PTH anche 10 volte superiori alla norma. I soggetti non trattati chirurgicamente con paratiroidectomia hanno problemi di sviluppo neurale e vanno incontro alla morte. L'ADH è una malattia autosomica dominante, causata da mutazioni del gene CaSR che aumentano il livello di sensibilizzazione del recettore: minori concentrazioni di calcio bastano ad attivarlo. Si tratta di una patologia che può manifestarsi con diversi gradi di gravità e che a causa dei bassi livelli di calcemia può provocare convulsioni, nefrocalcinosi e difetti della crescita. I livelli di PTH sono bassi, nelle forme più gravi il PTH è indosabile, e l'ipercalciuria è notevole, tanto che quest'ultima è stata proposta come criterio di differenza con le altre forme di ipoparatiroidismo (¹²⁵, ¹³⁵, ¹³⁶).

Di recente sono state scoperte forme di ipoparatiroidismo acquisito dovute ad anticorpi autoimmuni verso il CaSR (¹³⁷, ¹³⁸). Anticorpi reattivi verso il CaSR sono stati però ritrovati anche in pazienti con iperparatiroidismo con un fenotipo simile al FHH (¹³⁹). Questo argomento necessita perciò di ulteriori indagini sia perché il meccanismo di legame e riconoscimento anticorpo-recettore rimane da chiarire, sia perché non si conosce la reale frequenza degli anticorpi anti-CaSR nelle malattie autoimmuni o al di fuori di esse.

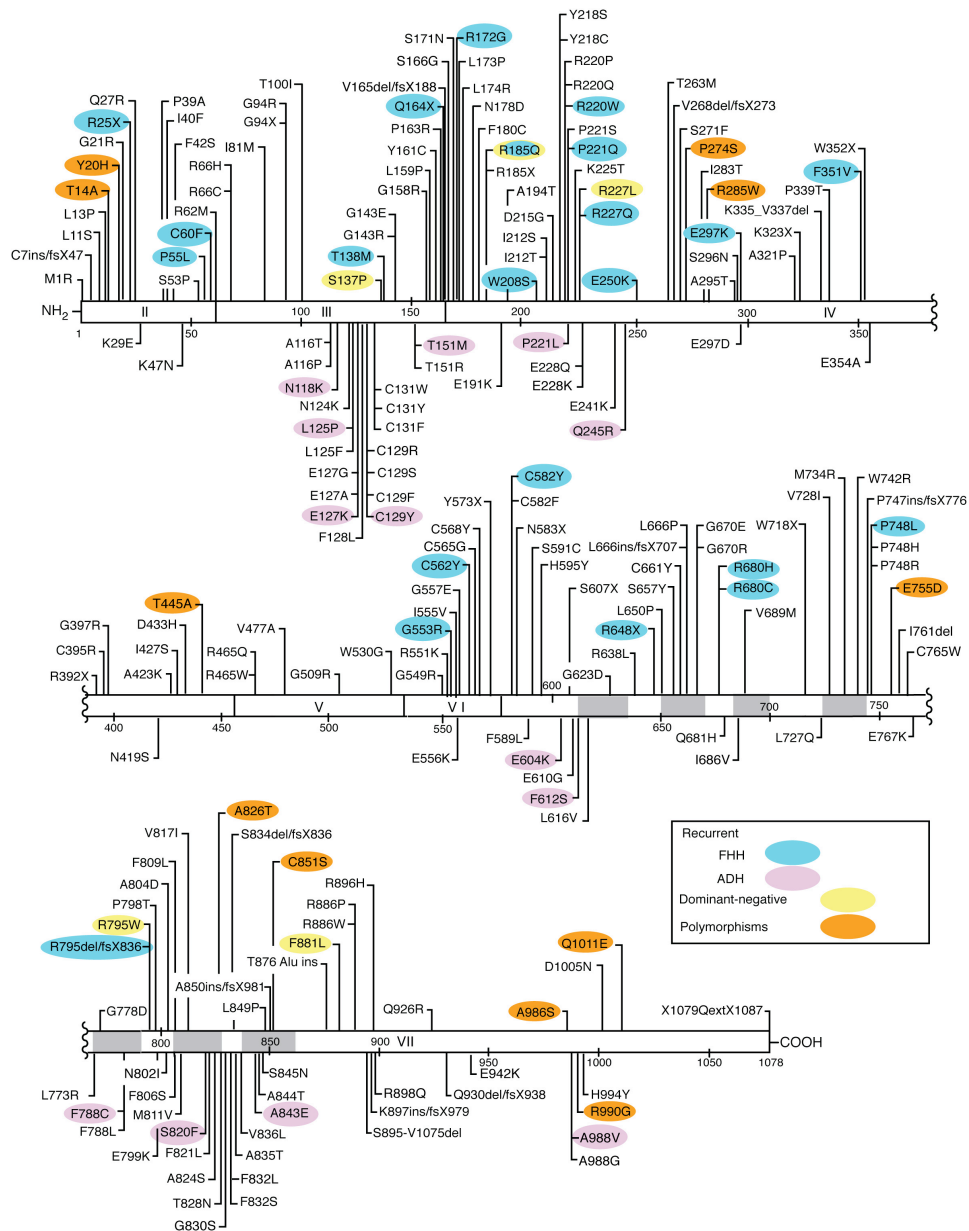


Figura 13. Rappresentazione schematica delle mutazioni inattivanti trovate nei pazienti con FHH e/o NSHPT (in giallo ed azzurro), delle mutazioni attivanti trovate nei pazienti con ADH (in rosa) e dei polimorfismi (in arancione) del CaSR. Immagine modificata presente sul sito: www.casrdb.mcgill.ca

II) Malattie complesse

Le patologie per cui più si indaga sul ruolo del CaSR sono le disfunzioni delle paratiroidi: iperparatiroidismo primario e secondario. L'iperparatiroidismo primario (PHPT) è un disordine endocrino caratterizzato da un aumentato numero delle cellule paratiroidi e da ipersecrezione di PTH, dovute o ad un adenoma delle paratiroidi o un'iperplasia della stessa. L'aumento di PTH circolante modifica il turnover osseo riducendo la densità ossea, aumenta la produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello renale e quindi l'assorbimento intestinale. Molti pazienti iperparatiroidi sono a rischio di nefrolitiasi. Normalmente, l'aumento di concentrazione del Ca^{2+} nel fluido extracellulare causa una riduzione della secrezione del PTH con un set-point (calcemia ionica che produce la concentrazione emimassimale del PTH plasmatico) intorno a 1.2 mmol/l. Alla base del PHPT sembrerebbe dunque esserci uno spostamento verso destra della curva sigmoide che relaziona PTH e calcemia ionica plasmatiche, dimostrando un deficit di sensing del calcio.

Nonostante questa relazione coinvolga la funzione del CaSR, la ricerca di mutazioni somatiche causali a carico del gene CaSR è risultata essere negativa (^{140, 141}). E' stata però osservata una ridotta espressione della proteina nelle cellule paratiroidi adenomatose. Perciò è stato proposto che gli scarsi livelli di vitamina D riscontrabili nell'PHPT potrebbero promuovere, attraverso una downregulation del CaSR, la proliferazione cellulare e l'aumento della probabilità di mutazioni somatiche. Tali mutazioni potrebbero a loro volta generare lo sviluppo di tumori clonali all'interno delle ghiandole paratiroidi (¹⁴²). Altri studi condotti sulla relazione tra la proliferazione cellulare paratiroidi e la funzione del CaSR hanno suggerito che il meccanismo possa avvenire tramite la cascata di signalling operata dalla G_q , G_i sulla MAPK (mitogen-activated protein kinase) (¹⁴³).

L'iperparatiroidismo secondario (SHPT) si sviluppa nel corso di insufficienza renale cronica, a seguito di fenomeni tipici di questa condizione quali la ritenzione di fosfato con conseguente iperfosforemia, la riduzione della sintesi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e la conseguente ipocalcemia per ridotto assorbimento intestinale di calcio. Molti studi hanno riscontrato bassi livelli d'espressione del recettore nelle paratiroidi iperplastiche dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica. Questo fenomeno poteva essere verificato fin dalle prime fasi di riduzione del filtrato glomerulare a

conferma del ruolo di controllo del recettore sulla proliferazione cellulare paratiroidea (¹²⁵). Le informazioni a riguardo sono ancora poche e relative soprattutto ai tumori intestinali. In linee cellulari di adeno-carcinoma del colon, il CaSR appare down-regolato. Sembra però che il livello della down-regolazione sia correlato con il grado di differenziazione cellulare, essendo il CaSR più espresso nei tessuti neoplastici che mantengono una maggiore differenziazione e meno espresso in quelli più indifferenziati (^{144, 145}).

Il ruolo del CaSR nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare è alla base del coinvolgimento del CaSR in alcuni tumori. Inoltre il CaSR entra in gioco nella manifestazione delle ipercalcemie paraneoplastiche. Queste insorgono a causa della derepressione del gene del PTH-related peptide (proteina con effetti simile a quella del PTH, ma normalmente espressa solo nella vita fetale) nelle cellule neoplastiche, più frequentemente renali o polmonari. Il CaSR sembra regolare la secrezione del PTH-related peptide in funzione della calcemia da parte delle cellule neoplastiche (^{146, 147}).

Altre patologie in cui si indaga il coinvolgimento del CaSR sono la calcolosi renale (o nefrolitiasi) e l'ipercalciuria primaria. La forma più frequente di nefrolitiasi (80% dei casi circa) è la nefrolitiasi idiopatica di calcio (ICN), caratterizzata dalla formazione ricorrente di calcoli, a livello renale, composti da cristalli inorganici (ossalati, carbonati e fosfati di calcio) amalgamati con proteine. Quando la concentrazione di questi soluti è eccessiva, essi precipitano sottoforma di cristalli nel fluido urinario e formano macro-aggregati che restano nel tratto urinario e originano i calcoli. La ICN è una patologia tipica delle società con standard socio-economici elevati e colpisce circa il 10% della popolazione (^{148, 149}). Predominano i pazienti maschi, le donne sono circa il 30%, ma dopo la sesta decade di vita la differenza si annulla. Alla base dell'insorgenza della ICN ci sono sia fattori ambientali, tra cui i più rilevanti sono sicuramente la dieta e l'apporto di acqua (¹⁵⁰), che fattori genetici a trasmissione non Mendeliana (^{151, 152}). Una storia familiare positiva è un forte fattore di rischio per l'insorgenza di ICN (^{153, 154, 155, 156}) e la formazione di calcoli sembra essere un processo poligenico. La patogenesi della ICN è associata a specifiche alterazioni metaboliche, come ipercalciuria, iperuricosuria, ipocitraturia e iperossaluria. L'ipercalciuria primaria risulta

fortemente correlata alla nefrolitiasi di calcio (40-50%), all'ipertensione (35%) e all'osteoporosi (20%) (^{157, 158, 159, 160, 161}). È un'alterazione del metabolismo del calcio definita come l'elevata escrezione urinaria di calcio in presenza di valori normali di calcio a livello plasmatico. Si presenta con i tratti tipici di una malattia complessa a carattere ereditario, influenzata anche da determinanti ambientali, principalmente dietetici. È stata definita come una malattia a trasmissione autosomica dominante, ma in realtà, nella maggior parte dei casi, si ha una trasmissione ereditaria di tipo poligenico.

1.10 Il CaSR come target farmacologico: il CaSR e i calciomimetici

Il ruolo centrale del CaSR nell'omeostasi del calcio lo rende un target per terapie farmacologiche mirate alla cura di patologie legate al metabolismo del calcio. I farmaci che sono stati sviluppati derivano dalle fenilalchil-amine, agonisti di tipo II del recettore, che si legano al TMD e funzionano in presenza di calcio esterno. I calciomimetici attivano il recettore, diminuendo la EC₅₀ (concentrazione di ligando a cui si raggiunge la metà della risposta massima) per il calcio e determinando una maggior liberazione di calcio intracellulare. Sono state sintetizzate diverse molecole con queste caratteristiche: i calciomimetici di prima generazione, R-568 e R-467, sono stati poi sostituiti da quelli di seconda generazione, più tollerabili per l'uomo, come AMG 073, noto anche come CinacalcetTM (^{162, 163}) (figura 14).

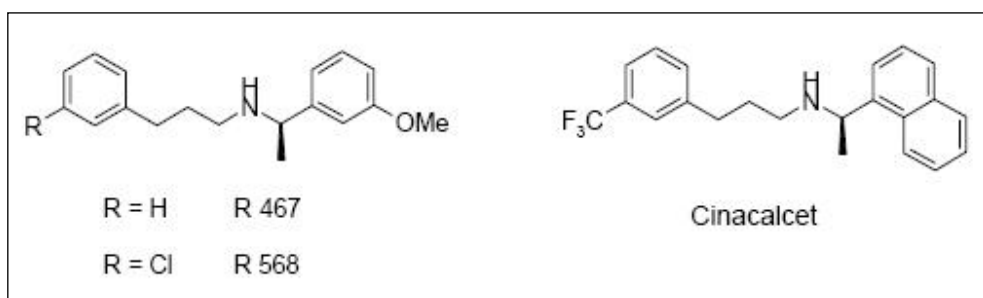


Figura 14. Struttura dei calcimimetici di prima generazione R-568 (oggetto di studio in questo lavoro) e R-467, e del calcimimetico di seconda generazione Cinacalcet. Figura da Nemeth EF, *Cell Calcium*, 2004 (¹⁶⁴).

Attualmente in sperimentazione si trova anche il calcimimetico di ultimissima generazione AMG 641, già testato su ratti uremici (¹⁶⁵) e attualmente usato nel nostro laboratorio per test in vitro su cellule HEK-293 trasfettate con il gene del CaSR, che sembra essere ancora più efficace dei precedenti calcimimetici sintetizzati.

L'utilizzo di questi composti sopprime la secrezione di PTH in modo dose dipendente e quindi abbassa il livello di calcio circolante. La loro efficacia è stata dimostrata in trials clinici su PHPT e SHPT; questi trials sono stati completati e il farmaco è stato approvato per l'utilizzo su soggetti uremici con SHPT e su soggetti con cancro della paratiroide (^{125, 166}).

I calciolitici, al contrario, si comportano come modificatori allosterici che, aumentando la EC_{50} per il calcio, funzionano come inibitori del recettore. Un esempio è dato dal calciolitico 2143, capace di stimolare la produzione di PTH. Studi fatti su culture cellulari e animali hanno confermato l'effetto di questo farmaco sul PTH. Inoltre in ratti osteoporotici si è visto un recupero di trabecole ossee dopo il trattamento con questo calciolitico. Questo effetto antiosteoporotico sarebbe forse mediato dall'attivazione della secrezione pulsatile del PTH da parte del calciolitico. La secrezione pulsatile del PTH ha infatti dimostrato un effetto anabolico sull'osso, mentre effetto catabolico avrebbe invece la secrezione continua del PTH come nell'iperparatiroidismo (^{167, 168}). Questi dati fanno pensare ad un possibile utilizzo dei farmaci calciolitici nell'osteoporosi (¹⁶⁹).

In questi ultimi anni stanno iniziando anche studi di farmaco-genomica il cui scopo è verificare se l'azione dei calcimimetici e dei calciolitici possa essere diversa in base al profilo genico dei soggetti, e quindi se la risposta al trattamento possa essere prevedibile in base al genotipo del CaSR del soggetto trattato (¹⁷⁰).

