



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTA' DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMEDICHE

CORSO DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CURRICULUM GENOMICA, PROTEOMICA E TECNOLOGIE CORRELATE

XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DEL CALCIUM SENSING RECEPTOR E POSSIBILE RUOLO NELLA
CALCOLOSI RENALE DI CALCIO**

settore scientifico disciplinare MED/14

Dottorando: Dott ANDREA ALOIA

Matricola: R08143

Tutor: Dott.ssa LAURA SOLDATI

Coordinatore del dottorato: Prof. Mario Clerici

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

*A Maria e Asperino
con riconoscenza*

SOMMARIO

Introduzione: Il calcium sensing receptor (CaSR) è un gene candidato per spiegare la suscettibilità genetica alla nefrolitiasi calcica. Precedenti studi hanno trovato un'associazione statisticamente significativa tra la regione del CaSR che include i promotori 1 e 2 (P1 e P2) e la nefrolitiasi calcica. In particolare gli SNPs rs7652589 e rs1501899, localizzati a monte ed a valle dei P1 e P2, sono risultati associati alla nefrolitiasi calcica con un p-value rispettivamente di 0.0009 e 0.0004.

Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare altri SNPs localizzati all'interno della regione del CaSR associata alla nefrolitiasi calcica e di testare i loro effetti sull'espressione del CaSR nel tessuto midollare renale. **Metodi:** Con un approccio bioinformatico sono stati selezionati SNPs localizzati all'interno del P1 o del P2 o che possono modificare siti di legame per fattori di trascrizione. La genotipizzazione degli SNPs selezionati (rs7648041, rs7648044, rs6776158 e rs1048213) è stata effettuata utilizzando la Taqman genotyping assay in 167 calcolotici normocitraturici e 213 controlli sani normalizzati per età, body mass index e sesso. In 109 tessuti renali è stato quantizzato l'mRNA del CaSR attraverso real-time PCR e sono stati genotipizzati gli SNPs associati alla calcolosi renale di calcio. Saggi luciferasici hanno permesso di valutare l'influenza dello SNP rs6776158 sulla regolazione della trascrizione del P1. **Risultati:** E' stato effettuato un mappaggio fine della regione regolatrice del CaSR per identificare SNPs con un possibile ruolo nella regolazione della trascrizione del CaSR nel tessuto renale. I dati mostrano che lo SNP rs6776158, localizzato all'interno del P1 (159 bp a monte del sito d'inizio della trascrizione), è risultato associato con la patologia. In particolare, l'allele polimorfico è più frequente nei calcolotici rispetto ai controlli (37.8% vs 26.4%, $p=0.00084$). Inoltre, gli individui omozigoti per l'allele polimorfico hanno un rischio 3 volte superiore agli altri genotipi di manifestare la malattia (O.R. 2.968). La quantità di mRNA del CaSR è stata correlata con gli SNPs associati. E' stata trovata una diminuzione dell'mRNA del CaSR in individui omozigoti per l'allele polimorfico delle SNPs rs6776158 ed rs1501899 rispetto agli eterozigoti ed agli omozigoti per l'allele comune (rs6776158: $n=95$, 2.753 ± 0.22 vs $n=14$, 1.69 ± 0.33 , $p=0.0157$; rs1501899: $n=95$, 2.753 ± 0.22 vs $n=14$, 1.69 ± 0.33 , $p=0.0157$). Lo SNP rs7652589 non mostrava differenze. Sia in HEK-293 sia in HKC-8 i saggi luciferasici hanno confermato una diminuzione di attività del P1 in presenza dell'allele polimorfico di rs6776158. **Conclusioni:** I risultati del mio lavoro hanno dimostrato che uno SNP della regione regolatrice del CaSR (rs6776158) è associato alla calcolosi renale di calcio con l'allele polimorfico più frequente nei casi che nei controlli. Inoltre, individui omozigoti per l'allele polimorfico mostrano un rischio 3 volte superiore di manifestare la patologia rispetto agli altri genotipi ed una riduzione della quantità di mRNA del CaSR nei reni. Sulla base di queste considerazioni abbiamo ipotizzato che la diminuzione dell'espressione del CaSR possa predisporre alla nefrolitiasi calcica.

ABSTRACT

Background: The calcium-sensing receptor (CaSR) is a candidate gene of calcium nephrolithiasis. Previously, studies found an association between the CaSR gene region including P1 and P2 promoters and calcium nephrolithiasis. Particularly, the rs7652589 and rs1501899 SNPs, localized up and downstream of promoters, were associated to calcium nephrolithiasis in normocitraturic patients with a p-value of 0.0009 and 0.0004 respectively.

The aims of this study were to identify some other CaSR gene promoter SNPs in CaSR promoter region associated with calcium nephrolithiasis and to test their effects on CaSR expression in tubular kidney tissue. **Methods:** By bioinformatic approach, SNPs were selected as located in P1 or P2 or modifying transcription factors binding sites. SNPs genotyping was performed by Taqman genotyping assays of rs7648041, rs7648044, rs6776158 and rs1048213 in 167 idiopathic calcium stone formers and 213 healthy controls, matched for age, body mass index and gender. In 109 normal kidney medulla tissues CaSR mRNA level was evaluated by real-time PCR and SNPs associated to calcium nephrolithiasis (rs7652589, rs1501899 and rs6776158) were genotyped. The influence of rs6776158 SNP on P1 transcription regulation was tested by luciferase assay.

Results: A fine mapping of the CaSR gene promoter region has been performed to identify SNPs with a possible role in CaSR gene regulation. In stone formers and, controls, SNPs localized in CaSR regulatory were genotyped. The data showed that SNP rs6776158, localized in P1 (159 bp upstream the transcription start site), resulted associated with the disease. Particularly, rs6776158 minor allele showed a higher frequency in stone formers than in controls (37.8% vs 26.4%, $p=0.00084$). The homozygous people for polymorphic allele have a risk to develop the disease 3 times higher than other genotypes (O.R.=2.968). CaSR mRNA was measured in kidney medulla tissues and was related to the kidney stones associated SNPs. A decreased CaSR mRNA was found in homozygous subjects for the minor allele of rs6776158 and rs1501899 vs heterozygous and homozygous for the common allele (rs6776158: $n=95$, 2.753 ± 0.22 vs $n=14$, 1.69 ± 0.33 , $p=0.0157$; rs1501899: $n=95$, 2.753 ± 0.22 vs $n=14$, 1.69 ± 0.33 , $p=0.0157$). No variation was found with rs7652589. In HEK-293 and HKC-8 cells, luciferase assays confirmed that rs6776158 polymorphic allele decrease the P1 activity. **Conclusions:** These findings confirmed the association of calcium nephrolithiasis with CaSR promoter region. Particularly, the polymorphic allele rs6776158 was more frequent in stone formers than in controls. Moreover, homozygous subject for the polymorphic allele have a risk 3 times higher to show the disease and a reduction of kidney CaSR mRNA expression. For this reason we hypothesize that a reduction of CaSR expression can predispose to calcium nephrolithiasis.

LISTA SIMBOLI

SSN= Servizio Sanitario Nazionale; ISTAT= istituto nazionale di statistica; 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; Ca^{2+} =Calcio; PO_4^{4-} =Fosfato; GPCR=Recettore accoppiato a proteine G; mGluR=Recettore metabotropico del neurotrasmettitore glutammato; VR=Recettore vomeronasale; GABA=acido γ amminobutirrico; UTR=untranslato region; P1=Promotore 1; P2= Promotore 2; 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 Embryonic 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=Claudina 16; FHH=Ipercalcemia Ipoalciuria Familiare; NSHPT=Iperparatiroidismo severo neonatale; ADH=Ipoalciemia autosomica dominante; SNP=Polimorfismo di singolo nucleotide; YY1=Ying Yang 1; RNA= acidoribonucleico; HKC=Human Kidney cell; WT=Wild type; TF=Fattori di trascrizione; OR=Odds Ratio; TRPV5=Transient Receptor Potential channel subfamily V member 5;