1.11 I polimorfismi del CaSR

A carico del recettore esistono polimorfismi che potrebbero alterare la sua funzione e contribuire all'insorgenza di patologie complesse. I polimorfismi più frequenti si trovano nel dominio C-terminale del recettore e inducono un cambio aminoacidico non conservativo: Ala986Ser, Gln1011Glu e Arg990Gly. Questi SNPs sono stati identificati per la prima volta da Heath in soggetti affetti da ipercalcemia ipocalciurica familiare (¹³⁴). In particolare il polimorfismo Ala986Ser è dato da una sostituzione nucleotidica in prima base al codone 986 da GCC a TCC (c.2956G>T), che causa il cambio aminoacidico da alanina a serina. Nelle diverse casistiche la variante polimorfica ha una frequenza di circa il 30-40% (¹⁷¹) e sembra avere un'azione inattivante sul recettore, infatti è stata trovata associata ad un aumento della calcemia (^{172, 173}). È presente in numerosi casi di PHPT (^{174, 175}) e ci sono dati sull'associazione con la massa minerale ossea (¹⁷⁶).

Il polimorfismo Gln1011Glu sostituisce la glutamina con il glutammato modificando il codone 1011 da CAG a GAG (c.3031C>G). È lo SNP meno frequente, presente solo nel 6-10% dei soggetti analizzati. Sul suo ruolo funzionale ancora poco è noto, è stata riscontrata una associazione con livelli elevati di calcemia, seppur nei limiti di norma. Potrebbe perciò provocare l'inattivazione della funzione recettoriale. Una associazione con l'ipertensione è stata descritta in soggetti di origine afro-americana (¹⁷⁷). Infine, il polimorfismo Arg990Gly porta alla sostituzione di un'arginina con una glicina dovuta al cambio del codone 990 da AGG a GGG (c.2968A>G) (Figura 15). La frequenza di questo polimorfismo nella popolazione caucasica è del 8-10%. Questo SNP mostra un effetto attivante sulla funzione del recettore con il conseguente aumento dell'escrezione di calcio. Negli studi condotti su una popolazione sana i livelli di calcio plasmatico sono risultati inferiori nei soggetti portatori della variante 990Gly, pur avendo valori normali di PTH (¹⁷³). Pazienti caucasici con PHPT mostrano valori di PTH inferiori in associazione con

l'allele 990Gly (¹⁷⁸) e in particolare, in uno studio condotto su una popolazione italiana con PHPT, il polimorfismo 990Gly aumenta il rischio di sviluppare nefrolitiasi calcica. In uno studio su una popolazione giapponese, dove la frequenza del polimorfismo è invertita (l'allele minore risulta essere 990Arg), nei soggetti con PHPT l'allele 990Gly era associato ad un livello di PTH inferiore rispetto al 990Arg (¹⁷⁹); lo stesso risultato è stato ottenuto nei nipponici con HPT secondario (¹⁸⁰). Questi dati confermano l'azione attivante del polimorfismo sull'attività del recettore. Inoltre studi di popolazione mostrano un'associazione del gene CaSR con il fenotipo ipercalcemico ed evidenziano l'associazione tra l'escrezione di calcio e il polimorfismo Arg990Gly (¹⁸¹). In particolare è stato condotto uno studio caso-controllo su 231 soggetti con nefrolitiasi di calcio, suddivisi in 134 ipercalcemici e 97 normocalcici confrontati con 101 soggetti sani normocalcici. La frequenza dell'allele 990Gly è risultata significativamente aumentata nei soggetti calcotici ipercalcemici sia confrontata con i soggetti sani di controllo che con i soggetti calcotici normocalcici (9.7% vs 1% and 2.1%). Il rischio relativo di essere ipercalcemico risultava significativamente più alto nei soggetti portatori della variante allelica 990Gly (OR (odd ratio) 13, 95% CI (confidence interval) 1.7-99.4) (¹⁸¹). Tuttavia l'associazione tra lo SNP R990G e l'ipercalcemia risulta essere indipendente dalla calciosi. Infatti in un secondo studio condotto su un gruppo di 243 donne non calcotiche, suddivise in ipercalcemiche e normocalcemiche, la frequenza dell'allele 990Gly è risultata predominante nei soggetti ipercalcemici rispetto a quelli normocalcici (¹⁸²).

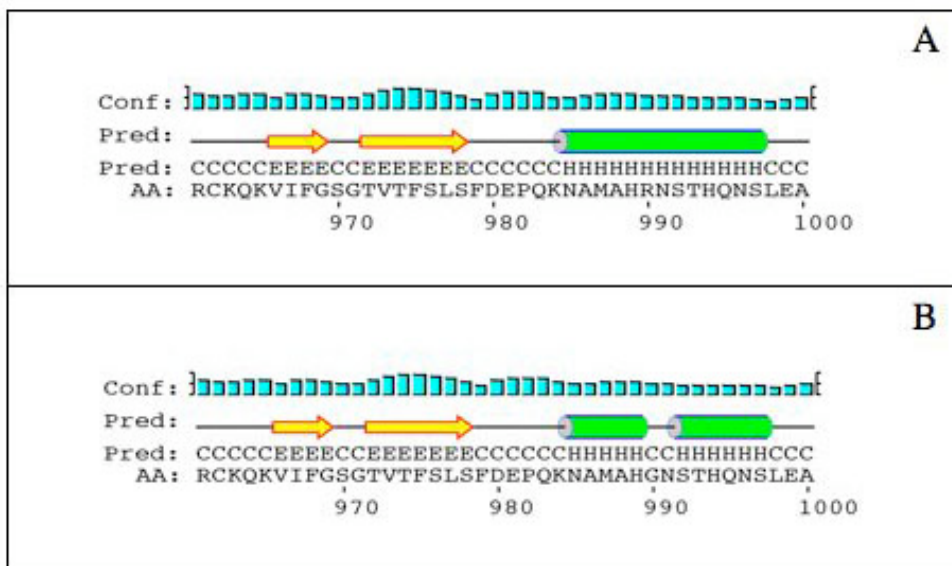


Figura 15. La predizione della struttura secondaria del CaSR è ottenuta con il tool bioinformatico PSIPRED. L'immagine mostra la regione molecolare intorno al codone 990. Un' α -elica tra i codoni 984 e 997 viene interrotta dalla sostituzione dell'arginina (pannello A) con la glicina (pannello B). Legenda della figura: Conf = confidence of prediction; Pred = predicted secondary structure (H = helix; C = coil; E = strand); AA = target amino acid sequence. La confidenza di predizione con questo metodo è tra il 50 e il 75%.

1.12 Studio funzionale del polimorfismo R990G

Studi funzionali in vitro hanno dimostrato una gain-of-function del recettore CaSR polimorfico R990G. Cloni stabili delle cellule HEK-293 (human embryonic kidney cells) sono stati ottenuti per il gene CaSR wild-type e i suoi polimorfismi esonici A986S, R990G e Q1011E (HEK-wt, HEK-986S, HEK-990G, HEK-1011E). Dopo stimolazioni con crescenti concentrazioni di calcio extracellulare (CaCl_2), in queste linee cellulari è stata misurata la variazione della concentrazione di calcio intracellulare, mediante Fura-2/AM, marcatore fluorescente calcio-specifico, e calcolata la concentrazione di CaCl_2 a cui si raggiunge la metà della risposta massimale (EC_{50} di CaCl_2). Le cellule HEK-990G mostrano incrementi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ maggiori rispetto alle cellule HEK-wt e agli altri due polimorfismi: la quantità di CaCl_2 necessaria per dare la stessa variazione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è inferiore per le cellule

HEK-990G rispetto alle altre (EC_{50} : HEK-990G=2.69±0.11 mM [n=19] vs HEK-wt=4.49±0.28 mM [n=12], HEK-986S=4.28±0.25 mM [n=11], HEK-1011E=4.04±0.25 [n=9]; p=0.0001, Sheffè test). Le cellule trasfettate con i polimorfismi A986S e Q1011E hanno valori di EC_{50} del tutto sovrapponibili alle cellule wild-type, mentre le cellule trasfettate con il gene polimorfico al codone 990 (HEK-990G) hanno dimostrato una maggior sensibilità alle variazioni di calcio rispetto a quelle esprimenti il recettore wild-type e gli altri due polimorfismi della coda. I valori di EC_{50} registrati per le cellule HEK-990G suggeriscono un guadagno di funzione del recettore (¹⁸²). In un successivo studio è stato valutato l'effetto calciomimetico R-568, modulatore allosterico positivo del CaSR, sull'attività del recettore polimorfico R990G. L'azione del R-568 consiste nell'aumentare l'affinità del recettore verso il calcio extracellulare (riduce la EC_{50} per il calcio) e non è in grado di attivare il CaSR in assenza di calcio. Cellule Hek-293 stabilmente trasfettate con il recettore wild type (HEK-wt) e polimorfico (HEK-990G) sono state stimulate con crescenti concentrazioni di calcio extracellulare ($CaCl_2$) in presenza e assenza di diverse concentrazioni di calciomimetico R-568. Le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ sono state misurate sia su popolazione cellulare intera che a livello di singola cellula. Nel primo caso le cellule HEK-990G sono risultate più sensibili alle stimolazioni con $CaCl_2$ in presenza di concentrazioni di R-568 inferiori a 0.1 μM , mostrando un aumento della concentrazione di calcio intracellulare e una EC_{50} inferiore rispetto alle cellule HEK-wt. La somministrazione di concentrazioni superiori di calciomimetico annulla le differenze riscontrate nei due tipi cellulari (¹⁸³). Sembra inoltre che l' R-568 agisca positivamente anche sul pathway oscillatorio del calcio, in quanto aumenta le oscillazioni della $[Ca^{2+}]_i$ (⁸⁷). Sono stati riscontrati 2 differenti di patterns oscillatori: 1) oscillazioni transitorie, con picchi che tornano al basale e 2) oscillazioni sinusoidali, con piccoli picchi che non tornano mai al basale. Entrambi i modelli possono verificarsi nella stessa cellula in risposta a stimoli differenti o a cambiamenti nella concentrazione dell'agonista ed è stato ipotizzato che possano essere coinvolti in differenti vie di segnalazione.

I risultati ottenuti negli esperimenti in singola cellula sono in accordo con i precedenti condotti su intera popolazione cellulare. L'effetto sensibilizzante del calciomimetico è stato osservato in entrambi i tipi cellulari, ed è dose dipendente,

infatti all'aumentare della concentrazione di R-568 aumenta la sensibilità verso il calcio extracellulare. Per quanto riguarda l'attivazione del pathway oscillatorio della $[Ca^{2+}]_i$, questi esperimenti confermano l'azione del calciomimetico R-568 come potenziatore delle oscillazioni. Infatti, l'aggiunta del calciomimetico porta a una precoce attivazione delle oscillazioni in entrambi i tipi cellulari, in misura maggiore per il recettore polimorfico. La percentuale di cellule HEK-990G oscillanti in presenza di R-568 0.01 μ M è più alta rispetto alla percentuale di cellule HEK-wt, mentre la differenza si annulla aumentando la concentrazione di calciomimetico. Ciò conferma che il polimorfismo al codone 990 promuove una differente risposta al calciomimetico R-568.

Allo scopo di valutare se quest'ultimo segua una diversa via di segnalazione nell'attivazione e nel mantenimento delle oscillazioni della $[Ca^{2+}]_i$, è stata valutata la risposta al $[Ca^{2+}]_o$ in presenza di inibitori o attivatori delle componenti della via di segnalazione del CaSR, in particolare di quelle che risultano coinvolte nell'attivazione del pathway di afflusso ed efflusso di calcio e che determinano le oscillazioni della $[Ca^{2+}]_i$. Un risultato interessante è stato ottenuto utilizzando l'attivatore e l'inibitore della protein kinasi C (PKC): PDBu e Ro 31-8220 (Figura 16). L'attivazione della PKC blocca l'oscillazione in entrambi i tipi cellulari, mentre la sua inibizione produce effetti solo nelle cellule HEK-wt, in cui riduce l'oscillazione della $[Ca^{2+}]_i$. Questi dati lasciano presupporre che la forma wild-type del recettore e il polimorfismo Arg990Gly non utilizzino la stessa via di segnalazione per indurre le oscillazioni di calcio intracellulare e che ciò avvenga in modo PKC-dipendente per la forma wild-type del CaSR e in modo PKC-indipendente per la forma polimorfica.

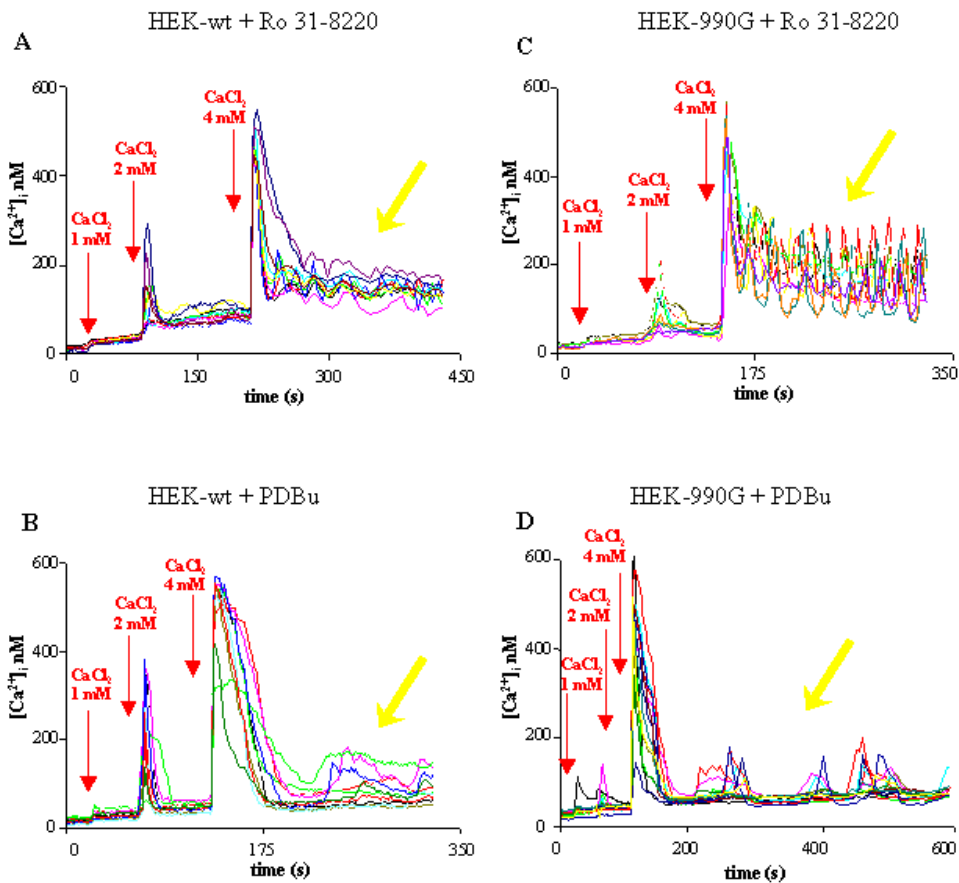


Figura 16: Variazioni temporali della $[Ca^{2+}]_i$ nelle diverse popolazioni cellulari in seguito a stimolazione con concentrazioni crescenti di calcio extracellulare ($CaCl_2$ 1, 2 e 4 mM, le frecce rosse indicano il momento di aggiunta di $CaCl_2$) in presenza di inibitori o attivatori delle componenti della via di segnalazione del CaSR. La freccia gialla indica la posizione in cui, nei controlli, si osservavano oscillazioni della concentrazione di calcio intracellulare. I traccati sono rappresentativi di 3 esperimenti analoghi per ogni tipo cellulare e trattamento, qui riportati come: HEK-wt (pannello **A**) ed HEK-990G (pannello **C**) per il trattamento con Ro 31-8220 1.25 μM (inibitore della PKC); HEK-wt (pannello **B**) ed HEK-990G (pannello **D**) per il trattamento con PDBu 100 nM (attivatore di PKC). Ogni linea rappresenta il comportamento delle singole cellule del campo cellulare analizzato (¹⁸³).

Infine è stato riscontrato che la stimolazione con CaCl_2 e R-568 causa un incremento della fosforilazione di p44//42 extracellular signal-regulated kinase (ERK) con un valore di Ca-EC_{50} significativamente più basso nelle HEK-990G (Tabella 1). E' stato dimostrato che il pathway di ERK è coinvolto nella modulazione della secrezione del paratormone (PTH) in cellule paratiroidee (¹⁸⁴). L'attivazione del pathway delle MAPK mediata dal CaSR richiede l'interazione del recettore con una proteina scaffold del citoscheletro, la Filamina A. La filamina A interagisce con la porzione carbossi-terminale del CaSR a livello dei residui 907-997 (^{43,44}) proprio all'interno di questa regione cade il polimorfismo R990G. Tale interazione sembrerebbe stabilizzare il CaSR e attenuare la sua degradazione, facilitando il signaling delle MAPK (¹⁸⁵).

	EC_{50} HEK-WT	EC_{50} HEK-990G	<i>P</i> value (Student's <i>t</i> -test)
R-568 ($\mu\text{mol/l}$)			
0.01	3.18 ± 0.06	1.79 ± 0.01	0.002
0.05	2.13 ± 0.45	1.48 ± 0.50	NS
0.1	2.48 ± 0.02	2.22 ± 1.23	NS
NS, not statistically significant.			

Tabella 1: Effetto del calciomimetico R568 sull'attivazione di p44/42 ERK nelle cellule HEK-WT e HEK-990G (¹⁸³).

2. SCOPO DELLA TESI

2.1 Obiettivo dello studio

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di confermare l'ipotesi che il CaSR wild-type e polimorfico Arg990Gly seguano due differenti vie di trasduzione del segnale e di investigare il coinvolgimento della Filamina A in questo processo. Per raggiungere questo obiettivo, verrà valutata l'interazione tra Filamina A e CaSR e l'effetto del polimorfismo su questa interazione. In particolare, sarà valutato se l'assenza di Filamina A porti ad un cambiamento nell'attivazione di ERK mediata dal CaSR e se venga mantenuto il guadagno di funzione del recettore polimorfico. Inoltre verrà indagato il ruolo della Filamina A nella risposta delle due forme recettoriali alle stimolazioni con calcio extracellulare in presenza del calcimimetico R-568. Lo studio dell'interazione CaSR-Filamina A verrà effettuato anche in tessuti di adenoma e carcinoma della paratiroide valutando i livelli di espressione del CaSR e della Filamina A in confronto al tessuto paratiroideo sano.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Le cellule Human Embryonic Kidney 293 (HEK-293) (Cell Bank, IST, Genoa, Italy), sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10% e 1% penicillina/streptomicina, in condizioni standard (5% CO₂, 37° C).

3.2 Trasfezione transiente

La trasfezione è stata effettuata in cellule HEK-293 seminate e fatte crescere in MW6. In ogni well sono state seminate 100.000 cellule in DMEM 10%. Le cellule sono state trasfettate ad una confluenza del 70-90%, con il DNA plasmidico contenente l'allele 990Arg (WT) o l'allele 990Gly del gene CaSR. Sono stati utilizzati 10 µl di Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) e 4µg di DNA plasmidico diluiti in terreno OPTIMEM I (Invitrogen). 24h dopo la trasfezione il mezzo completo è stato sostituito con il mezzo di starvation (DMEM senza siero e con l'1% penicillina/streptomicina). L'espressione e l'attività genica sono state analizzate 72h dopo la trasfezione.

3.3 Silenziamento genico (RNA interference)

Le cellule HEK-293 cresciute in MW6 (200.000 cellule) in DMEM completo, sono state trasfettate ad una confluenza del 70-90 %. Al momento del silenziamento è stato cambiato il mezzo completo con DMEM senza siero e senza antibiotico. Sono stati utilizzati 500 pmol del siRNA (Stealth RNAi, Invitrogen) specifico per l'mRNA della Filamina A (FLNA) e 5 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) diluiti in OPTIMEM I (Invitrogen). Come controllo negativo del silenziamento è stato scelto il medium GC duplex stealth RNAi negative control duplex human, secondo le indicazioni del produttore (scrambled siRNA) (Invitrogen). Come controllo positivo è stato scelto il GAPDH, stealth RNAi positive control duplex human. A 72 ore dalla trasfezione è stata valutata l'espressione proteica tramite Western blot e l'espressione dell'mRNA tramite real-time.

3.4 Western Blot

Le colture cellulari sono state tripsinizzate e i pellets sono stati lisati con un tampone RIPA buffer. I lisati sono stati centrifugati a 15000 rpm per 10 minuti a 4°C e i surnatanti raccolti e quantificati con il metodo BCA (Pierce), in triplicato, con curva di BSA (0, 125, 250, 500, 750, 1000 ng/μL). Le proteine sono state denaturate con un tampone denaturante: 7 M Urea, 2 M Thiurea, 65 mM DTT, 5x loading buffer per 60 minuti, a temperatura ambiente (RT), dopo 30' si aggiungeva iodoacetammide 130mM. Cinque μg di campioni erano caricati su gel di acrilamide all'8% e separati in condizioni denaturanti e poi trasferiti su membrana PVDF a 400 mA per 2h. Le membrane erano bloccate con latte al 5% in TBST e successivamente incubate, O.N. a 4°C, rispettivamente con un anticorpo monoclonale di topo anti-Filamina (1:5000) (Abnova) e un anticorpo di topo anti-CaSR 1:10000 (Affinity Bioreagents). Le membrane erano incubate con anticorpi secondari anti-mouse per 2h a RT con una diluizione di 1:5000 per la Filamina A (FLNA) e 1:10000 per il CaSR. Le stesse membrane erano incubate con un anticorpo primario di topo anti-GAPDH, O.N. a 4°C, 1:5000 (Abnova) e per 2h a RT con un anticorpo secondario anti-mouse (1:5000) e di seguito, con un anticorpo primario rabbit anti-actina (Sigma) per 2h (1:1000) a RT e con l'anticorpo secondario anti-rabbit per 1h 1:5000 a RT. Per la determinazione di Total-Erk e Phospho-Erk 1/2, dopo 72h dal silenziamento le cellule sono state stimolate con diverse concentrazioni di CaCl₂ (1, 3 e 5mM) a 37 °C per 10 minuti. La reazione è stata bloccata in ghiaccio e le cellule sono state staccate e trattate con RIPA Buffer per l'estrazione proteica (come prima descritto). Sono stati caricati 10 μg di proteine su gel di acrilamide all'10%. Per la rilevazione sono stati utilizzati gli anticorpi primari rabbit: p44/42 Erk 1/2 e phospho - p44/42 Erk 1/2 (Cell Signaling Technology) diluiti 1:1000 e 1:2000, rispettivamente. Le bande proteiche specifiche sono state rilevate con SuperSignal West Pico enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). La quantificazione delle bande ottenute è stata effettuata mediante misurazione dell'area delle bande con il software Image J sulle immagini densitometriche ottenute dalle lastre.

3.5 Quantitative real time PCR

L'RNA totale è stato estratto da cellule HEK-293 trasfettate con il gene CaSR WT o polimorfico e silenziate per la Filamina A, utilizzando il PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). L'espressione dell'mRNA del CaSR e della Filamina A è stata determinata con quantitative real time PCR su cDNA retrotrascritto da RNA totale con il Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). La real-time PCR è stata condotta amplificando 100 ng di cDNA con SYBR Premix Ex Taq utilizzando 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Le condizioni d'amplificazione sono state: 94°C per 5', seguita da 40 cicli a 94°C per 30", 57°C per il gene CaSR, 60° C per il GAPDH (gene housekeeping) e 63 per FLNA per 1', e 55°C per 30". I dati di fluorescenza sono stati registrati a 57-60-63°C. Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA del CaSR sono: 5'ATGCCAAGAAGGGAGAAAGACTCTT 3' (CaSR Forward) e 5' TCAGGACACTCCACACACTCAAAG 3' (CaSR Reverse). Le sequenze dei primers utilizzati per il gene GAPDH sono: 5' CTCATGACCACAGTCCATGCCATC 3' (GAPDH Forward) e 5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT 3' (GAPDH Reverse). Le sequenze dei primers utilizzati per il gene FLNA sono: 5' CAGTGCTATGGGCCTGGTAT 3' (FLNA Forward) e 5' CCACTTTGTACATGCCATCG 3' (FLNA Reverse). L'analisi della melting curve sui prodotti d'amplificazione è stata condotta alla fine di ogni reazione di PCR allo scopo di escludere la presenza di prodotti aspecifici di PCR. I dati sono stati analizzati con il 7500 Fast System SDS Software. La quantificazione relativa del gene è stata normalizzata per il gene housekeeping GAPDH e i dati sono stati riportati come rapporto mRNA CaSR/mRNA GAPDH e mRNA FLNA/mRNA GAPDH.

Con la medesima procedura sono stati misurati i livelli di mRNA del CaSR, della FLN A e del GAPDH (gene housekeeping) in 23 tessuti di adenoma della paratiroide.

3.6 Genotipizzazione

Sono stati genotipizzati 23 tessuti di adenoma della paratiroide per lo SNP R990G del gene CaSR mediante tecnica di discriminazione allelica basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti Taqman® sul sistema 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems). La reazione è stata effettuata utilizzando 20 ng di DNA genomico, 0.2 µl di kit dell'Applied Biosystem 40X, 4 µl di Master Mix 2X e 0.16 µl di ROX 50X (Takara-Lonza Walkersville, MD) in un volume finale di 8 µl alle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95° C per 20" e 40 cicli di amplificazione a due step, 95°C per 3" e 60° C per 30". Per ogni SNP è stato utilizzato uno specifico Taqman® SNP genotyping assay (Applied Biosystems). I genotipi sono stati assegnati in automatico dal Applied Biosystems Software Package SDS 2.1.

3.7 Immunoistochimica (IH) Filamina A

Campioni di tumore paratiroideo [biopsie delle paratiroidi normali (n = 4), adenomi sporadici benigni delle paratiroidi (n = 10), carcinoma delle paratiroidi (n = 7)] sono stati fissati in formalina al 10% seguita da trattamento convenzionale e inclusi in paraffina. Tali adenomi e carcinomi paratiroidi sono stati asportati chirurgicamente da pazienti con diagnosi clinica e ormonale di iperparatiroidismo primitivo; i campioni sono stati raccolti presso le U.O. di Endocrinologia dell'IRCCS Policlinico San Donato di San Donato M.se (MI), della Fondazione Cà Granda Policlinico Ospedale Maggiore di Milano e dell'IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (FG). Sezioni di 4 µm di spessore sono stati tagliati e colorati con ematossilina ed eosina per la valutazione istopatologica ed esaminati al microscopio ottico. Studi immunoistochimici sono stati effettuati su sezioni di tessuto di 4 µm di spessore, fissato in formalina e incluso in paraffina, utilizzando un Novolynk Polymer Detection System (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, Gran Bretagna) con un anticorpo per la Filamina A umana (Abnova Corporation, Taiwan). Le sezioni sono state deparaffinate in Bioclear (Bio Optica, Milano, Italia) per 20 minuti poi lavati due volte in etanolo. L'attività perossidasi endogena è stata bloccata con 3% di perossido di idrogeno in acqua distillata per 10 min. La

colorazione è stata eseguita con 3,3 'diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. Per la colorazione della Filamina A l'anticorpo primario è stato applicato ad una diluizione di 1:200 in BSA 0,5% e sodio azide e incubato 30 minuti a temperatura ambiente. I vetrini in assenza dell'anticorpo primario sono stati inclusi come controlli negativi.

3.8 Immunofluorescenza (IF) CaSR e FLNA

Cellule Hek-293 trasfettate con plasmidi contenenti il gene WT-CaSR o R990G-CaSR e cellule isolate da adenomi umani della paratiroide sono state fissate in paraformaldeide 4%, permeabilizzate in 0,1% Triton X-100, e bloccate in 1% BSA-PBS per 2 ore. Le cellule sono state incubate con anticorpi primari, Filamina A (anti-FLNA mAb Abnova) e CaSR, lavate tre volte in PBS e quindi incubate con anticorpi secondari coniugati con FITC, DyLight549 e Cy3 (Jackson Immuno Research; 1:100). Hoechst 33342 è stato utilizzato come colorante nucleare (blu). Come controllo di specificità, il PBS è stato usato al posto di anticorpi primari per escludere il legame aspecifico dell'anticorpo secondario. Le immagini sono state ottenute usando la microscopia a fluorescenza e una fotocamera digitale.

3.9 Analisi statistica

I risultati sono stati riportati come valori medi±deviazione standard. Le differenze nei valori medi sono state testate con lo Student's t-test. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

4. RISULTATI

4.1 Effetto del silenziamento della Filamina A sull'espressione del Calcium-sensing receptor

Per testare l'effetto del silenziamento della FLNA sulla via di segnalazione attivata dal CaSR, le cellule HEK-293 sono state co-trasfettate con il siRNA della FLNA e il plasmide contenente il gene CaSR WT o polimorfico. Dopo 72h, è stata valutata l'espressione del CaSR e della FLNA mediante Real-time PCR e Western blot. Cellule co-trasfettate con il siRNA controllo negativo e il plasmide contenente il gene CaSR sono state utilizzate come controllo (siRNA Ctr-). La percentuale media di silenziamento della FLNA, ottenuta da tre diversi esperimenti, era del 70-80% (figura 17 A e B).

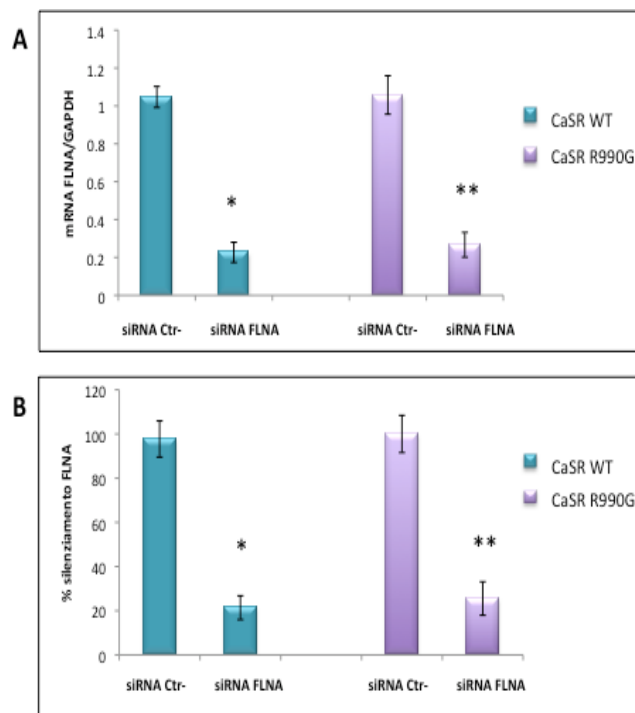


Figura 17: Silenziamento FLNA. La Real-time PCR (A) è stata eseguita su estratti di RNA da cellule HEK-293 silenziate per la FLNA e trasfettate con i plasmidi WT-CaSR o R990G-CaSR. Il western blot (B) è stato eseguito su estratti proteici totali. Come controllo negativo è stato utilizzato un siRNA scramble co-trasfettato con il gene CaSR. I livelli di mRNA della Filamina A sono stati normalizzati sui livelli di mRNA di GAPDH. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. (A) * $P=0.0004$; ** $P=0.01$. (B) * $P=0.00001$; ** $P=0.0006$.