INDICE

SOMMARIO

ABSTRACT

LISTA SIMBOLI

1.LA CALCOLOSI RENALE DI CALCIO	1
1.1 <i>La calcolosi renale di calcio</i>	2
1.2 <i>Epidemiologia</i>	3
1.3 <i>Aspetti fisiopatologici</i>	4
1.4 <i>La nefrolitiasi calcica come malattia complessa</i>	6
1.5 <i>Fattori di rischio ambientali</i>	6
1.6 <i>Fattori di rischio genetici</i>	7
1.7 <i>Geni associati alla nefrolitiasi idiopatica di calcio</i>	8
2. IL CALCIUM-SENSING RECEPTOR	10
2.1 <i>Introduzione</i>	11
2.2 <i>Struttura del gene e del trascritto</i>	12
2.3 <i>I promotori</i>	13
2.4 <i>Struttura della proteina</i>	14
2.5 <i>Pathway di segnalazione del CaSR</i>	17
2.6 <i>Agonisti del CaSR</i>	20
2.7 <i>Il CaSR e l'omeostasi del calcio</i>	21
2.8 <i>Espressione tissutale del CaSR</i>	23
I) <i>Paratiroide</i>	
II) <i>Tiroide</i>	
III) <i>Rene</i>	
IV) <i>Osso</i>	
V) <i>Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio</i>	
2.9 <i>Fisiopatologia del CaSR: malattie monogeniche correlate</i>	31
2.10 <i>Il CaSR nelle malattie complesse acquisite</i>	36
2.11 <i>Mutazioni e polimorfismi del gene del CaSR</i>	37
2.12 <i>Variazioni di espressione del gene CaSR</i>	38

2.13 <i>Il CaSR nella calcolosi renale</i>	38
2.14 <i>Basi di partenza scientifica</i>	39
3. SCOPO DELLA TESI	41
3.1 <i>Obiettivo dello studio</i>	42
4. MATERIALI E METODI	43
4.1 <i>Soggetti e tessuti</i>	44
4.2 <i>Predizione dei siti di legame per i fattori di trascrizione</i>	44
4.3 <i>Estrazione del DNA da sangue</i>	45
4.4 <i>Genotipizzazione</i>	45
4.5 <i>Quantitative real time PCR</i>	47
4.6 <i>Colture Cellulari</i>	47
4.7 <i>Mutagenesi sito diretta</i>	47
4.8 <i>Trasfezioni transienti</i>	49
4.9 <i>Stimolazione con vitamina D</i>	49
4.10 <i>Saggio luciferasico</i>	49
4.11 <i>Analisi statistica</i>	50
5. RISULTATI	51
5.1 <i>Analisi bioinformatica della regione regolatrice del gene CaSR</i>	52
5.2 <i>Studio caso-controllo</i>	55
5.3 <i>Valutazione dei livelli di mRNA del CaSR in presenza delle varianti genetiche associate alla patologia</i>	57
5.4 <i>Saggio Luciferasico</i>	60
5.5 <i>Discussione</i>	63
6. CONCLUSIONI	66
7. BIBLIOGRAFIA	68

1. LA CALCOLOSI RENALE DI CALCIO

*“Nella scienza il credito va all'uomo
che convince il mondo,
non all'uomo che ha per primo l'idea”
Sir Francis Darwin*

1.1 La calcolosi renale di calcio

La nefrolitiasi è una patologia caratterizzata dalla formazione nelle vie urinarie di corpi solidi denominati calcoli (Figura 1). I calcoli sono depositi che si formano dalla precipitazione, all'interno dei reni o delle vie urinarie, di sali minerali presenti nel fluido urinario. La precipitazione è favorita dall'aumento della concentrazione di questi elettroliti per aumento della loro quantità o per la riduzione del liquido che li mantiene in soluzione. Le urine contengono anche sostanze che impediscono la formazione di calcoli, ma spesso questi inibitori naturali hanno una concentrazione insufficiente per poter svolgere efficacemente la loro funzione.

I sali minerali si aggregano a formare cristalli, quindi microcalcoli e infine calcoli che possono arrivare ad avere il diametro di qualche centimetro. Oltre a traumatizzare l'urotelio, a causa della loro struttura e dimensione, i calcoli renali possono muoversi dalla sede d'origine ed andare a costituire un ostacolo al normale deflusso dell'urina lungo le vie escrettrici, favorendo così l'instaurarsi d'infezioni e di lesioni renali che possono contribuire allo sviluppo di un'insufficienza renale cronica.

In base alla composizione chimica si distinguono diversi tipi di calcoli (calcici, urici, misti, cistinici) ognuno dei quali richiede un approccio terapeutico differente. Tuttavia nei Paesi occidentali i calcoli di calcio-ossalato e di calcio-fosfato rappresentano il 75-80% di tutte le calcolosi. L'ossalato di calcio (CaC_2O_4), sottoforma sale monoidrato (whewellite) o diidrato (wedellite), è il principale costituente di tali tipi di calcoli. Il calcio-fosfato è invece solitamente presente negli uroliti sottoforma di fosfato di calcio idrogeno (brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o idrossiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) o più raramente sotto forma di altri composti quali la whitlockite ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) o l'octacalcio-fosfato ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$)⁽¹⁾.

La *litiasi calcica* è una patologia multifattoriale in cui l'insorgenza della malattia dipende dall'interazione di fattori genetici ed ambientali. Una chiara trasmissione genetica è dimostrabile in pochi casi, ma studi su popolazioni, famiglie e gemelli hanno indicato l'ereditarietà come uno dei principali fattori di rischio della patologia. Soggetti con familiarità hanno una probabilità 3 volte superiore alla media della popolazione generale di sviluppare un episodio litiasico.

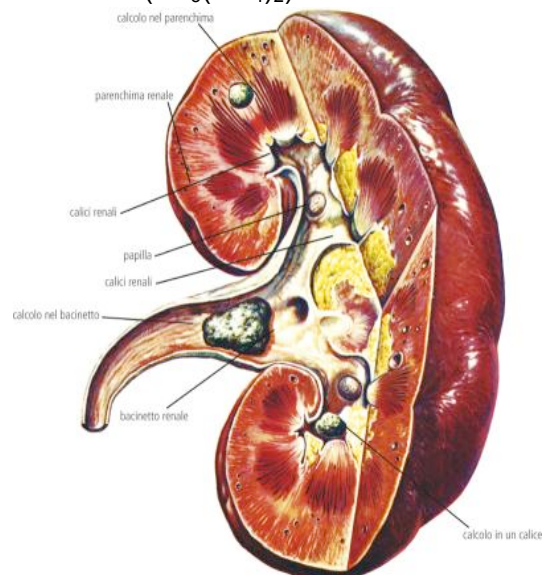


Figura 1: Calcoli renali nelle vie urinarie.

1.2 Epidemiologia

La Nefrolitiasi colpisce il 10-15% della popolazione mondiale con un rapporto maschi:femmine che si avvicina a 2:1.

La prevalenza a livello mondiale è variabile in funzione di dieta, stile di vita, condizioni ambientali e background genetico. E' riscontrata prevalentemente nei soggetti di razza bianca tra i 40 ed i 50 anni ⁽²⁾. Negli ultimi anni l'incremento di fattori sfavorevoli stanno contribuendo ad un rapido incremento della prevalenza e delle recidive nella popolazione. In uno studio epidemiologico italiano, condotto tra il 1986 e il 1998 sulla popolazione di una cittadina dell'area milanese, è stato riscontrato un incremento dell'incidenza di calcolosi dal 6.8% al 10.1% negli individui di sesso maschile e dal 4.9% al 5.8% in quelli di sesso femminile ⁽³⁾. La nefrolitiasi ha una notevole tendenza a recidivare in uno stesso soggetto. Il 50% dei pazienti che presentano un episodio di colica renale con espulsione di un calcolo, affrontano un nuovo episodio entro 10 anni; la percentuale sale al 75% se si considera un tempo di recidiva di 20 anni ⁽⁴⁾.

La calcolosi di calcio è la forma più frequente tra tutti i sottotipi di nefrolitiasi e quindi pur non essendovi dati che si riferiscano in modo specifico alla calcolosi calcica, si assumono per la sua prevalenza ed incidenza nella popolazione quelli riferiti alla patologia litiasica in generale.

Vista l'alta prevalenza della malattia e l'elevata frequenza di recidive la nefrolitiasi determina un alto costo per la società. L'aumento della prevalenza sta incidendo in maniera crescente sulla spesa sanitaria. In Italia, dal 1995 ad oggi i ricoveri ospedalieri per calcolosi praticati in regime di convenzione SSN si sono attestati intorno a 100.000 all'anno con 12.000 interventi chirurgici, 50.000 interventi di litotrissia extracorporea, e una spesa annua ospedaliera di circa 250 milioni di euro. I ricoveri ospedalieri erano invece 60.000 nel 1988 (dati ottenuti dalla consultazione delle indagini ISTAT). Per questi motivi la nefrolitiasi si colloca fra le tre principali cause di ricovero in ambito nefro-urologico, insieme all'ipertrofia prostatica ed all'insufficienza renale cronica.

A causa delle complicanze mostrate dai pazienti calcolotici, l'episodio litiasico è spesso accompagnato da un alto numero di ricoveri ospedalieri. La prima e principale è il dolore, la colica renale viene descritta come uno degli eventi più dolorosi che possano capitare. Meno frequenti sono invece anuria ed insufficienza renale acuta, secondarie ad ostruzione della via urinaria. Esse si possono verificare nella calcolosi bilaterale ma anche nei pazienti con un solo rene funzionale.

1.3 Aspetti fisiopatologici

La patogenesi della calcolosi renale di calcio non è ancora del tutto chiara. Caratteristiche alterazioni associate alla nefrolitiasi calcica quali ipercalciuria, iperuricuria, ipocitraturia ed iperossaluria fanno pensare che queste modifiche, anche se solo temporanee, possano ricoprire un importante ruolo patogenetico. Per questo motivo, nel processo di litogenesi, un ruolo importante sembra essere rivestito dalla sovrassaturazione dei sali nelle urine. Nello schema chimico-fisico della litogenesi calcica è stato proposto che i sali di Ca^{2+} sovrassaturi possano precipitare come cristalli nel fluido urinario e tendere ad aumentare in volume e ad aggregarsi fino a dare origine ad un macroaggregato. Il macroaggregato può fungere da centro di nucleazione per lo sviluppo del calcolo. La presenza di fattori prolitogeni (acido urico e fosfolipidi) e l'assenza di fattori antilitogeni (citrato e glicosamminoglicani) possono favorire la precipitazione e l'aggregazione dei cristalli. Tuttavia questo schema patogenetico deve ancora essere definito in ogni punto del suo sviluppo. Sembra abbastanza chiaro che la precipitazione salina nelle urine è il fenomeno iniziale ⁽⁵⁾, tuttavia restano ancora da spiegare le diverse fasi che conducono alla produzione del calcolo. Ad oggi, le due teorie prevalenti individuano nell'interstizio renale o nel lume tubulare la sede primaria di questi eventi (Figura 2). La prima teoria è stata sviluppata sulla base dell'ipotesi formulata da Randall, secondo il quale il calcolo di ossalato si sviluppa su depositi interstiziali di idrossiapatite, estesi fino alla superficie delle papille renali e definiti come *placche di Randall* ⁽⁶⁾. A conferma di questa ipotesi, recenti studi hanno evidenziato che, nei pazienti con calcolosi calcica idiopatica, i calcoli di ossalato aderiscono alle papille renali, in aree dove la superficie della papilla è ulcerata ed è sede della placca di Randall ⁽⁷⁾. L'esame istologico ha dimostrato che le placche di Randall sono composte da depositi di idrossiapatite nell'interstizio papillare.

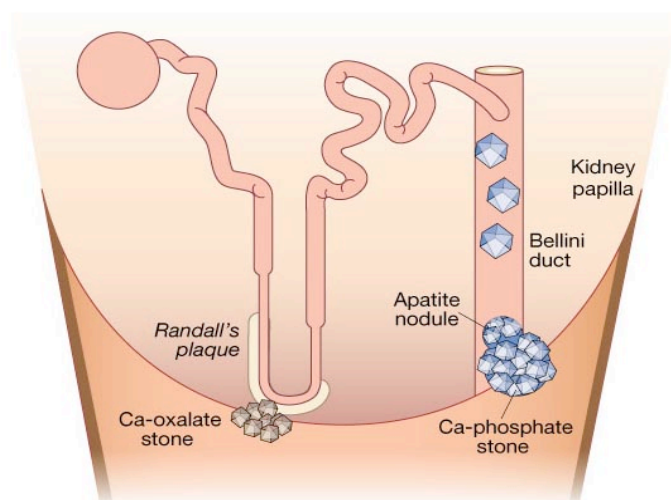


Figura 2: rappresentazione dell'eziopatogenesi della calcolosi renale

In uno studio successivo è stato osservato che i segni di sofferenza tubulo-interstiziale sono più marcati nei pazienti con calcolosi di calcio-fosfato; in tali pazienti si può sviluppare necrosi cellulare, fibrosi interstiziale e glomerulosclerosi ⁽⁸⁾. Da questi risultati sembra verosimile che i sali di idrossiapatite dell'interstizio papillare, una volta esposti all'urina, possano diventare nuclei di precipitazione eterologa per il fosfato di calcio urinario, permettendo così lo sviluppo del calcolo renale nel lume del tratto urinario.

Un'ampia serie di lavori condotti sull'uomo e sugli animali dimostra come la precipitazione di cristalli nel lume tubulare causi sofferenza dei tubulociti prima di sviluppare calcolosi. L'ossalato, sia sotto forma di molecola libera che di cristallo, sembra rivestire un ruolo fondamentale in questo meccanismo, attraverso un'intrinseca tossicità per le cellule tubulari ⁽⁹⁾. Il contatto dei tubulociti con l'ossalato provoca infatti la loro vacuolizzazione, apoptosi e necrosi con caduta di detriti cellulari nel lume tubulare. Tra i detriti, i fosfolipidi delle membrane cellulari sembrano capaci di costituirsi come nucleo per la precipitazione dei sali di calcio ⁽¹⁰⁾.

Indipendentemente dalla composizione (calcio-ossalato o calcio-fosfato) e dalla sede del deposito cristallino (interstiziale o tubulare), lo sviluppo di un calcolo avviene attraverso un processo che prevede lo sviluppo di flogosi nell'interstizio papillare. L'intensità di questa flogosi è di debole intensità ma ad essa farebbe seguito l'erosione e l'ulcerazione della papilla con esposizione di macroaggregati cristallini nella via urinaria che diventerebbero nucleo di calcificazione per il calcolo vero e proprio. Questi lavori hanno il merito di avere posto in rilievo la relazione tra infiammazione e calcolosi renale che potrebbe spiegare lo sviluppo di IRC in una parte dei pazienti con nefrolitiasi di calcio. Essi considerano però l'ossalato e non il calcio come il principale attore nel processo di litogenesi.

Un'ulteriore interessante ipotesi patogenetica ha il merito di unificare le due fin qui esposte. Essa propone che la placca di Randall sia il frutto di un processo attivo di calcificazione, mediato da cellule differenziate in senso osseo. Questa ipotesi è supportata dal fatto che la precipitazione dell'apatite non avviene spontaneamente nei tessuti, ma dipende dalla presenza di cellule con uno specifico patrimonio enzimatico che le rende capace di produrla. Gli osteoblasti possiedono questo patrimonio enzimatico. Sulla base di queste conoscenze è stato ipotizzato che fattori tossici come l'ossalato possano provocare, nelle cellule tubulari, delle modificazioni tali da indurre l'espressione di geni normalmente repressi, quali quelli che codificano per gli enzimi produttori dell'apatite. Il risultato dell'effetto tossico potrebbe pertanto essere quello di indurre una transdifferenziazione in senso osteoblastico dei tubulociti. A questo farebbe seguito la precipitazione di apatite nell'interstizio e la formazione della placca di Randall.

1.4 La nefrolitiasi calcica come malattia complessa

La nefrolitiasi calcica è una patologia multifattoriale causata dall'interazione sia di fattori ambientali che genetici. I principali fattori ambientali sono quelli climatici e dietetici mentre i numerosi geni coinvolti fanno sì che la modalità di trasmissione della malattia risulti complessa e non di tipo Mendeliano.

Probabilmente un unico fattore di predisposizione è insufficiente a causare l'insorgenza di un evento litogeno. La contemporanea presenza di più fattori di rischio aumenta la probabilità che si manifesti la patologia (¹¹). La nefrolitiasi si presenta perciò con i tratti tipici delle malattie multifattoriali a patogenesi complessa.

1.5 Fattori di rischio ambientali

Negli ultimi anni gli studi dei fattori ambientali, che possono incidere sull'insorgenza della calcolosi, si sono indirizzati sempre più spesso allo studio dei fattori climatici. Dati epidemiologici mostrano che nelle regioni più calde (o nelle stagioni calde in regioni a clima temperato) vi è un'augmentata incidenza di calcolosi renale dovuta al diminuito volume urinario, secondario all'aumentato della traspirazione cutanea. Il diminuito volume conduce ad un aumento dell'osmolarità urinaria con un possibile aumento sia della concentrazione di calcio che di acido ossalico (¹²). Uno studio recente ha stimato che solo negli Stati Uniti l'aumento della temperatura terrestre porterà un incremento dall'1,6 a 2,2 milioni di nuovi casi l'anno entro il 2050 (¹³). Inoltre, la prolungata esposizione ai raggi solari potrebbe indurre un aumento dei livelli di vitamina D con conseguente aumento dell'assorbimento intestinale e dell'escrezione urinaria di calcio.

Tuttavia, il fattore ambientale determinante per lo sviluppo della patologia è il regime dietetico. Modificazioni dietetiche possono prevenire sia l'insorgenza che la ricorrenza della malattia.