Il silenziamento della FLNA influenza l'espressione del CaSR: i livelli di mRNA del CaSR risultavano ridotti sia nelle cellule WT-CaSR che nelle cellule R990G-CaSR (figura 18). Lo stesso risultato è stato ottenuto valutando l'espressione proteica del recettore mediante western blot, sia su estratti proteici totali (figura 19 A) che proteine di membrana (figura 19 B), infatti l'espressione del CaSR WT e R990G risultavano diminuiti in maniera significativa in assenza di FLNA. Inoltre è stata riscontrata una maggiore espressione del CaSR R990G rispetto al CaSR WT in presenza di FLNA, questo dato potrebbe spiegare il guadagno di funzione del recettore polimorfico. L'espressione del del recettore in cellule co-trasfettate con il siRNA controllo negativo e il plasmide contenente il gene CaSR (siRNA Ctr-) è risultata paragonabile all'espressione proteica ottenuta da cellule trasfettate con il solo plasmide del gene CaSR (dati non mostrati).

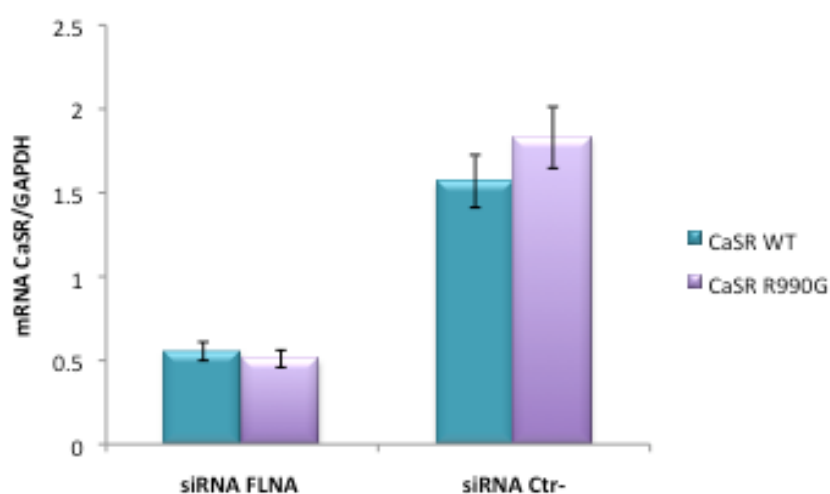


Figura 18: Misurazione dei livelli di mRNA del CaSR. La Real-time PCR è stata eseguita su estratti di RNA totale. Come controllo negativo è stato utilizzato un siRNA scramble co-trasfettato con il gene CaSR. I livelli di mRNA del CaSR sono stati normalizzati sui livelli di mRNA di GAPDH. CaSR-WT (siRNA FLNA 0.55 ± 0.23 vs siRNA Ctr- 1.56 ± 0.80); CaSR-R990G (siRNA FLNA 0.51 ± 0.37 vs siRNA Ctr- 1.82 ± 1.43). Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

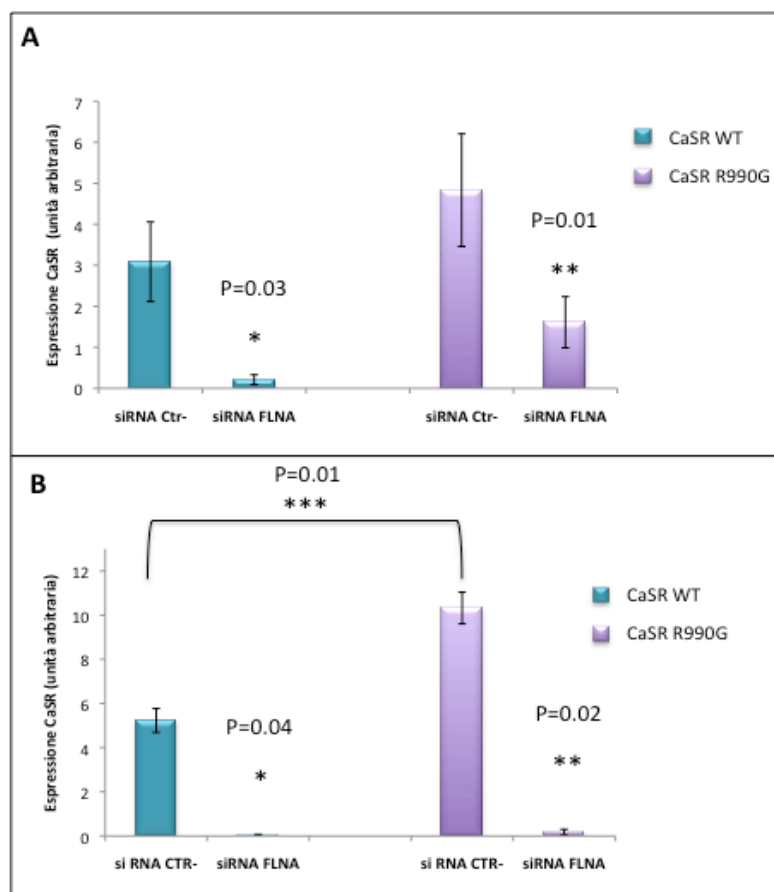


Figura 19: Espressione proteica del CaSR. L'analisi di Western blot è stata eseguita su estratti proteici totali (A) e su proteine di membrana (B). Un siRNA scramble co-trasfettato con il CaSR è stato utilizzato come controllo negativo (siRNA Ctr-). Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

Questi dati sono stati confermati mediante analisi di immunofluorescenza in cellule HEK-293 silenziate per la FLNA e trasfettate con il recettore WT o polimorfico. Le immagini hanno mostrato, come atteso, una diminuzione dell'espressione della Filamina A dopo silenziamento e una concomitante diminuzione dell'espressione del CaSR WT rispetto alle cellule esprimenti la Filamina A (figura 20). Inoltre, il confronto tra l'espressione dei due tipi recettoriali (WT e polimorfico) in cellule silenziate per la FLNA ha mostrato una maggiore riduzione della proteina CaSR WT rispetto a quella CaSR R990G, in accordo con i risultati di western blot con

estratti proteici totali (figura 21).

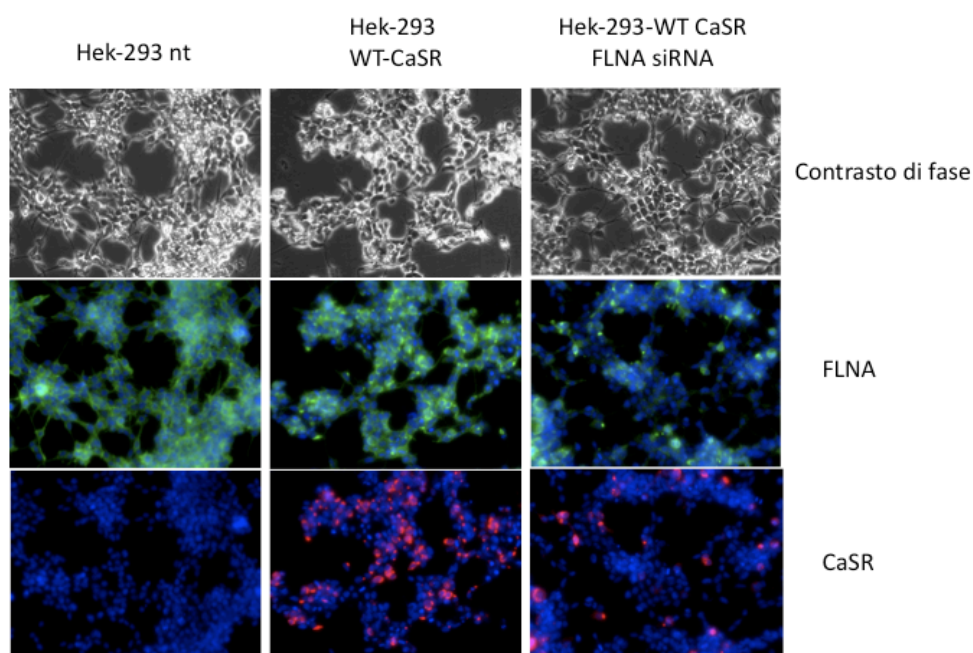


Figura 20: immagini di immunofluorescenza di FLNA e CaSR in cellule Hek-293. I pannelli mostrano le cellule HEK-293 non trasfettate (pannelli prima colonna), cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide WT-CaSR (pannelli seconda della colonna) e cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide WT CaSR e silenziate per FLNA (pannelli terza colonna). L'immunocolorazione per la FLNA viene visualizzata in verde, per il CaSR in rosso.

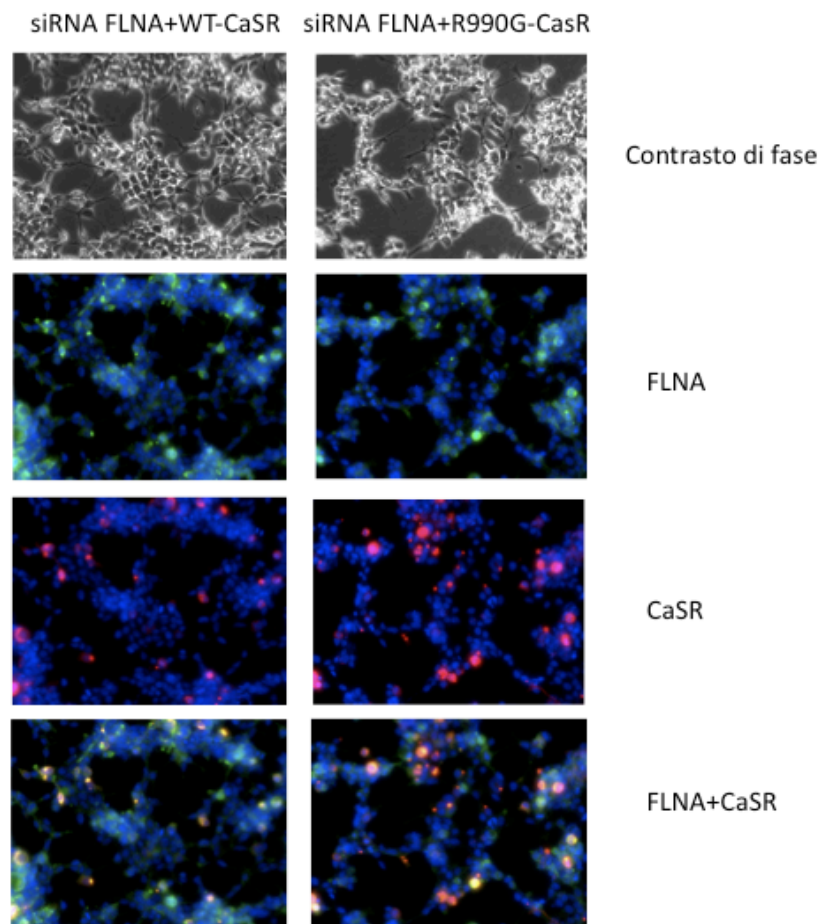


Figura 21: Confronto tra cellule WT-CaSR e R990G-CaSR. I pannelli mostrano cellule HEK-293 trasfettate con CaSR WT e polimorfico e silenziate per la FLNA. L'immunocolorazione per la FLNA viene visualizzata in verde, per il CaSR in rosso.

4.2 Effetto del silenziamento della FLNA sull'attività del Calcium-sensing receptor

Per testare le eventuali modifiche del pathway del CaSR nelle cellule silenziate per la FLNA, abbiamo valutato l'attività di ERK 1/2. A questo scopo sono stati misurati i livelli di fosforilazione di ERK (p-ERK) attraverso Western Blot in cellule WT-CaSR e R990G-CaSR, dopo stimolazione con CaCl₂ (1, 3 e 5 mM) e con calcimimetico R568 (0, 0.01 e 0.1 μM). Per le concentrazioni 1 e 3 mM di CaCl₂, i livelli di p-ERK erano significativamente diminuiti sia nelle cellule WT-CaSR che R990G-CaSR in assenza di FLNA (figura 22 A e B). Stimolando le cellule con 5 mM di CaCl₂ veniva mantenuta la differenza tra cellule silenziate e non, anche se la differenza non era statisticamente significativa (figura 22 C). Inoltre, le cellule R990G-CaSR hanno mostrato una maggiore risposta in presenza di FLNA rispetto alle cellule WT-CaSR, mantenendo sempre il guadagno di funzione del recettore polimorfico. Un risultato diverso è stato ottenuto stimolando le cellule con il calcimimetico R-568: a concentrazioni di 1, 3 e 5 mM CaCl₂ in presenza di R568 0,01 μM e 0.1 μM l'espressione di entrambi i tipi recettoriali non risultava diminuita in maniera significativa in assenza di FLNA (figura 23 A e B). Tuttavia, il CaSR polimorfico conservava il suo guadagno di funzione in presenza di FLNA rispetto al CaSR wild type con una differenza statisticamente significativa quando stimolato con CaCl₂ 3 mM e R-568 0,01 μM (figura 23 A). Le differenze scomparivano a concentrazioni maggiori di CaCl₂ e calcimimetico.

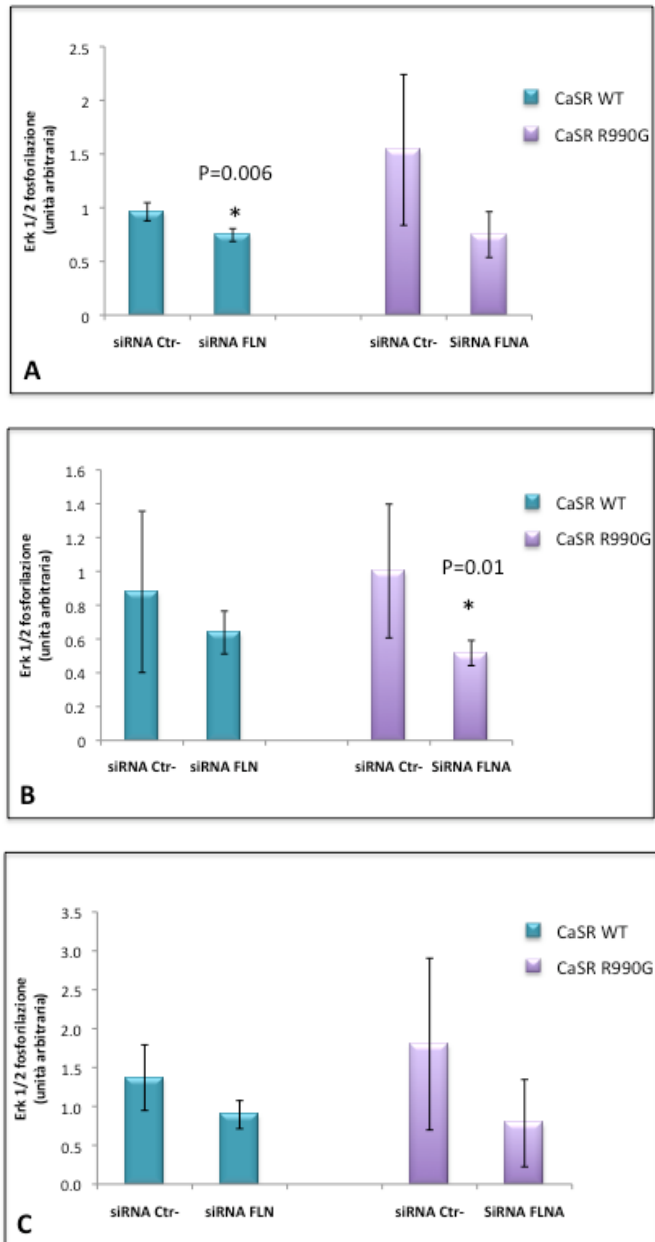


Figura 22: Livelli di fosforilazione di ERK 1/2. L'analisi di western blot è stata eseguita su estratti di proteine totali dopo stimolazione delle cellule con 1 mM CaCl₂ (A), 3 mM CaCl₂ (B) e 5 mM CaCl₂ (C). Un siRNA scramble cotrasfettato con il CaSR è stato utilizzato come controllo negativo. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

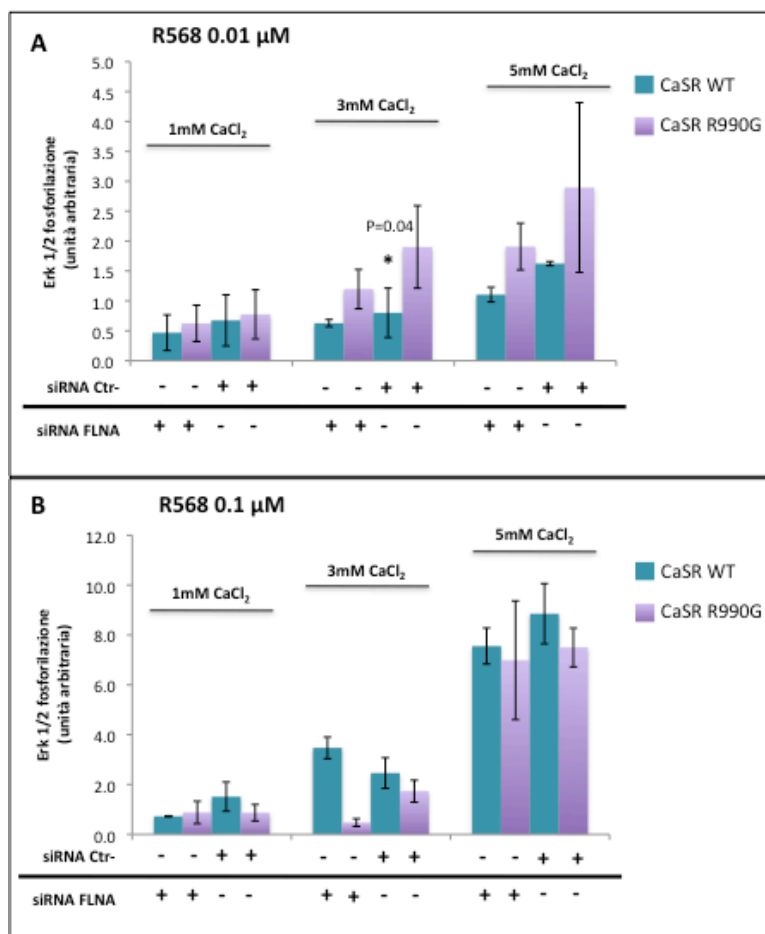


Figura 23: Livelli di fosforilazione di ERK 1/2 in presenza di R-568 in cellule silenziate per la FLNA. L'analisi di western blot è stata eseguita su estratti di proteine totali, dopo stimolazione delle cellule con CaCl₂ 1, 3 o 5 mM per 10 minuti, in presenza di R-568 a concentrazioni di 0,01 μ M (A) o 0,1 μ M (B). Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

4.3 Espressione della Filamina A nei tessuti tumorali paratiroidei

Nei tumori della paratiroide, in cui è stato riscontrato una riduzione dell'attività del CaSR (¹⁸⁴) è stata indagata la relazione tra CaSR e FLNA e le eventuali variazioni d'espressione delle due proteine nei tessuti tumorali. La valutazione dell'espressione della Filamina A è stata eseguita mediante immunostochimica su ghiandole paratiroidee normali (n=4), adenomi (n=10) e carcinomi (n=7) delle

paratiroidei, per valutare l'espressione di questa proteina in diversi gradi di malignità tumorale (Figura 24). I tessuti paratiroidei sani hanno mostrato circa 10-50% di cellule positive alla colorazione per la FLNA e in tutti i campioni testati, nessuno era totalmente negativo. I 2/3 (n=7) dei tessuti adenomatosi analizzati erano negativi o mostravano una percentuale di cellule positive per la FLNA minore del 10%, mentre meno di 1/3 (n=3) dei campioni adenomatosi mostravano più del 50% di cellule positive. Quindi nel complesso la positività delle cellule negli adenomi è risultata ridotta rispetto al tessuto sano. I carcinomi delle paratiroidei hanno mostrato un'ulteriore diminuzione dell'espressione della FLNA: meno di 1/3 (n=2) dei campioni erano decisamente negativi e 5 campioni hanno mostrato meno del 10% di cellule positive. Questi dati suggeriscono che l'espressione di FLNA diminuisce con l'aumento della malignità tumorale.

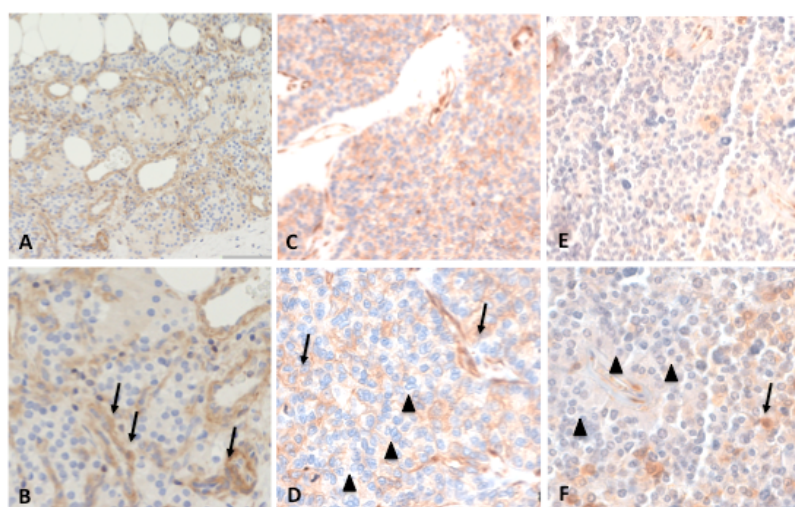


Figura 24: *Immunoistochimica per la FLNA in tessuti paratiroidei umani. Immagine esemplificativa di sezioni di un tessuto normale, di un adenoma e un carcinoma paratiroideo colorate con un anticorpo specifico anti-FLNA. I pannelli A e B mostrano tessuto paratiroideo normale: le cellule sono disposte in rosette con citoplasma positivo (freccie nere). I pannelli C e D mostrano un adenoma, i pannelli E ed F mostrano un carcinoma: le cellule sono disposte in cordoni, netta riduzione del numero di cellule con citoplasma positivo (freccie nere) e presenza di cellule con citoplasma negativo (punte di freccia). Pannelli superiori (A, C ed E): ingrandimento 10x. Pannelli inferiori (B, D ed F): ingrandimento 60x.*

4.4 Espressione della Filamina A e del CaSR in cellule tumorali della paratiroide

Esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti in cellule in coltura, ottenute da ghiandole paratiroidi adenomatose, allo scopo di valutare l'espressione delle proteine FLNA e CaSR. Le cellule adenomatose apparivano in coltura come piccole cellule arrotondate, ma erano presenti anche cellule fibroblasti-like (grandi e allungate). L'espressione della FLNA è risultata nettamente inferiore in cellule di adenoma della paratiroidee rispetto a cellule Hek-293, scelte come cellule che esprimono normali livelli di FLNA (Figura 25). Le cellule adenomatose hanno mostrato una diversa espressione di FLNA e CaSR, come mostrato nelle immagini di immunofluorescenza in figura 26. L'espressione della FLNA era molto scarsa, mentre il CaSR sembrava espresso principalmente nel citoplasma e non nella membrana (Figura 26 A). Solo poche cellule hanno mostrato una co-localizzazione tra FLNA e CaSR, ma comunque con una distribuzione periferica (Figura 26 B). Questi dati indicano una ridotta espressione della FLNA nelle cellule paratiroidi adenomatose.

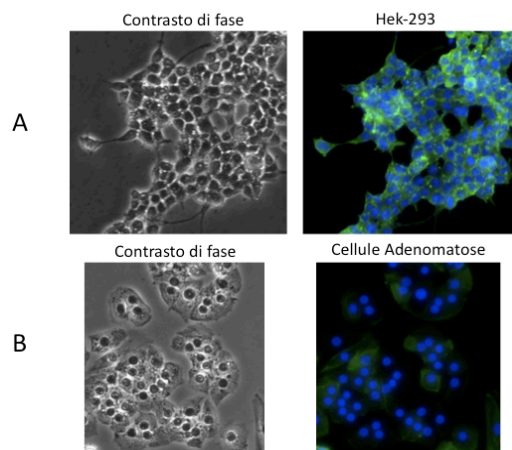


Figura 25: Immunofluorescenza della FLNA. Confronto di espressione tra cellule Hek-293 e cellule adenomatose. I pannelli in A mostrano cellule Hek-293 in contrasto di fase e dopo marcatura per la FLNA; i pannelli in B mostrano cellule di adenoma della paratiroide in contrasto di fase ed dopo marcatura per FLNA. L'immunocolorazione della FLNA è mostrata in verde, mentre i nuclei sono colorati in blu.

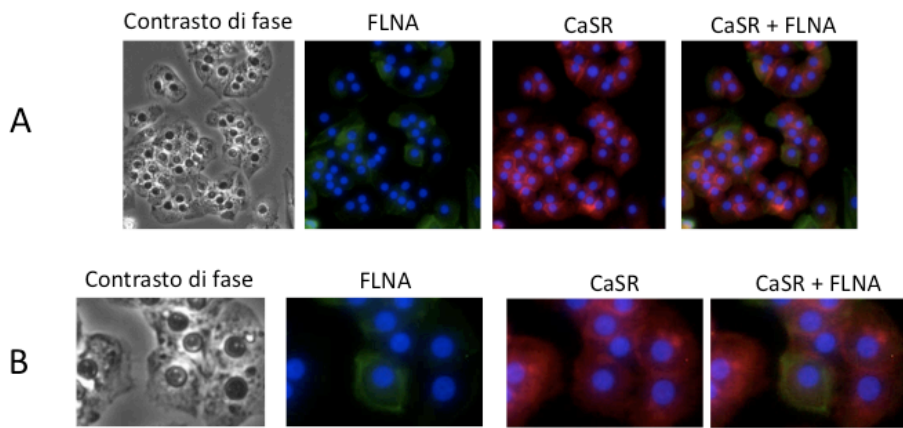


Figura 26: Immunofluorescenza di FLNA e CaSR in cellule tumorali paratiroidi umane. I pannelli mostrano un gruppo di cellule paratiroidi che dimostrano immunocolorazione per la FLNA in verde, immunocolorazione per il CaSR in rosso, e l'immagine risultante dalla fusione di FLNA e CaSR in giallo (A). I pannelli inferiori mostrano l'ingrandimento dei pannelli superiori (B). Il nucleo è colorato in blu.

4.5 Correlazione dei livelli di mRNA di FLNA e CaSR in presenza dello SNP R990G del CaSR nei tumori delle paratiroidi

I livelli di mRNA della FLNA e del CaSR sono stati misurati mediante Real-Time PCR in 30 adenomi delle paratiroidi. Gli stessi campioni sono stati genotipizzati per il polimorfismo R990G del CaSR, al fine di correlare l'espressione delle due proteine con il genotipo (Figura 27). I risultati hanno mostrato un significativo aumento sia dell'espressione della FLNA che del CaSR in presenza del genotipo eterozigote (AG) rispetto al genotipo omozigote per l'allele più frequente (AA).

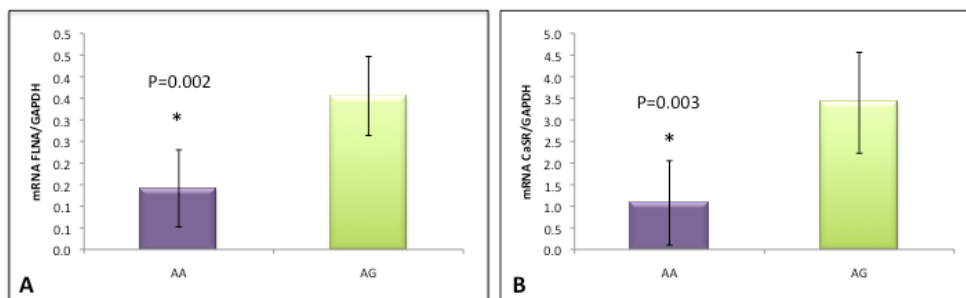


Figura 27: Correlazione dell'espressione di FLNA e CaSR con il polimorfismo R990G. I livelli di mRNA sono stati misurati mediante Real-Time PCR in 30 adenomi delle paratiroidi ($n=28$ AA; $n=2$ AG). I risultati sono stati normalizzati sui livelli di mRNA di GAPDH. (A) $AA=0.14\pm0.08$; $AG=3.35\pm0.09$; (B) $AA=1.07\pm0.97$; $AG=3.39\pm1.16$.