Uno scarso apporto dietetico di calcio sembra essere associato con un maggiore rischio litiasico. Il rischio di sviluppare calcolosi, nei soggetti che introducono quantitativi di calcio inferiori a 600 mg/die, è di circa il 30% superiore rispetto ai soggetti con un introito dietetico maggiore di 1000 mg/die (^{14,15}). Il ruolo protettivo del calcio alimentare sulla produzione di calcoli, può essere spiegato dalla sua capacità di combinarsi con l'ossalato nell'intestino, formando sali insolubili; viene così ridotta la quota di ossalato disponibile per l'assorbimento e conseguentemente la sua escrezione (¹⁶). Sulla base di questi studi l'assunzione di calcio alimentare, nella prescrizione dietetica della calcolosi, deve mantenersi tra 800 e 1000 mg/die. Poiché anche un alto intake di calcio è stato associato ad un alto rischio di sviluppare calcolosi renale di calcio.

Il sodio si ritiene abbia un potenziale ruolo nella litogenesi, infatti un intake sodico eccessivo accresce in maniera rilevante l'escrezione di calcio riducendo il suo riassorbimento a livello tubulare (¹⁷).

Un elevato apporto dietetico di proteine animali sembra favorire la nefrolitiasi calcica e questo, potrebbe spiegare l'accresciuta frequenza della malattia nei Paesi Occidentali nel corso del secolo scorso. Tuttavia gli studi epidemiologici non hanno ottenuto risultati univoci. La maggioranza dei lavori concorda nel riscontro di un aumentato rischio di nefrolitiasi in soggetti che mangiano più di 75 g di proteine animali al giorno perché esse incrementano l'escrezione urinaria di calcio, fosfato e acido urico, mentre riducono citrato e pH urinario. Accanto a questi effetti, il carico proteico cronico stimola l'ipertrofia renale, con conseguente aumento della produzione di vitamina D e dell'assorbimento intestinale di calcio (^{18,19,20}).

Un incrementato consumo di saccarosio è stato associato ad un maggiore rischio di sviluppare calcoli nelle donne (^{21,22}). In un ulteriore studio l'aumentato rischio litogeno è stato associato all'aumentato consumo di fruttosio che sembrerebbe aumentare sia la calciuria che l'ossaluria (²³). Più dibattuto è il ruolo dei grassi. Anche se la calcolosi è spesso associata con l'ipercolesterolemia (²⁴) ed i lipidi urinari possono giocare un ruolo importante nella formazione di cristalli e calcoli (²⁵), molti studi non mostrano associazione tra l'assunzione di grassi e lo sviluppo della patologia (²⁶). Recentemente, anche i fitati (inositolo epafosfato) hanno suscitato un notevole interesse perché vengono escreti a livello urinario dove svolgono un forte effetto inibitorio sulla cristallizzazione del calcio ossalato e calcio fosfato. Per quanto riguarda le vitamine, la Vitamina D non sembra influenzare il rischio di calcolosi, la B6 è stata associata ad un diminuito rischio di calcolosi, mentre la vitamina C sembra favorire la formazione dei calcoli renali, ma solo se introdotta in grandi quantità, superiori ad 1500 mg/die (^{27,28}).

Tra tutti i nutrienti l'acqua risulta l'elemento fondamentale. Un volume urinario superiore a 1700 mL nelle 24 ore riduce significativamente il rischio di nefrolitiasi poiché l'alto volume urinario diluisce i soluti che non sono abbastanza saturi per poter precipitare (²⁹).

1.6 Fattori di rischio genetici

Lo strumento utilizzato per la definizione della genetica della calcolosi di calcio è stato quello degli studi di associazione caso-controllo o tra familiari, nei quali è studiata la cosegregazione dei polimorfismi di un gene-candidato o di altri marcatori genetici con la calcolosi. Gli studi di linkage su famiglie sono risultati poco efficaci nell'analisi dei caratteri non-mendeliani come la calcolosi di calcio idiopatica, viceversa sono stati molto utili per scoprire i geni responsabili delle forme monogeniche di calcolosi renale, come la sindrome di Dent, l'acidosi tubulare e la sindrome di Bartter (^{30,31}). L'ipotesi è che i difetti alla base della malattia potrebbero derivare dalla variabilità fenotipica indotta dai polimorfismi genetici non conservati. I polimorfismi potrebbero indurre cambi amminoacidici o alterare l'espressione di uno o più geni che determinano le alterazioni metaboliche responsabili della formazione del calcolo.

La storia familiare positiva per nefrolitiasi sembra essere il fattore di rischio più predittivo della tendenza a sviluppare calcolosi renale di calcio. La frequenza di parenti con calcolosi risulta

essere tripla negli individui affetti dalla malattia rispetto ai parenti di soggetti normali. In uno studio svedese, il 29.6% dei familiari di primo grado dei pazienti calcolotici era affetto da nefrolitiasi calcica contro il 17.4% dei sani (³²). Il dato è stato confermato in uno studio americano (16.2% vs 5.3%) (³³). In Italia è stato osservato che il 45% delle donne ed il 31% degli uomini affetti avevano una familiarità positiva per nefrolitiasi (³⁴). Anche uno studio islandese ha riconosciuto una familiarità positiva per nefrolitiasi nel 25% dei pazienti a fronte del 4% dei controlli (³⁵). Questi risultati confermano l'influenza genetica sulla malattia, ma le differenze di frequenza che si osservano nelle diverse popolazioni dimostrano l'importante ruolo dei fattori ambientali nel modificarne la penetranza. Quale sia il peso relativo delle componenti, ambientale, dietetica e genetica non è stato ancora stabilito con certezza.

1.7 Geni associati alla nefrolitiasi idiopatica di calcio

Il pattern di trasmissione del fenotipo "calcolosi" è sembrato di tipo non-mendeliano sin dai primi studi (^{36, 37}) che ipotizzavano una trasmissione complessa e poligenica.

Più geni sono probabilmente coinvolti nei diversi momenti dello sviluppo del calcolo, ma nessuno è stato ancora individuato con certezza. I geni candidati sembrano essere quelli che regolano la concentrazione di soluti litogeni nelle urine e che bilanciano la quantità di promotori e/o inibitori della cristallizzazione (³⁸). Sulla base di quest'ipotesi Goodman ed i suoi collaboratori (³⁹) hanno elaborato un modello nel quale 3-4 geni potrebbero fornire il principale contributo alla formazione dei calcoli renali di calcio, intervenendo sulla escrezione di citrato, calcio e ossalato. Un'alternativa possibile è che più geni, ciascuno incapace da solo di causare calcolosi, agiscano in modo additivo predisponendo alla patologia. Un modello di questo tipo, è particolarmente difficile da studiare perché, con il crescere del numero dei geni coinvolti, cresce anche la difficoltà di identificarli, sia per il minor peso dei singoli geni sul fenotipo, sia per le interazioni ambientali che ne possono mascherare l'effetto nei pazienti (^{40, 41}).

I primi studi genetici hanno considerato, come candidati, i geni responsabili delle forme di calcolosi renale a trasmissione mendeliana. Per questo motivo sono stati analizzati il gene codificante per il canale del cloro CICN5 responsabile della sindrome di Dent, il gene di NPT2a che codifica per un trasportatore sodio-fosfato del tubulo prossimale (⁴²) ed il gene PCLN-1 che codifica per la paracellina (⁴³). Mutazioni o polimorfismi di questi geni sono stati trovati in singoli pazienti, senza però che questi avessero rilevanza in ampie casistiche (^{44, 45}).

Altri geni sono stati oggetto di studio perché codificavano per proteine con potenziale valore fisiopatologico. Un gene che ha ottenuto le attenzioni di molte ricerche, è stato quello del recettore VDR (locus 12q12-14) che media l'effetto del suo ligando, il metabolita attivo della vitamina D, sulle cellule target. La forma attiva della vitamina D [1,25-(OH)₂D₃], o calcitriolo, è infatti coinvolto nell'assorbimento intestinale del calcio e nella sintesi di PTH. Esso è anche coinvolto nel metabolismo dei citrati, poiché stimola la sintesi di fosfoenolpiruvatocarbossilchinasasi che,

fosforilando un cotrasportatore sodio-citrato della membrana luminale del tubulo prossimale, ne favorisce l'attività e il riassorbimento del citrato. Di conseguenza il calcitriolo modula sia l'escrezione di calcio sia l'inibizione della cristallizzazione dei sali da parte dei citrati nel tratto urinario. È probabile quindi che eventuali disfunzioni nel pathway della vitamina D possano essere alla base dell'iperocalciuria, della calcolosi e dell'osteoporosi.