4.6 *Discussione*

Il calcium sensing receptor (CaSR) è il sensore delle variazioni della concentrazione di calcio extracellulare ($[Ca^{2+}]_o$), è espresso nei tessuti coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del calcio ed è implicato nella regolazione del metabolismo del calcio. Tale recettore avverte i cambiamenti extracellulari della concentrazione di calcio ed attiva differenti pathway intracellulari per normalizzare i livelli di calcio nel sangue (^{22,42}). In particolare l'attivazione del CaSR, attraverso specifiche G proteins (Gq), induce la mobilitazione del calcio dagli stores del reticolo endoplasmico attraverso l'aumento dell'IP3 e attiva la PKC, quest'ultima sembra essere coinvolta nel pattern di oscillazioni intracellulari di calcio (^{78,5}). Tuttavia, l'attivazione del recettore è in grado anche di attivare la cascata delle MAPK attraverso la fosforilazione delle chinasi p44/42 regolate da segnali extracellulari (ERK). Per l'attivazione della via delle MAPK indotta dal CaSR è necessaria l'interazione del recettore con la proteina scaffold Filamina A (FLNA), la quale interagisce con la porzione carbossi-terminale del CaSR a livello dei residui 907-997 (^{43,44}). Tale interazione stabilizza il CaSR e attenua la sua degradazione, facilitando il signaling delle MAPK (¹⁸⁵). Proprio nella regione di legame con la FLNA cade lo SNP non conservativo Arg990Gly (R990G) del gene CaSR. E' stato dimostrato che tale polimorfismo, localizzato nell'esone 7 del gene, è associato ad ipercalciuria idiopatica e causa un guadagno di funzione del recettore rendendolo più sensibile alle variazioni della $[Ca^{2+}]_o$ (¹⁸²). Inoltre è stato dimostrato che il recettore polimorfico mostra un aumento della sensibilità ai calciomimetici (R-568) ed un pattern di oscillazioni intracellulari di calcio differenti rispetto al recettore wild-type (WT), in particolare in presenza di inibitori di PKC (¹⁸³). Questi dati lasciano presupporre una differente propagazione del segnale nel CaSR R990G rispetto al CaSR WT.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di investigare l'interazione tra CaSR e FLNA e l'effetto di quest'interazione sul signaling delle MAPK, identificando un'eventuale differenza d'interazione con la FLNA e quindi di attivazione del pathway in presenza del polimorfismo R990G del gene CaSR. A tale scopo è stata silenziata la Filamina A in cellule HEK-293 trasfettate con il recettore wild type (CaSR-WT) o polimorfico (CaSR-R990G). E' stato valutato

l'effetto del silenziamento della FLNA sull'espressione proteica del CaSR, riscontrando sia una diminuzione dell'espressione proteica totale che di membrana del CaSR-WT e CaSR-R990 in assenza di FLNA; ciò conferma l'importanza della FLNA non solo nel proteggere il recettore dalla degradazione, ma anche di stabilizzarlo in membrana. Tuttavia in presenza di questa proteina l'espressione del recettore polimorfico risultava aumentata rispetto al WT, risultato che potrebbe spiegare il guadagno di funzione del CaSR R990G come conseguenza di una maggiore stabilità in membrana. Questi dati ottenuti con analisi di western blot sono stati confermati con esperimenti di immunofluorescenza su cellule HEK-293 esprimenti CaSR WT o CaSR-R990G e silenziate per la Filamina A. Infatti le immagini ottenute mostrano una riduzione dei livelli proteici del recettore wild type e polimorfico, anche se in misura minore per quest'ultimo. Risultati simili sono stati ottenuti misurando i livelli di mRNA del CaSR WT e polimorfico: in assenza di FLNA l'espressione di entrambi i tipi recettoriali risultava diminuita, ciò lascia presupporre che la FLNA oltre ad avere un ruolo nel recycling del recettore potrebbe avere un ruolo anche nella regolazione post-trascrizionale. Tale ipotesi è supportata da un lavoro presente in letteratura che afferma che in presenza di Filamina A il CaSR dimostra una marcata resistenza all'effetto inibitorio di un CaSR-antisense (¹⁸⁵).

Oltre a misurare i livelli di espressione del CaSR è stata valutata anche l'attività del recettore in assenza di FLNA, misurando i livelli di fosforilazione di Erk 1/2 indotti dal CaSR e ottenendo risultati concordanti: l'attività di p-Erk dopo stimolazione con 1, e con 3 mM di CaCl₂ risultava diminuita solo in cellule trasfettate con CaSR sia WT che polimorfico in assenza di FLNA; tale diminuzione risultava non statisticamente significatava a concentrazioni maggiori di CaCl₂ (5 mM), ciò può essere dovuto al fatto che a concentrazioni elevate di CaCl₂ l'interazione tra CaSR e FLNA è più forte. Quest'ipotesi è supportata dal lavoro di *Zang et al.*, in cui dimostrano che l'attivazione del CaSR stimolato con 5mM CaCl₂ facilita le interazioni ad alta affinità con Filamina A, mentre stimolando il recettore con 0.5 mM di CaCl₂ l'interazione risulterebbe più debole (¹⁸⁵). I dati ottenuti confermano l'importante ruolo della Filamina A nell'attivazione di ERK 1/2 indotta dal CaSR e la sua capacità di proteggere il recettore dalla degradazione, particolarmente in

presenza del polimorfismo R990G. Possiamo quindi ipotizzare che l'aumentata attività del recettore polimorfico possa essere dovuta al legame più forte con la Filamina A, che potrebbe proteggerlo maggiormente dalla degradazione rispetto al CaSR WT. La sostituzione di un aminoacido basico come l'arginina con uno neutro come la glicina nella struttura primaria della proteina, determina una ridistribuzione delle cariche elettriche nel dominio C-terminale del CaSR, in una zona vicina a quella implicata nel legame con le G-proteine (3° loop intracellulare) e con la Filamina-A (aa 907-997) ⁽⁴³⁾. Inoltre, la glicina, avendo una catena laterale meno ingombrante, permette una maggiore libertà di movimento e un angolo di rotazione dell' α -elica più stretto nella struttura secondaria della proteina ⁽¹⁸⁶⁾. È probabile quindi che questa sostituzione aminoacidica provochi un cambiamento conformazionale del dominio C-terminale della proteina, rafforzando il legame con la Filamina-A, la quale potrebbe stabilizzare la proteina in membrana proteggendola dalla normale degradazione.

Ciò ci porta a confermare l'ipotesi, da cui eravamo partiti, che il recettore polimorfico potrebbe esplicare la sua funzione attraverso un meccanismo PKC-indipendente ⁽¹⁸³⁾.

E' noto in letteratura che il recettore polimorfico mostra un aumento della sensibilità ai calciomimetici ⁽¹⁸³⁾, per cui è stato valutato se l'assenza di FLNA potesse influire sulla risposta dei due tipi recettoriali all'R-568. Il calciomimetico R-568 è un modulatore allosterico positivo del CaSR ad azione stereoselettiva, infatti solo la forma R è attiva. La sua azione consiste nell'aumentare l'affinità del recettore verso il calcio extracellulare (riduce la EC_{50} per il calcio) e non è in grado di attivare il CaSR in assenza di calcio ⁽¹⁶²⁾. La stimolazione con calciomimetico R-568 0.01 μ M e 3mM $CaCl_2$ confermava la differenza di attivazione tra recettore WT e polimorfico in presenza di FLNA: il CaSR-R990G conservava il suo guadagno di funzione, confermando un dato già precedentemente pubblicato ⁽¹⁸³⁾. Maggiori concentrazioni di calciomimetico probabilmente saturano il recettore, annullando la risposta. Tuttavia la differenza di attivazione di ERK 1/2 in cellule silenziate e non silenziate per FLNA non era apprezzabile, l'eccessiva stimolazione del recettore non rende visibile le differenze di attivazione nelle varie condizioni sperimentali. Inoltre è stato dimostrato che il calciomimetico R-568 sia in grado di aumentare

l'espressione dell' mRNA del CaSR. Questo potrebbe spiegare la mancata diminuzione dell'attività di p-ERK anche silenziando la FLNA (¹⁸⁷). Saranno comunque necessari ulteriori studi per valutare l'effetto dell'R-568 nelle varie condizioni sperimentali.

Sulla base dei risultati ottenuti in un sistema cellulare semplice (HEK-293), siamo quindi andati ad investigare l'interazione della FLNA e del CaSR in cellule e tessuti tumorali paratiroidei. Dati presenti in letteratura mostrano che l'attività di ERK 1/2 mediata dal CaSR si riduce in adenomi della paratiroide rispetto a cellule isolate da tessuto normale della paratiroide (¹⁸⁴). Pertanto il CaSR risulta essere down regolato nei tumori della paratiroide. E' stato inoltre dimostrato che la Filamina A è coinvolta nell'inibizione da parte del CaSR della secrezione di PTH dalle cellule paratiroidee umane (⁴⁴). Inoltre molto interessanti sono i dati mostrati da Rothe *et al.* (¹⁷⁰) in uno studio clinico su pazienti con 2°HPT, che sono risultati più sensibili al trattamento farmacologico con calciomimetici se portatori della variante allelica 990Gly. Sembra quindi che la presenza del polimorfismo Arg990Gly al C-terminale del CaSR, oltre che determinare un aumento della sensibilità verso il calcio extracellulare, sia in grado di aumentare la sensibilità del recettore anche ad agenti farmacologici come i calciomimetici. Esiste quindi la possibilità di attuare un trattamento farmacologico specifico in base al genotipo dei pazienti.

Sulla base di queste conoscenze siamo andati ad investigare il rapporto tra CaSR e FLNA in tessuti di adenoma e carcinoma della paratiroide. I dati di immunoistochimica e immunofluorescenza mostrano che la Filamina A è down regolata nei tumori della paratiroide. In particolare, l'espressione della FLNA diminuisce all'aumentare del grado di malignità tumorale. Inoltre i dati di correlazione dei livelli di mRNA della FLNA e del CaSR con il genotipo del polimorfismo R990G hanno mostrato un significativo aumento sia dell'espressione della FLNA che del CaSR in presenza del genotipo eterozigote (AG) rispetto al genotipo omozigote per l'allele più frequente (AA), confermando ancora una volta l'importanza del rapporto tra le due proteine nei tumori delle paratiroidi. Questi dati sono in linea con dati già presenti in letteratura in cui si osserva che i pazienti affetti da iperparatiroidismo primario portatori dell'allele di rischio dello SNP R990G mostrano livelli sierici di PTH più bassi rispetto ai pazienti portatori del genotipo più

frequente (¹⁷⁸). I risultati della correlazione tra i livelli di mRNA della FLNA e del CaSR con il genotipo in adenomi paratiroidei ci permettono di ipotizzare la presenza di microRNA che potrebbero inibire l'espressione del CaSR o della Filamina A. In particolare, dati presenti in letteratura dimostrano che i livelli di espressione di 2 microRNA (miRNA), miR-503 e miR-296, risultano alterati nei tumori delle paratiroidei rispetto alle paratiroidei normali (¹⁸⁸). Algoritmi computerizzati (TargetScan e Miranda) identificano la Filamina A come potenziale gene target dei miR-296-5p e miR-503, che sono stati trovati down-regolati e over-espresi, rispettivamente nei tumori paratiroidei rispetto al tessuto normale paratiroideo. Potremmo, quindi, ipotizzare un ruolo del CaSR nella regolazione dell'espressione dei 2 miRNA, che possano dimostrare la correlazione positiva dei livelli di mRNA della FLNA e del CaSR. Quest'ipotesi è supportata da risultati recentemente pubblicati dove hanno già dimostrato che il CaSR è in grado di inibire 2 miRNA, miR-9 e miR374, proteggendo la Claudina-14 dall'inibizione da parte dei 2 microRNA.

5. CONCLUSIONE

Questo studio ci ha permesso di dimostrare che la Filamina A è necessaria per l'attivazione del pathway di ERK1/2 attivato sia dal CaSR WT che polimorfico. Per cui possiamo affermare che il guadagno di funzione del CaSR R990G potrebbe essere dovuto all'interazione più stabile con la FLNA indotta dal polimorfismo non conservativo nella regione di legame. Inoltre possiamo concludere che l'interazione tra CaSR e FLNA è fondamentale anche nei tumori paratiroidi, in cui abbiamo dimostrato una correlazione positiva dell'espressione delle due proteine, entrambe down-regolate nei tumori. La correlazione dell'espressione dell'mRNA di FLNA e CaSR con il polimorfismo R990G ha mostrato un aumento dei livelli di espressione di entrambe le proteine in presenza della variante polimorfica, lasciandoci ipotizzare un ruolo protettivo nei tumori delle paratiroidi, con un meccanismo ancora sconosciuto.

Sviluppi futuri

Saranno necessari studi di co-immunoprecipitazione per confermare l'aumento della forza di legame tra la FLNA e il CaSR R990G. Inoltre sarà necessario studiare il ruolo dei miR-503 e miR-296 sulla modulazione dell'espressione genica della FLNA e l'eventuale coinvolgimento del CaSR nell'asse miRNA-FLNA, al fine di verificare l'ipotesi che un aumento dell'espressione della Filamina A in cellule tumorali paratiroidi possa aumentare l'espressione del CaSR, inibire la sua degradazione e la concentrazione di calcio extracellulare, tutti processi fondamentali per inibire la produzione di paratormone nei tumori.

6. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Brown EM. "Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and others ions as extracellular (first) messengers". *Physiol Rev*, 71:371-411, 1991.
- ² Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butter R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. "Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid". *Nature*, 366: 575-580, 1993.
- ³ Garret JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BCP, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F. "Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs". *J Biol Chem*, 270 (21):12919-12925, 1995.
- ⁴ Aida K, Koishi S, Tawata M, Onaya T. "Molecular cloning of a putative Ca²⁺-sensing receptor cDNA from human kidney". *Bioch Bioph Res Commun*, 214 (2): 524-529, 1995.
- ⁵ Hofer AM, Brown EM. "Extracellular calcium sensing and signaling". *Nature Rev Mol Cell Biol*, 4:530-538, 2003.
- ⁶ Quinn SJ, Kifor O, Trivedi S, Diaz R, Vassilev P, Brown EM. "Sodium and ionic strength sensing by the calcium receptor". *J Biol Chem*, 273 (31): 19579-19586, 1998.
- ⁷ Brown EM, MacLeod RJ. "Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling". *Physiol Rev*, 81 (1): 239-297, 2001.
- ⁸ Bai M. "Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor". *Cell Calcium*, 35: 197-207, 2004.
- ⁹ Chou YH, Brown EM, Levi T, Crowe G, Atkinson AB, Arnqvist HJ, Toss G, Fuleihan GE, Seidman CE. "The gene responsible for familial hypocalciuric hypercalcemia maps to chromosome 3q in four unrelated families". *Nat Genet* 1:295-300, 1992.
- ¹⁰ Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Riviere M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN. "Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CaSR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescent in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16". *Mamm Genome* 6: 798-801, 1995.
- ¹¹ Pearce SHS, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, Heath DA, Hughes IA, Paterson CR, Whyte MP, Thakker RV. "Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism". *J Clin Invest*, 96: 2683-2692, 1995.
- ¹² Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obara T, Matsumoto T, Fujita T. "Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas". *J Biol Chem*, 275 (11): 7553-7557, 2000.

-
- ¹³ Canaff L, Hendy GN. "Human calcium-sensing receptor gene". *J Biol Chem*, 277 (33): 30337-30350, 2002.
- ¹⁴ Canaff L, Hendy GN. "Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1b". *J Biol Chem*, 280 (14): 14177-14188, 2005.
- ¹⁵ Bradbury RA, Sunn KL, Crosslet M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, Conigrave AD. "Expression of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta". *J Endocrinol*, 156: 425-430, 1998.
- ¹⁶ D'Souza-Li L, Canaff L, Janicic N, Cole DEC, Hendy GN. "An acceptor splice site mutation in calcium-sensing receptor (CaSR) gene in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". *Hum Mut*, 18: 411-421, 2001.
- ¹⁷ Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD. "The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratocyte differentiation". *J Biol Chem*, 273: 23344-23352, 1998.
- ¹⁸ Goldsmith PK, Fan GF, Ray K, Shiloach J, McPhie P, Rogers KV, Spiegel AM. "Expression, purification and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium sensing receptor". *J Biol Chem*, 274 (16):11303-11309, 1999.
- ¹⁹ Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor". *J Biol Chem*, 271: 19537-19545, 1996.
- ²⁰ Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM. "Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction". *J Biol Chem*, 273: 34558-34567, 1998.
- ²¹ Fan GF, Goldsmith PK, Collins R, Dunn CK, Krapcho KJ, Rogers KV, Spiegel AM. "N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface". *Endocrin*, 138: 1916-1922, 1997.
- ²² Huang C, Miller RT. "The calcium-sensing receptor and its interacting proteins". *J Cell Mol Med*, 11 (5): 923-934, 2007.
- ²³ Pidasheva S, Grant M, Canaff L, Ercan O, Kumar U, Hendy GN. "Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CaSR mutants retained intracellularly". *Hum Mol Gen*, 15 (14): 2200-2209, 2006.