Diversi studi caso-controllo hanno osservato un'associazione della calcolosi con i polimorfismi genetici dell'introne 8 ed esone 9 dell'estremità 3' del gene VDR oppure con il polimorfismo del codone d'inizio della trascrizione (^{46,47}). Altri studi, viceversa, non hanno osservato alcuna di queste associazioni (^{48,49}). Altri studi ancora, hanno trovato che le varianti alleliche di due polimorfismi genetici dell'estremo 3' del gene VDR si associavano nella popolazione italiana ad un andamento più severo della malattia, poiché i pazienti con questi genotipi presentavano familiarità più frequentemente positiva, urine più soprassature di calcio-ossalato, minore età di insorgenza e valori di citraturia più bassi (^{50,51}). E' perciò possibile che questo gene intervenga sul fenotipo, determinando l'andamento della malattia, anche se il livello d'intervento non è ancora chiaro.

Uno studio ha anche osservato una relazione della calcolosi di calcio con i polimorfismi genetici dell'antagonista del recettore della interleukina-1 (cromosoma 2q), mettendo in evidenza la relazione tra la flogosi e lo sviluppo di calcolosi (⁵²). Altri hanno trovato una relazione della calcolosi con il gene dell'urochinasi (⁵³), della E-caderina (⁵⁴), e con il fattore di crescita endoteliale (⁵⁵).

Il gene del calcium-sensing receptor (CaSR) è di fondamentale importanza nella regolazione dell'omeostasi del calcio. Esso è espresso in tutti i tessuti che ne regolano la concentrazione plasmatica ed urinaria, a seconda del tessuto attiva vie di segnalazioni diverse che portano a diversi effetti finali. A livello renale, la sua attivazione induce modifiche diverse a seconda del segmento tubulare in cui è espresso. Queste modifiche possono agire sia in senso pro-litogeno che anti-litogeno. Questo gene e la sua associazione con la nefrolitiasi calcica idiopatica messa in evidenza da uno studio italiano (⁵⁶), sono state le basi di partenza di questo lavoro di tesi.

2. IL CALCIUM SENSING RECEPTOR

*“La teoria è quando si sa tutto e niente funziona.
La pratica è quando tutto funziona e nessuno sa il perché.
Noi abbiamo messo insieme la teoria e la pratica:
non c'è niente che funzioni... e nessuno sa il perché!”
Albert Einstein*

2.1 Introduzione

La sopravvivenza dei primi organismi unicellulari è stata assicurata dalla capacità di rilevare nutrienti e ioni, come il Ca^{2+} e il Na^+ , nell'ambiente extracellulare. Anche gli organismi complessi hanno bisogno di meccanismi di rilevazione e regolazione del Ca^{2+} poiché esso è il principale costituente delle ossa ed a livello intracellulare innesca cascate di eventi che controllano importantissime funzioni. La contrazione muscolare, la coagulazione del sangue e la secrezione di ormoni e neurotrasmettitori può essere assicurata solo mantenendo la concentrazione di Ca^{2+} extracellulare ed intracellulare all'interno di range ristretti (extracellulare: 1.1-1.4 mM per l'uomo; intracellulare intorno a 100 nM)⁽⁵⁷⁾. Sulla base di queste conoscenze, era stata ipotizzata la presenza di una molecola in grado di percepire le variazioni di concentrazione di questo ione.

Nel 1993 è stato clonato per la prima volta da cellule paratiroidi bovine un recettore accoppiato a G-proteins sensibile al Ca^{2+} , chiamato Calcium Sensing Receptor (CaSR)⁽⁵⁸⁾. Poco dopo lo stesso recettore è stato identificato anche nelle paratiroidi e nel rene umano ^(59, 60). Studi successivi hanno dimostrato che il recettore ha un'ampia distribuzione tra le specie: si ritrova in uccelli, rettili, anfibi e mammiferi ma si ritrova con un'alta omologia anche in organismi meno evoluti, come gli squali ed il pesce palla dove il recettore può essere utile non solo nel mantenere l'omeostasi del Ca^{2+} , ma anche nell'orientamento tra le correnti del mare ⁽⁶¹⁾, poiché è in grado di percepire cambiamenti nella concentrazione salina ⁽⁶²⁾.

Nella cellula paratiroidea il CaSR permette di sentire piccole fluttuazioni di Ca^{2+} extracellulare grazie all'elevato coefficiente di Hill (circa 3) regolando la secrezione dell'ormone paratiroideo (PTH)⁽⁶³⁾. Il PTH nel rene aumenta il riassorbimento di Ca^{2+} e PO_4^{4-} dal filtrato e la sintesi di vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), che incrementa l'assorbimento intestinale, la demineralizzazione ossea e di conseguenza la concentrazione di Ca^{2+} e fosfato plasmatico. A ribadire l'importanza del calcio per le funzioni fisiologiche, si aggiunge anche il ruolo che il recettore svolge a livello citoplasmatico come uno dei più importanti messaggeri intracellulari.

Il CaSR è un membro della famiglia C della superfamiglia dei G-protein coupled receptors (GPCRs) che è costituita da 3 sottogruppi di recettori: al gruppo I appartiene il recettore metabotropico del neurotrasmettitore glutammato (mGluR 1-8), espresso nel sistema nervoso centrale, altamente omologo al CaSR; il gruppo II comprende il CaSR ed il recettore vomeronasale (VR), espresso nell'organo vomeronasale dei ratti, esso è in grado di sentire i ferormoni regolando i comportamenti istintivi; al gruppo III, infine, appartiene la sottofamiglia dei recettori per i neurotrasmettitori inibitori GABA_B . Questi recettori hanno un'alta omologia nella struttura proteica con i 3 domini del CaSR. La conservazione lungo l'evoluzione della struttura dei recettori e la loro distribuzione in tante specie dà l'idea dell'importanza di recettori come il CaSR nelle funzioni cellulari ^(64, 65).

2.2 Struttura del gene e del trascritto

Il gene umano del CaSR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q13.3-q21) (Figura 3a), è costituito da 102 Kb e conta 8 esoni. Sei esoni (dal secondo al settimo) codificano i 1078 amminoacidi che compongono la proteina CaSR. Dal secondo all'estremità 5' del settimo viene codificato il dominio extracellulare ed il resto del settimo codifica per i domini transmembrana e C-terminale. Nell'esone 7 ci sono 2 differenti sequenze segnali di poliadenilazione (AATAAA) che possono variabilmente dare origine a una corta (177 nucleotidi) o una lunga (1304 nucleotidi) regione 3' non tradotta (3'UTR). Il primo esone, l'estremità 5' del secondo e l'estremità 3' del settimo sono non tradotti (Figura 3b). Gli esoni 1A e 1B trascrivono alternative 5'-UTR, i trascritti alternativi contengono l'esone 1A o l'esone 1B e si uniscono all'esone 2 nella stessa posizione (242 nucleotidi a monte del codone ATG d'inizio della traduzione) (Figura 3c). Le mutazioni rare e le variazioni polimorfiche note a carico del gene sono molte, sia nelle regioni codificanti che regolatrici. Le mutazioni danno origine spesso a malattie rare a carattere ereditario, i polimorfismi possono essere invece coinvolti nell'insorgenza di patologie complesse.

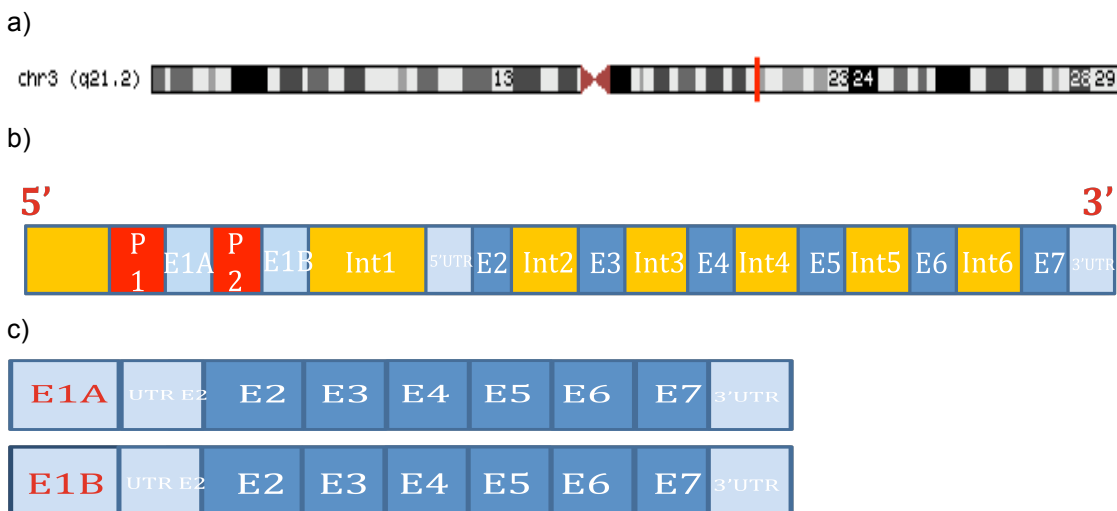


Figura 3. rappresentazione della posizione (a) sul cromosoma 13 e della struttura (b) del gene umano del CaSR. Il gene si espande per 102 Kb di DNA genomico, presenta 2 promotori P1 e P2 ed è organizzato in 7 esoni e 6 introni. Il gene codifica, dall'esone 2 all'estremità 5' dell'esone 7, per il dominio ECD e per il resto del codone 7 i domini TMD e C-terminale. L'esone 1, l'estremità 5' dell'esone 2 e l'estremità 3' dell'esone 7 sono porzioni del gene non tradotte (regioni azzurre). (c) Rappresentazione dei 2 trascritti alternativi dell'mRNA del CaSR con le 5' e 3' UTR (in azzurro) e le regioni tradotte (in blu).

2.3 I promotori

La regione regolatrice del CaSR presenta due promotori: P1 e P2. I promotori trascrivono rispettivamente per l'esone 1A o 1B. P1 possiede una TATA box in posizione -26 ed una CCAAT box in posizione -110 rispetto al sito d'inizio della trascrizione (+1). Il promotore 2 presenta una regione ricca in GC, il sito d'inizio della trascrizione è localizzato tra 2 siti di legame delle Specificity Protein 1 (SP1). Le Sp1 sono fattori di trascrizione caratterizzati da motivi zinc finger che legano il DNA e ne potenziano la trascrizione genica. In entrambi i promotori sono presenti elementi funzionali di risposta alla vitamina D (VDREs) ed elementi NF-κB attivati dalla citochina IL-1b. Questo spiega come anche la trascrizione del gene sia finemente regolata nel quadro generale dell'omeostasi del Ca²⁺ e venga influenzata dai quadri flogistici (^{66, 67}). Elementi di legame per le proteine Stat1/3 (potenti attivatori trascrizionali) sono presenti solo sul P1, mentre gli elementi Sp1/3 sono presenti solo sul P2. I siti d'inizio della trascrizione sono stati precisamente mappati ed i livelli di attività dei promotori sono stati analizzati, i dati suggeriscono che il P2 possa essere funzionalmente più attivo e responsabile dell'espressione tessuto-specifica del CaSR(⁶⁸). Sono note alcune 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. Un'altra variante di splicing produce un recettore tronco non funzionante, che potrebbe interferire con l'attività normale del recettore ma non è stato ancora dimostrato (⁶⁹). Eventi di splicing alternativo dovuti a mutazioni, che causano la perdita di un esone, sono noti in diverse patologie (^{70, 71}).

a)

```

                                VDRE
CTTCACATTT ATTCTATTA ACCAGATTTT GCCCCTTCAC TGGTGCTTTA GCATTTGCTC AGCTCCTTCT CCTACCCCTGT ATTTGAGGGA AAGGAAGCCA
AATGGGCAGA ACTTGGCCAT AATGGGGATG TGTTTGACAT GCTGGATTG AGTCTGTGTT CCATTGAAGA AAAGAAATGG AAACCTTTGTT GAGTATCCAT
TCTATACAGG GCACTTTCCT TGACTATTC ATTAAACT CCAAGGACCC CCTGAGGTAG ATGTTATCAC CATTTTGAG AGAAGAAATC TGCATTTTTA
                                CCAAT Box
TTTGAAGTTC TTAACATGG TAAACGAC CC AAT TTTCTGC TTTTGTCTA ACAGTATTTT GCAAACATTT TATCATGTTA CTTTCATGTT TCCTATTTT
                                TATA box
TTTTTTTTC TTTATAAATA AATACATACT CCCTCCTTAT TCTAAAAAGA ATTTGAAGCA CTTCTGTCTT GATGTTTATC ATTTTAACGG TTGTATAATG
                                +1 PE/RPA
                                Exon 1A
                                RACE
                                ▲

```

b)

```

                                VDRE
CGGCACGGGA GAGGGCAGGA GAGGACCTAA GCGCGGGCT CGCCGTCTGC TGGGGACCCG AGCCCGCCTG TGGCCCTCGG GGAACCGAAG ACCCGCCCTC
AGCGACCCG AAGAGTCAGC TAAGTCTCTC GCGGGCTAAG GAGACGTTGA AGGAACCCGG ACTAACTGGG TAGGGGTTAG AAGGCAGCCC GCGAGTGGGC
                                +1 PE/RPA/RACE
TACGAGGGGA GCTGGGCTCG GCAGTTGGGG ACCCCGAGGG GGCAAGCGGG CGGGGAGCAG GAGAGGGGCG GAGCTCCGGG GCCGGGGCCG GGACCCGAGC
                                ▼

```

Figura 4: sequenza nucleotidica dei promotori 1 (a) e 2 (b) del CaSR con alcuni elementi regolatori (Modificata da Canaff et al. 2002,⁶⁶)

2.4 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 àncora il recettore alla membrana, ed il dominio C-terminale, nel versante citoplasmatico (216 aa), responsabile della trasmissione del segnale (Figura 5).

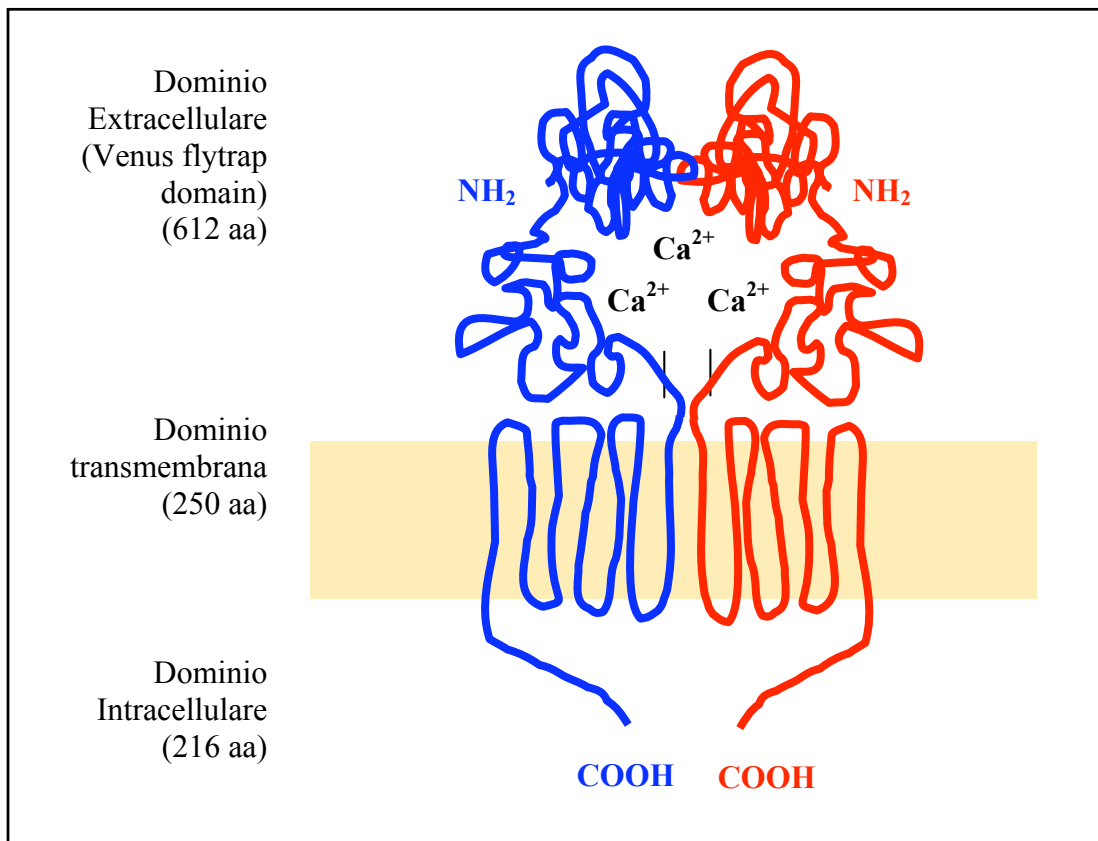


Figura 5: struttura proteica del CaSR. Il recettore funziona come dimerico e ogni elemento del dimerico è costituito da un ECD (sito di legame del calcio), un TMD e un dominio C-terminale.