-
- ²⁴ Ray K, Hauschild BC, Steinbach PJ, Goldsmith PK, Hauache O, Spiegel AM. "Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor critical for dimerization". *J Biol Chem*, 274: 27642-27650, 1999.
- ²⁵ Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. "The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions". *J Biol Chem*, 276: 5316-5322, 2001.
- ²⁶ Jiang Y, Minet E, Zhang Z, Silver PA, Bai M. "Modulation of interpromoter relationship is important for activation of dimeric calcium-sensing receptor". *J Biol Chem*, 279 (14): 14147-14156, 2004.
- ²⁷ O'Hara PJ, Sheppard PO, Thorgersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER. "The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins". *Neuron*, 11: 41-52, 1993.
- ²⁸ Conklyn BR, Bourne HR. "The marriage of flytrap and the serpent". *Nature*, 367: 22, 1994.
- ²⁹ Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PT, Spiegel AM. "Human Ca²⁺ receptor extracellular domain". *J Biol Chem*, 276 (34): 32145-32151, 2001.
- ³⁰ Brauner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard P, O'Hara P, Krogsgaard-Larsen P. "The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain" *J Biol Chem*, 274: 18382-18386, 1999.
- ³¹ Ray K, Northup J. "Evidence for distinct cation and calcimimetic compound (NPS 568) recognition domains in the transmembrane regions of the human Ca²⁺ receptor". *J Biol Chem*, 277: 18908-18913, 2002.
- ³² Hu J, Reyes-cruz G, Chen W, Jacobson KA, Spiegel AM. "Identification of the acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺ receptor critical for response to Ca²⁺ and positive allosteric modulator". *J Biol Chem*, 277: 46622-46631, 2002.
- ³³ Miedlich S, Gama L, Seuwen K, Wolf RM, Breitwieser GE. "Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site". *J Biol Chem*, 279 (8): 7254-7263, 2004.
- ³⁴ Hu J, McLarnon SJ, Mora S, Jiang J, Thomas C, Jacobson KA, Spiegel AM. "A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺-receptor critical for response to Ca²⁺". *J Biol Chem*, 280 (6): 5113-5120, 2005.
- ³⁵ Chang W, Chen TH, Pratt S, Shoback D. "Amino acids in the second and third intracellular loop of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C". *J Biol Chem*, 275: 19955-19963, 2000.

-
- ³⁶ Wess J. "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity". *Pharmacol Ther*, 80: 231-264, 1998.
- ³⁷ Bai M, Trivedi S, Brown EM. "Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK-293 cells". *J Biol Chem*, 273: 23605-23610, 1998.
- ³⁸ Bai M, Janicic N, Trivedi S, Quinn S, Cole DEC, Brown EM, Hendy GN. "Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". *J Clin Invest*, 99: 1917-1925, 1997.
- ³⁹ Ray K, Fan GF, Goldsmith PK, Spiegel AM. "The carboxyl terminus of the human calcium receptor. Requirement for cell-surface expression and signal transduction". *J Biol Chem*, 272: 31355-31361, 1997.
- ⁴⁰ Bai M, Trivedi S, Lance CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown ER. "Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca²⁺_o-sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca²⁺ store release". *J Biol Chem*, 273 (33): 21267-21275, 1998.
- ⁴¹ Jiang YF, Zhang Z, Kifor O, Lance CR, Quinn SJ, Bai M. "Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca²⁺_o-sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with CaR cytoplasmic tail". *J Biol Chem*, 277: 50543-50549, 2002.
- ⁴² Ward DT. "Calcium receptor-mediated intracellular signaling". *Cell Calcium*, 35: 217-228, 2004.
- ⁴³ Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. "Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein". *J Biol Chem*, 276: 34871-34879, 2001.
- ⁴⁴ Hjalml G, MacLeod RJ, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. "Filamin-A binds carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interactions that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase". *J Biol Chem*, 276: 34880-34887, 2001.
- ⁴⁵ Chang W, Shoback D. "Extracellular Ca²⁺-sensing receptors-an overview". *Cell Calcium*, 35: 183-196, 2004.
- ⁴⁶ Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K. "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor". *Nature*, 407: 971-977, 2000
- ⁴⁷ Levine BA, Williams RJP. "The chemistry of calcium and its biological relevance". LJ Anghileri, AM Tuffet-Anghileri Eds, *The role of calcium in biological system*, vol I, CRC Press, Inc, Boca Raton, 4-26, 1982.

-
- ⁴⁸ Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. "Cooperative multi-modal sensing and therapeutic implications of the extracellular Ca(2+) sensing receptor". *Trends Pharmacol Sci*, 21: 401-407, 2000.
- ⁴⁹ Quinn SJ, Ye CP, Diaz R, Kifor O, Bai M, Vassilev P, Brown EM. "The Ca²⁺-sensing receptor: a target for polyamines". *Am J Physiol*, 273: C1315-C1323, 1997.
- ⁵⁰ Handlogten ME, Shiraishi N, Awata H, Huang C, Miller RT. "Extracellular Ca²⁺-sensing receptor is a promiscuous divalent cation sensor that responds to lead". *Am J Physiol Renal Physiol*, 279: F1083-F1091, 2000.
- ⁵¹ Brown EM, Katz C, Butters R, Kifor O. "Polyarginine, polylysine, and protamine mimic the effects of high extracellular calcium concentrations on dispersed bovine parathyroid cells". *J Bone Miner Res*, 1217-1225, 1991.
- ⁵² Brown EM, Butters R, Katz C, Kifor O. "Neomycin mimics the effects of high extracellular calcium concentrations on parathyroid function on dispersed bovine parathyroid cells". *Endocrinology*, 128: 3047-3054, 1991.
- ⁵³ Katz C, Butters R, Chen C, Brown EM. "Structure-function relationships for the effects of various aminoglycoside antibiotics on dispersed bovine parathyroid cells". *Endocrinology*, 131: 903-910, 1992.
- ⁵⁴ Ward DT, McLarnon SJ, Riccardi D. "Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor". *J Am Soc Nephrol*, 13: 1481-1489, 2002.
- ⁵⁵ Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. "L-amino acid sensing by the extracellular Ca²⁺-sensing receptor". *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 4814-4819, 2000.
- ⁵⁶ Steven CH. "Therapeutic use of calcimimetics". *Annu Rev Med*, 57: 349-364, 2006.
- ⁵⁷ Petrel C, Kessler A, Dauban P, Dodd RH, Rognan D, Ruat M. "Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain". *J Biol Chem*, 279 (18): 18990-18997, 2004.
- ⁵⁸ Nearing J, Betka M, Quinn S, Hentschel H, Elger M, Baum M, Bai M, Chattopadhyay N, Brown EM, Hebert SC, Harris HW. "Polyvalent cation receptor proteins (CaRs) are salinity sensors in fish". *Proc Natl Acad Sci*, 99: 9231-9236, 2002.
- ⁵⁹ Quinn SJ, Bai M, Brown EM. "pH sensing by the calcium-sensing receptor". *J Biol Chem*, 279: 37241-37249, 2004.
- ⁶⁰ Ye C, Rogers K, Bai M, Quinn SJ, Brown EM, Vassilev PM. "Agonists of the Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activate nonselective cation channels in HEK293

cells stably transfected with the human CaR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 572-579, 1996.

⁶¹ Kifor O, Diaz R, Butters R, Brown EM. "The Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A₂, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells". *J Bone Min Res*, 12 (5): 715-725, 1997.

⁶² Hofer AM, Landolfi B, Debellis L, Pozzan T, Curci S. "Free [Ca²⁺] dynamics measured in agonist-sensitive stores of single living intact cells: a new look at the refilling process". *EMBO J*, 17: 1986-1995, 1998.

⁶³ Belan P, Gerasimenko O, Petersen OH, Tepikin AV. "Distribution of Ca²⁺ extrusion sites on the mouse pancreatic acinar cell surface". *Cell Calcium*, 22: 5-10, 1997.

⁶⁴ Hofer AM, Curci S, Doble MA, Brown EM, Soybel DI. "Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor". *Nature Cell Biol*, 2: 392-398, 2000.

⁶⁵ Thoma AP. "Sharing calcium opens new avenues of signalling". *Nature Cell Biol*, 2: E126-E127, 2000.

⁶⁶ De Luisi A, Hofer AM. "Evidence that Ca²⁺ cycling by the plasma membrane Ca²⁺-ATPase increases the 'excitability' of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor". *J Cell Sci*, 116: 1527-1538, 2003.

⁶⁷ Huang C, Handlogten ME, Miller RT. "Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by extracellular calcium-sensing receptor". *J Biol Chem*, 277: 20293-20300, 2002.

⁶⁸ Handlogten ME, Huang C, Shiraishi N, Awata H, Miller RT. "The Ca²⁺-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a G_qα-dependent ERK-independent pathway". *J Biol Chem*, 276: 13941-13948, 2001.

⁶⁹ Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. "Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells". *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F291-F302, 2001.

⁷⁰ De Jesus Ferreira MC, Héliès-Toussaint C, Imbert-Teboul M, Bailly C, Verbavatz JM, Bellanger AC, Chabardès D. "Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca²⁺". *J Biol Chem*, 273 (24): 15192-15202, 1998.

⁷¹ Crespo P, Xu N, Simonds W, Gutkind J. "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits". *Nature*, 369: 418-420, 1994.

-
- ⁷² Koch W, Hawes B, Allen L, Lefkowitz R. "Direct evidence that G_i-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G-beta and G-gamma activation of p21 Ras". *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12706-12710, 1994.
- ⁷³ Gutkin JS. "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascade". *J Biol Chem* 273: 1839-1842, 1998.
- ⁷⁴ Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. "The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 538-541, 2000.
- ⁷⁵ MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Brown EM. "PTHrP stimulated by the calcium sensing receptor requires MAP kinase activation". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: E435-E442, 2003.
- ⁷⁶ Stahlhut M, van Deurs B. "Identification of Filamin as a novel ligand for Caveolin-1 : evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton". *Mol Biol Cell*, 11: 325-337, 2000.
- ⁷⁷ Huang C, Wu Z, Hujer KM, Miller RT. "Silencing of filamin A gene expression inhibits Ca²⁺-sensing receptor signaling". *FEBS Lett*, 580 (7): 1795-800, 2006.
- ⁷⁸ Breitwieser GE, Gama L. "Calcium-sensing receptor activation induces intracellular calcium oscillations". *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1412-C1421, 2001.
- ⁷⁹ Soderling TR, Chang B, Brickey D. "Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II". *J Biol Chem*, 276: 3719-3722.
- ⁸⁰ Oancea E, Meyer T. "Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals". *Cell*, 95: 307-318.
- ⁸¹ Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. "Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria". *Cell*, 82 (3): 415-424.
- ⁸² Li WH, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY. "Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression". *Nature*, 392: 936-941, 1998.
- ⁸³ Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression". *Nature*, 392: 933-936, 1998.
- ⁸⁴ Hu Q, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. "[Ca²⁺]_i oscillation frequency regulates agonist-stimulated NF-kappaB transcriptional activity". *J Biol Chem*, 274: 33995-33998.

-
- ⁸⁵ Uhlén P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A, Richter-Dahlfors A. "Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells". *Nature*, 405: 694-697.
- ⁸⁶ Young SH, Wu SV, Rozengurt E. " Ca^{2+} -stimulated Ca^{2+} oscillations produced by the Ca^{2+} -sensing receptor require Negative feedback by protein kinase C". *J Biol Chem*, 277 (49): 46871-46876, 2002.
- ⁸⁷ Miedlich S, Gama L, Breitwieser GE. "Calcium sensing receptor activation by a calcimimetic suggests a link between cooperativity and intracellular calcium oscillations". *J Biol Chem*, 277 (51): 49691-49699, 2002.
- ⁸⁸ Young SH, Rozengurt E. "Amino acids and Ca^{2+} stimulate different patterns of Ca^{2+} oscillations through the Ca^{2+} -sensing receptor". *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: C1414-C1422, 2002.
- ⁸⁹ Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E. "Amino acid-stimulated Ca^{2+} oscillations produced by the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G_{12} , Rho, Filamin-A, and the actin cytoskeleton". *J Biol Chem*, 280 (24): 22875-22882, 2005.
- ⁹⁰ Bosel J, John M, Freichel M, Blind E. "Signaling of the human calcium-sensing receptor expressed in HEK-293-cells is modulated by protein kinases A and C". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 111: 21-26, 2003.
- ⁹¹ Davies SJ, Ozawa A, McCormick WD, Dvorak MM, Ward DT. "Protein kinase c-mediated phosphorylation of the calcium sensing receptor is stimulated by receptor activation and attenuated by calyculin-sensitive phosphatase activity". *J Biol Chem*, 282 (20): 15048-15056, 2007.
- ⁹² Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. "G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells". *J Biol Chem*, 272: 10188-10195, 1997.
- ⁹³ Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM. "Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and different tissue distribution of two splice variants". *Endocrinology*, 139: 2784-2795, 1998.
- ⁹⁴ Sallese S, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knopfel T, De Blasi A. "The G protein-coupled receptore kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1". *FASEB J*, 14: 2569-2580, 2000.

-
- ⁹⁵ Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. "G protein-coupled receptor kinases". *Annu Rev Biochem*, 67: 653-692.
- ⁹⁶ Kohout TA, Lefkowitz RJ. "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization". *Mol Pharmacol*, 63: 9-18, 2003.
- ⁹⁷ Reiter E, Lefkowitz RJ. "GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling". *Trends Endocrinol Metab*, 17: 159-165, 2006.
- ⁹⁸ Shenoy SK, Lefkowitz RJ. "Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling". *J Biochem*, 375: 503-515, 2003.
- ⁹⁹ Pi M, Oakley RH, Gesty-Palmer D, Cruickshank RD, Spurney RF, Luttrell LM, Quarles LD. " β -arrestin- and G protein receptor kinase- mediated calcium-sensing receptor desensitization". *Mol Endocrinol*, 19 (4): 1078-1087, 2005.
- ¹⁰⁰ Lorenz S, Frenzel R, Paschke R, Breitwieser GE, Miedlich SU. "Functional desensitization of the extracellular calcium-sensing receptor is regulated via distinct mechanisms: role of G protein-coupled receptor kinases, protein kinase C and β -arrestins". *Endocrinol*, 148 (5): 2398-2404, 2007.
- ¹⁰¹ Reyes-Ibarra AP, Garcia-Regalado A, Ramirez-rangel I, Esparza-Silva AL, Valadez-Sanchez M, Vazquez-Prado J, Reyes-Cruz G. "Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via Rab 11^o-dependent and AMSH-sensitive mechanism". *Mol Endocrinol*, 21 (6): 1394-1407, 2007.
- ¹⁰² Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. "Mechanisms of secondary hyperparathyroidism". *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F367-F376, 2002.
- ¹⁰³ Riccardi D, Gamba G. "The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease". *Arch Med Res*, 30: 436-448, 1999.
- ¹⁰⁴ Goodman WG, Veldhuis JD, Berlin TR, Van Herle AJ, Juppner H, Salusky IB. "Calcium-sensing by parathyroid glands in secondary hyperparathyroidism". *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2765-2772, 1998.
- ¹⁰⁵ Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, Gagel RF, Brown EM. "Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an an extracellular calcium receptor gene". *Endocrinol*, 136: 5202-5211, 1995.
- ¹⁰⁶ Freichel M, Zink-lorenz A, Holloschi A, Hafner M, Flockerzi V, Raue F. "Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion". *Endocrinol*, 137: 3842-3848, 1996.