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 HEK trasfettate con il cDNA umano del CaSR, inizia con una tirosina alla posizione aminoacidica 20 (72). 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

immaturato ed una banda di 160 kDa che corrisponde alla forma matura dello stato di glicosilazione. Un'ulteriore banda a circa 250 kDa mostra la forma dimerica del recettore (⁷³). La glicosilazione è necessaria per la localizzazione del CaSR sulla superficie cellulare. I dimeri del CaSR sono legati da ponti di-solfuro tra residui di cisteina. Ogni monomero ha 20 residui di cisteina, 17 dei quali nel ECD, 1 nel primo e 1 nel secondo loop extracellulare del TMD, e 1 nella quinta elica TMD. Studi recenti hanno dimostrato che le cisteine in posizione 129 e 131 sono le due fondamentali per la formazione del dimero (⁷⁴). Due leucine (posizione 112 e 156) contribuiscono alla stabilità del dimero attraverso interazioni non covalenti, esse sono capaci di supplire anche a mutazione a carico delle due cisteine (⁷⁵) ma la combinazione di tutte e 4 le mutazioni inattiva il CaSR. La dimerizzazione, attraverso legami covalenti e non-covalenti, è fondamentale per mantenere il recettore in una conformazione attiva. Il dominio extracellulare in forma dimerica assume la conformazione bilobata ad ali di farfalla, ed è perciò chiamato venus fly trap domain (VFTD). Queste ali restano aperte quando non c'è il ligando (forma inattiva) e si chiudono dopo il contatto con esso (forma attiva) (^{76,77}). All'interno del VFTD sono state identificate le sequenze necessarie al 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) (⁷⁸). La presenza dei residui di zuccheri sembra contribuire anche al legame del Ca^{2+} , alla struttura e la funzione del recettore. Trattamenti con inibitori della glicosilazione riducono, infatti, l'attività del recettore. Attraverso esperimenti di mutagenesi sito-dirette si è dimostrato che solo 8 degli 11 siti di glicosilazione sono usati e l'eliminazione di 4 o 5 di questi siti produce una sostanziale diminuzione (50-90%) dell'espressione del recettore sulla membrana e della sua attività (⁷⁹).

Le prime evidenze che lo ione si legava all'ECD sono venute dalla creazione di recettori chimerici. Se l'ECD apparteneva al recettore metabotropico del glutammato (mGluR) e il TMD e la regione C-terminale appartenevano al CaSR il recettore era attivato dal glutammato. Se l'ECD apparteneva al CaSR ed il TMD e la regione C-terminale ad mGluR il recettore veniva attivato solo dal Ca^{2+} (⁸⁰). I residui responsabili del legame con il calcio sono le serine 147 e 170 (⁸¹), ma studi di cristallografia hanno dimostrato che sono coinvolti anche la treonina 138 e il glutammato 297. Sulla base del coefficiente di Hill, cioè l'indice di cooperatività tra ligando e recettore (che è 3 per il Ca^{2+}), sarebbero almeno tre i siti di legame per il Ca^{2+} (⁸²). Altri ligandi, come le poliamine, sembrano interagire con la regione ECD del CaSR, mentre gli ioni trivalenti, come il gadolinio, si legano sia al ECD che al TMD (Figura 6).

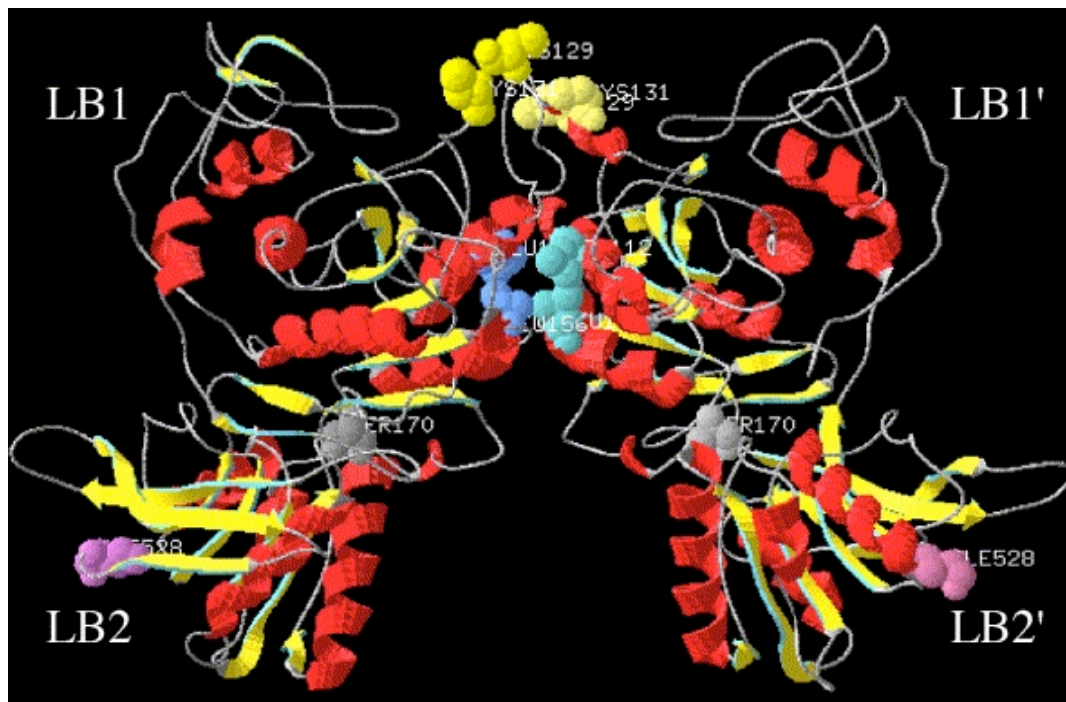


Figura 6: modello molecolare della struttura dimerica dei domini ECD del CaSR. Ogni dominio ECD è costituito da due lobi (LB1 e LB2). Nel primo lobo sono indicati i residui di cisteina 129 e 131 (sfere in giallo) e i residui di leucina 112 e 156 (sfere azzurre) responsabili della formazione dei ponti di solfuro. Nel secondo lobo l'immagine mostra le serine 170 (sfere grigie) tra i residui coinvolti nel legame del calcio. In rosa è indicato l'ultimo residuo del ECD. Figura da Bai M, *Cell Calcium*, 2004 (58).

Tra il VFT e l'inizio del TMD il CaSR ha una regione ricca in cisteine. In questa regione 9 cisteine sono conservate, se una di queste è mutata l'espressione e la funzione del CaSR sono state osservate ridotte⁽⁸³⁾. La regione ricca in cisteine è connessa al TMD attraverso un peptide linker di 14 amminoacidi che è stato ritrovato in tutti i componenti della famiglia C dei recettori accoppiati a proteine G. Il peptide linker sembra essere importante sia nella trasmissione del segnale che nell'interazione tra l'ECD ed il TMD⁽⁸⁴⁾.

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 intracellulari dall'altra. I loop esterni "e2" ed "e3" sono siti di legame per gli agonisti come le fenil-alchilamine^(85,86,87,88), mentre i loop interni "i1", "i2" e "i3" sono siti di contatto con le G-protein, PKC e PLC, che sono i primi anelli della catena di segnalazione del CaSR^(89,90).

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 traduzione del segnale: le mutagenesi a carico di alcuni di questi residui risultavano in una mancata risposta al calcio esterno^(91,92,93). La proteina tronca al residuo 888 non è più in grado di attivare il pathway della PKC

(^{94,95}). Sono 5 i siti di fosforilazione mediata dalla PKC; 3 sono posti sulla coda C-terminale, al residuo 888, 895 e 915; 2 nei loop intracellulari del TMD (⁹⁶). Inoltre sono presenti due siti di fosforilazione mediata dalla PKA (Ser-899 e Ser-900) la cui funzione rimane ancora poco chiara. La coda citoplasmatica del CaSR interagisce direttamente anche con una proteina del citoscheletro, la filamina A, coinvolta nell'attivazione delle MAPs kinasi nel pathway del recettore (^{97,98}) (Figura 7).