-
- ¹⁰⁷ McGehee DS, Aldersberg M, Liu KP, Hsuing S, Heath MJ, Tamir H. "Mechanism of extracellular Ca^{2+} receptor-stimulated hormone release from sheep thyroid parafollicular cells". *J Physiol*, 502: 31-44, 1997.
- ¹⁰⁸ Ward DT, Riccardi D. "Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor". *Eur J Physiol*, 445: 169-176, 2002.
- ¹⁰⁹ Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Herbert SC. Localization of the extracellular Ca^{2+} /polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F611-F622, 1998.
- ¹¹⁰ Ba J, Brown D, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport. *Am J Physiol Ren Physiol* 2003, 285:F1233-F1243.
- ¹¹¹ Maiti A, Beckman MJ. Extracellular Calcium is a direct effector of VDR levels in proximal tubule epithelial cells that counter-balances effects of PTH on renal vitamin D metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:504-508.
- ¹¹² Wang WH, Lu M, Herbert SC. Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca^{2+} -induced inhibition of apical K^+ channels in the TAL. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271:C103-C111.
- ¹¹³ Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 1999, 285: 103-106.
- ¹¹⁴ Ikari A Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:283-290.
- ¹¹⁵ Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N, Zhang J, Renigunta A, Bleich M, Hou J. Claudin-14 regulates renal Ca^{++} transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J*. 2012; 31(8):1999-2012.
- ¹¹⁶ Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 15-26.
- ¹¹⁷ Ward DT, Riccardi D. Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Eur J Physiol* 2002;445:169-76.
- ¹¹⁸ Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, Kamel S, Terwillinger EF, Brazier M, Brown EM. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J* 2006; 20: 2562-2564.

-
- ¹¹⁹ Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt S, et al. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 1999;140(12):5883-93.
- ¹²⁰ Pi M, Quarles LD. Osteoblast calcium-sensing receptor has characteristics of ANF/7TM receptors. *J Cell Biochem* 2005;95:1081-92.
- ¹²¹ Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, et al. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 280:40201-40209, 2005.
- ¹²² Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. "Ca²⁺-sensing receptors in intestinal epithelium". *Am J Physiol Cell Physiol*, 273: 1168-1175, 1997.
- ¹²³ Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, Hebert SC, Soybel DI, Brown EM. "Identification and localization of extracellular Ca²⁺-sensing receptor in rat intestine". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274: G122-G130, 1998.
- ¹²⁴ Kirchhoff P, Geibel JP. "Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology". *World J Gastroenterol*, 12 (20): 3229-3236, 2006.
- ¹²⁵ Tfelt-Hansen J, Brown EM. "The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review". *Crit Rev Clin Lab Sci*, 42 (1): 35-70, 2005.
- ¹²⁶ Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. "Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals". *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 3161-3165, 1995.
- ¹²⁷ Chattopadhyay N, Ye C, Singh DP, Kifor O, Vassilev PM, Shinohara T, Chylack LT, Brown EM. "Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens epithelium cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 233: 801-805, 1997.
- ¹²⁸ House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Leboff MS, Glowacki J, Brown EM. "Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells". *J Bone Miner Res*, 12 (12): 1959-1970, 1997.
- ¹²⁹ Brown EM. "The extracellular Ca²⁺-sensing receptor central mediator of systemic calcium homeostasis". *Ann Rev Nutr*, 20: 507-533, 2000.
- ¹³⁰ Tordoff MG. "Voluntary intake of calcium and other minerals by rats". *Am J Physiol*, 167: R470-R475, 1994.
- ¹³¹ Pollak MR, Brown EM, Chou YHW, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. "Mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". *Cell*, 75: 1297-1303, 1993.

-
- ¹³² Pearce SHS, Bai M, Quinn SJ, Kifor O, Brown EM, Thakker RV. "Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells". *J Clin Invest*, 98 (8): 1860-1866, 1996.
- ¹³³ Bai M, Quinn SJ, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in human Ca^{2+} -sensing receptor". *J Biol Chem*, 271 (32): 19537-19545, 1996.
- ¹³⁴ Heath H III, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NRM, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garrett JE, Leppert MF. "Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains". *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (4): 1312-1317, 1996.
- ¹³⁵ Pollak MR, Seidman CE, Brown EM. "Three inherited disorders of calcium sensing". *Medicine*, 75 (3): 115-123, 1996.
- ¹³⁶ Thakker RV. "Disorders of the calcium-sensing receptor". *Biochim Biophys Acta*, 1448: 166-170, 1998.
- ¹³⁷ Li Y, Song YH, Rais N, Connor E, Schatz D, Muir A, Maclaren N. "Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism". *J Clin Invest*, 97: 910-914, 1996.
- ¹³⁸ Kifor O, McElduff A, LeBoff MS, FD Jr, Butters R, Gao P, Cantor TL, Kifor I, Brown EM. "Activating autoantibodies to the calcium-sensing receptor in two patients with autoimmune hypoparathyroidism". *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 548-556, 2004.
- ¹³⁹ Kifor O, Moore FD Jr, Delaney M, Garber J, Hendy GN, Butters R, Gao P, Cantor TL, Kifor I, Brown EM, Wysolmerski J. "A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor". *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 60-72, 2003.
- ¹⁴⁰ Hosokawa Y, Pollak MR, Brown ER, Arnold A. Mutational analysis of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(11):3107-10.
- ¹⁴¹ Cetani F, Pinchera A, Pardi E, Cianferrotti L, Vignali E, Picone A, et al. No evidence for mutations in the calcium-sensing receptor gene in sporadic parathyroid adenomas. *J Bone Miner Res*. 1999;14(6):878-82.
- ¹⁴² Miedlich S, Krohn K, Paschke R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):539-54.

-
- ¹⁴³ Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, et al. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(2):F291-302.
- ¹⁴⁴ Kallay E, Bajna E, Wrba Fm Kriwanek S, Peterlik M, Cross HS. "Dietary calcium and growth modulation of human colon cancer cells: role of the extracellular calcium-sensing receptor". *Cancer Detect Prev*, 24: 127-136, 2000.
- ¹⁴⁵ Kallay E, Bonner E, Thakker RV, Peterlik M, Cross HS. "Molecular and functional characterization of the extracellular calcium-sensing receptor in human colon cancer cells". *Oncol Res*, 13: 551-559, 2003.
- ¹⁴⁶ Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. "Extracellular calcium-sensing receptor (CaR) expression and its potential role in parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) secretion in the H-500 rat Leydig cell model of humoral hypercalcemia of malignancy". *Biochem Biophys Res Commun*, 269: 427-432, 2000.
- ¹⁴⁷ Chattopadhyay N. "Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290: 761-770, 2006.
- ¹⁴⁸ Yoshida O, Terai A, Ohkawa T, Okada Y. "National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1955". *Kidney Int*, 56: 1899-1904, 1999.
- ¹⁴⁹ Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM Jr, Curhan GC. "Time trend in reported prevalence of kidney stones in the United States". *Kidney Int*, 63: 1817-1823, 2003.
- ¹⁵⁰ Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. "A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones". *N Engl J Med*, 328: 833-838, 1993.
- ¹⁵¹ Loredó-Ostí JC, Roslin NM, Tessier J, Fujiwara TM, Morgan K, Bonnardeaux A. "Segregation of urine calcium excretion in families ascertained for nephrolithiasis: evidence for a major gene". *Kidney Int*, 68: 966-971, 2005.
- ¹⁵² Lenko J, Wochna Z, Hubner H. "Cytogenetic studies in familial nephrolithiasis". *Pol Med Sci Hist Bull*, 12 (2): 71-74, 1969.
- ¹⁵³ Lory junghall S. "Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects." *Br J Urol*, 51: 249-252, 1979.
- ¹⁵⁴ Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO. "Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi". *N Engl J Med*, 278: 1313-1318, 1968.
- ¹⁵⁵ Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, Coppi F, Pisani E. "Familial aggregation of renal calcium stone disease". *J Urol*, 138: 478-481, 1988.

-
- ¹⁵⁶ Indridanson OS, Birgisson S, Edvardsson VO, Sigvaldason H, Sigfusson N, Pallson R. "Epidemiology of kidney stones in Iceland: a population-based study". *Scand J Urol Nephrol*, 40 (3): 215-220, 2006.
- ¹⁵⁷ Robertson WG and Morgan DB. "The distribution of urinary calcium excretion in normal persons and stone-formers". *Clin Chim Acta*, 37: 503-508, 1972.
- ¹⁵⁸ Levy FL, Adams-Huet B, Pak CY. "Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol". *Am J Med*, 98: 50-59, 1995.
- ¹⁵⁹ Pak CY. "Kidney stones". *Lancet*, 351: 1797-1801, 1998.
- ¹⁶⁰ Quereda C, Orte L, Sabater J, Navarro-Antolin J, Villafruela J, Ortuno J. "Urinary calcium excretion in treated and untreated essential hypertension". *J Am Soc Nephrol*, 7: 1058-1065, 1996.
- ¹⁶¹ Giannini S, Nobile M, Delle Carbonare L, Lodetti MG, Selle S, Vittadello G, Minicucci N, Crepaldi G. "Hypercalciuria is a common and important finding in postmenopausal women with osteoporosis". *Eur J Endocrinol*, 149: 209-213, 2003.
- ¹⁶² Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BCP, Van Wagenen BC, DeMar EG, Balandrin MF. "Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor". *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4040-4045, 1998.
- ¹⁶³ Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, Colloton M, Karbon W, Scherrer J, Shatzen E, Rishton G, Scully S, Qi M, Harris R, Lacey D, Martin D. "Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl". *Pharmacol Exp Ther*, 308: 627-635, 2004.
- ¹⁶⁴ Nemeth EF. "Calcimimetic and calcilytic drugs: just for parathyroid cells?". *Cell Calcium*. 35: 283-289, 2004.
- ¹⁶⁵ Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, Rodriguez M. "The effect of calcitriol, paracalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats". *Kidney Int*, 73: 300-307, 2008.
- ¹⁶⁶ Hebert SC. "Therapeutic use of calcimimetics". *Annu Rev Med*, 57: 349-364, 2006.
- ¹⁶⁷ Nemeth EF, DeMar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conlin RL, Gowen M, Gleason JG, Bhatnagar PK, Fox J. "Calcilytic compounds: potent and selective Ca receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone". *J Pharm Exp Ther*, 299: 323-331, 2001.
- ¹⁶⁸ Nemeth EF. "The search for calcium receptor antagonists (calcilytics)". *J Mol Endocrinol*, 29: 15-21, 2002

-
- ¹⁶⁹ Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, et al "Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats". *J Clin Invest*, 105: 1595-1604, 2000.
- ¹⁷⁰ Rothe HM, Shapiro WB, Sun WY, Chou SY. "Calcium-sensing receptor gene polymorphism Arg990Gly and its possible effect on response to cinacalcet HCl." *Pharmacogen and Genomics*, 15: 29-34, 2005.
- ¹⁷¹ Rubin LA, Peltekova V, Janicic N, Liew CC, Hwang D, Evrovski J, Hendy GN, Cole DEC. "Calcium sensing receptor gene: analysis of polymorphism frequency". *Scand J Clin Invest*, 57 (suppl 227): 122-125, 1997.
- ¹⁷² Cole DEC, Vieth R, Trang HM, Wong BYL, Hendy GN, Rubin LA. "Association between total serum calcium and A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene". *Mol Genet Metab*, 72: 168-174, 2001.
- ¹⁷³ Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S, Muscarella LA, Battista C, D'Agruma L, Bertoldo F, Florio C, Minisola S, Hendy GN, Cole DEC. "Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor". *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (11): 5634-5638, 2004.
- ¹⁷⁴ Miedlich S, Lamesch P, Mueller A, Paschke R. "Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism". *Eur J Endocrinol*, 145: 421-427, 2001.
- ¹⁷⁵ Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, De Geronimo S, Muscarella LA, Chiodini I, Cignarelli M, Minisola S, Bertoldo F, Francucci CM, Malavolta N, Piovesan A, Mascia ML, Muscarella S, Hendy GN, D'Agruma L, Cole DEC. "Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium-sensing receptor". *J Clin Endocrinol Metab*, e-pubb, Oct 2006.
- ¹⁷⁶ Lorentzon M, Lorentzon R, Lerner UH, Nordstrom P. "Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentrations and bone mineral density in healthy adolescent girls". *Eur J Endocrinol*, 144: 257-261, 2001.
- ¹⁷⁷ Pratt JH, Ambrosius WT, Wagner MA, Maharry K. "Molecular variations in the calcium-sensing receptor in relation to sodium balance and presence of hypertension in blacks and whites". *Am J Hypertens*, 13: 654-658, 2000.
- ¹⁷⁸ Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, Saeli P, Vezzoli G, Arcidiacono T, Loli P, Syren ML, Coviello D, Soldati L, Beck-Peccoz P, Spada A. "The R990G polymorphism of calcium sensing receptor gene (CaSR) is associated with nephrolithiasis in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT)". *Eur J Endocrinol*, 155: 685-690, 2006.
- ¹⁷⁹ Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Yano S, Kanzawa M, Kobayashi A, Chihara K. "Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor

gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism”, *Clin Endocrin*, 55: 373-379, 2001.

¹⁸⁰ Yano S, Sugimoto T, Kanzawa M, Tsukamoto T, Hattori T, Hattori S, Chihara K. “Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients”. *Nephron*, 85: 317-323, 2000.

¹⁸¹ Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Soldati L, Bianchin C, Franceschelli F, Malentacchi C, Porfiro B, Adamo D, Terranegra A, Falchetti A, Cusi D, Bianchi G, Brandi ML. “Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients”. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2517-2523, 2002.

¹⁸² Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, Coviello D, Syren ML, Paloschi V, Giannini S, Mignogna G, Rubinacci A, Ferraretto A, Cusi D, Bianchi G, Soldati L. “R990G polymorphism of calcium-sensing-receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria”. *Kidney Int*, 71: 1155-1162, 2007.

¹⁸³ Terranegra A, Ferraretto A, Dogliotti E, Scarpellini M, Corbetta S, Barbieri AM, Spada A, Arcidiacono T, Rainone F, Aloia A, Cusi D, Vezzoli G and Soldati L 2010. Calcimimetic R-568 effects on activity of R990G polymorphism of calcium-sensing receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 45, 245–256.

¹⁸⁴ S. Corbetta, A. Lania, M. Filopanti, L. Vicentini, E. Ballaré and A. Spada 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Human Normal and Tumoral Parathyroid Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 87: 2201-2205, doi: 10.1210/jc.87.5.2201

¹⁸⁵ Zang M and Breitwieser GE 2005 High affinity interaction with Filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *Journal of Biological Chemistry* 280 11140-11146.

¹⁸⁶ Smith LJ, Bolin KA, Schwalbe H, MacArthur MW, Thornton JM, Dobson CM. “Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations”. *J Mol Biol*, 255: 494-506, 1996.

¹⁸⁷ F.J. Mendoza, I. Lopez, R. Canalejo, Y. Almaden, D. Martin, E. Aguilera-Tejero, M. Rodriguez, Direct upregulation of parathyroid calcium-sensing receptor and vitamin D receptor by calcimimetics in uremic rats, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296 (2009) F605–F613.

¹⁸⁸ S Corbetta, V Vaira, V Guarnieri, A Scillitani, C Eller-Vainicher, S Ferrero, L Vicentini, I Chiodini, M Bisceglia, P Beck-Peccoz, S Bosari and A Spada. Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Feb 18;17(1):135-46.