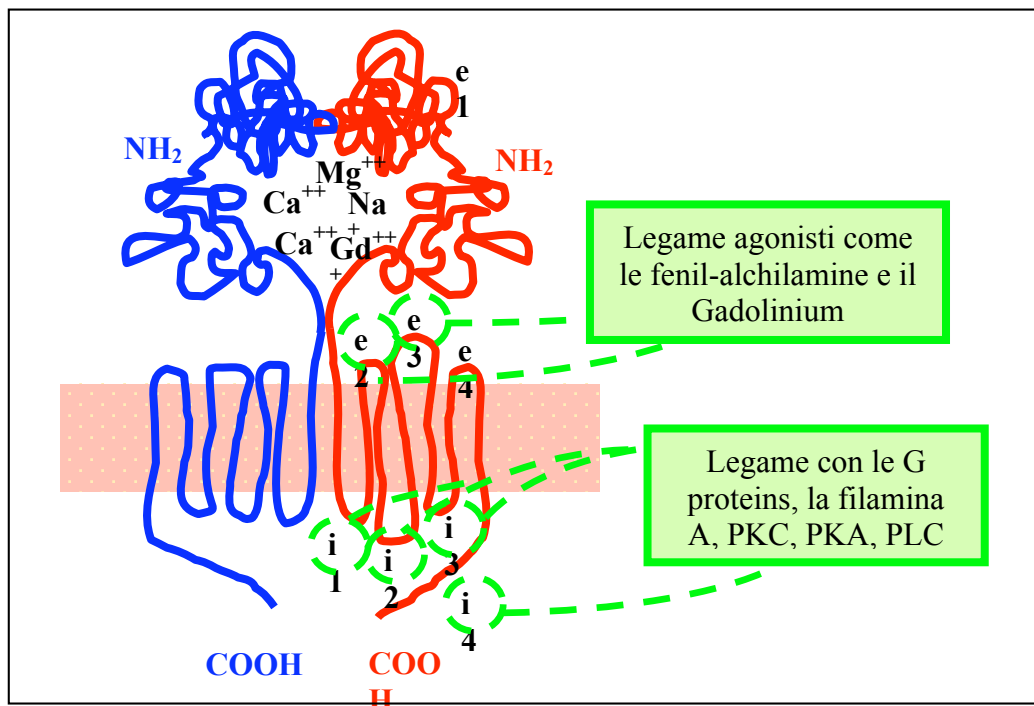


Figura 7: la figura mostra alcuni dei siti funzionali del TMD e del dominio C-terminale: in particolare i loop esterni (e2-4) del TMD, siti di legame per gli agonisti del recettore e i loop interni (i1-4) del TMD e del dominio C-terminale, siti di legame degli effettori della trasduzione del segnale del recettore.

2.5 Pathway di segnalazione del CaSR

Il legame del ligando nel dominio N-terminale, innesca l'attivazione di una complessa cascata di eventi non ancora ben definita in tutti i dettagli, ma che ha come effetto immediato la liberazione di calcio intracellulare ($[Ca^{2+}]_i$) dagli stores. Il CaSR, essendo un GPCR, attiva questa cascata attraverso le G-protein e in particolare attraverso le $G_{q/11}$, G_i e $G_{12/13}$ (⁹⁹), ma data l'ampia gamma di G-protein esistenti nel genoma umano, gli studi di interazione CaSR-G-protein sono ancora in corso. I siti di riconoscimento per le G-protein sono nel dominio C-terminale e nei loop "i2" ed "i3" del TMD, infatti esperimenti di mutagenesi hanno dimostrato che difetti in queste regioni impediscono la trasmissione del segnale (¹⁰⁰).

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) (¹⁰¹), enzimi responsabili dell'idrolisi dei fosfolipidi di

membrana. La PLC, attivata attraverso le $G_{q/11}$, idrolizza il fosfatidil-inositolo bi-fosfato (PIP_2) in inositolo tri-fosfato (IP_3) e diacil-glicerolo (DAG). L' IP_3 si lega ai suoi recettori sul reticolo endoplasmatico e porta all'apertura dei canali di calcio con conseguente liberazione del Ca^{2+} dalle sedi di accumulo intracellulari nel citoplasma, il DAG invece attiva la protein kinasi C (PKC). Il PIP_2 viene riformato ad opera della fosfatidil-inositolo 4-kinasi (PI-4K) che risulta essere più attiva dopo la stimolazione del CaSR e che sembra interagire con il CaSR attraverso le $G_{12/13}$ Rho-dipendenti (¹⁰²). La PLA_2 causa la liberazione di acido arachidonico (AA) dai fosfolipidi di membrana, sempre attraverso la proteina G_q . L'aumento di calcio extracellulare, infine, attiva la PLD, che produce acido fosfatidico dai fosfolipidi, anche essa attraverso le $G_{12/13}$ Rho-dipendenti.

La catena delle mitogen-activated protein kinases (MAPKs) viene innescata dall'attivazione della proteina a basso peso molecolare p21 Ras (^{103, 104}) e attraverso fosforilazioni a catena determina l'attivazione di ERK, p38 e JNK. L'attivazione di ERK è molto complessa, coinvolge sia le $G_{q/11}$ che le G_i , altre kinasi (PI_3 -kinasi e Akt) e altre proteine come la filamina-A, ma molto rimane ancora da chiarire. L'attivazione di p38 e JNK sembra essere legata al meccanismo di secrezione del PTH (^{105, 106}).

La G_i -protein inibisce l'adenilato ciclasi (AC) e quindi la produzione di AMP ciclico (cAMP). La PKA sembra coinvolta a questo livello della segnalazione, infatti la sua attivazione è cAMP-dipendente (¹⁰⁷). Il ruolo di PKA nel pathway del CaSR è poco chiaro. Non sembra partecipare alla segnalazione dell' IP_3 che conduce alla liberazione di calcio intracellulare, ma al contrario, potrebbe desensibilizzare la segnalazione dell' IP_3 con un effetto opposto a quello di PKC. Come vedremo in seguito, questo è uno dei meccanismi coinvolti nella regolazione del riassorbimento tubulare nel rene da parte del CaSR.

La PKC, attivata dal DAG, svolge molti ruoli nel pathway del CaSR. Nel versante citoplasmatico del recettore ci sono 5 siti per PKC, 2 nei loops del TMD e 3 nella coda C-terminale. Tra questi siti l'interazione con il residuo 888 è fondamentale e sembra che attraverso esso PKC svolga un controllo a feed-back negativo sull'attività del recettore. PKC potrebbe essere anche coinvolta nell'attivazione di PLA_2 e PLD, che avverrebbe in maniera indiretta dopo l'attivazione di PLC. Inoltre la PKC sembra ridurre la concentrazione di $[Ca^{2+}]_i$ accelerando la fuoriuscita di $[Ca^{2+}]_i$ dalla cellula (¹⁰⁸) e sembra inibire la formazione delle oscillazioni di calcio (^{109, 110}), anche se a riguardo ci sono opinioni contrastanti (¹¹¹).

Le oscillazioni di calcio intracellulare sono un fenomeno successivo all'attivazione del recettore già a basse concentrazioni di calcio esterno (0.5 mM), che si presentano come continue variazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]_i$, come una sequenza di picchi con una frequenza di 40-50 secondi tra uno e l'altro. Anche la stimolazione del recettore con agonisti del calcio determina questo fenomeno e la frequenza delle oscillazioni sembra legata alla concentrazione del ligando (¹¹²). Molte ipotesi sono state fatte sul meccanismo di generazione delle oscillazioni, studi di delezione del recettore hanno dimostrato che i residui 868-886 sono fondamentali per la loro formazione, ma non interferiscono con la risposta del recettore al suo ligando. La fosforilazione del CaSR da parte

di PKC sembra quindi ridurre il fenomeno delle oscillazioni, da una parte bloccando la segnalazione tra il recettore e la PLC che riduce la produzione di IP₃ e la fuoriuscita di calcio dagli stores, dall'altra facendo aumentare l'estrusione del calcio dalla cellula. Altri studi eseguiti con l'utilizzo di inibitori specifici delle protein kinasi sembrano negare il coinvolgimento di PKC nella formazione delle oscillazioni di calcio. In particolare, se il recettore è stimolato da aminoacidi aromatici (calcio agonisti), la formazione di oscillazioni risulta non essere PKC-dipendente, ma si innesca attraverso una diversa G-protein (G₁₂) e attraverso la filamina-A e la GTPasi Rho (¹¹³). I cambiamenti oscillatori di [Ca²⁺]_i in risposta alla stimolazione di recettori sono un meccanismo fondamentale di segnalazione cellulare sia nelle cellule eccitabili che non-eccitabili, che può proteggerle dagli effetti citotossici di una prolungata esposizione ad alti livelli di [Ca²⁺]_i.

Oltre alle G-protein ci sono altre proteine che legandosi al CaSR giocano un ruolo nella segnalazione da esso innescata: la filamina A, proteina del citoscheletro associata all'actina, si lega al CaSR nella sua coda citoplasmatica (residui 972-997). La filamina A interagisce con numerosissime proteine tra le quali vi sono MAPKs come le ERK1/2, p38 e JNK e contribuisce così all'attivazione delle MAPKs da parte del CaSR. La filamina A colocalizza con il CaSR nelle caveole della membrana plasmatica. Queste invaginazioni della membrana sono dei siti specializzati che facilitano il cross-talking per la segnalazione cellulare, infatti sono ricche di proteine di signalling e di proteine strutturali specializzate, come la caveolina-1. La caveolina-1 interagisce con la segnalazione dei GPCRs tra cui lo stesso CaSR (¹¹⁴) e con la filamina A (¹¹⁵). È stata dimostrata anche la presenza di calpaina nelle caveole, una proteasi calcio-dipendente (¹¹⁶) che sembra clivare il CaSR a livello del ECD inattivandolo. Si può quindi ipotizzare anche il coinvolgimento della calpaina nel meccanismo di regolazione del recettore del calcio (¹¹⁷) (Figura 8).

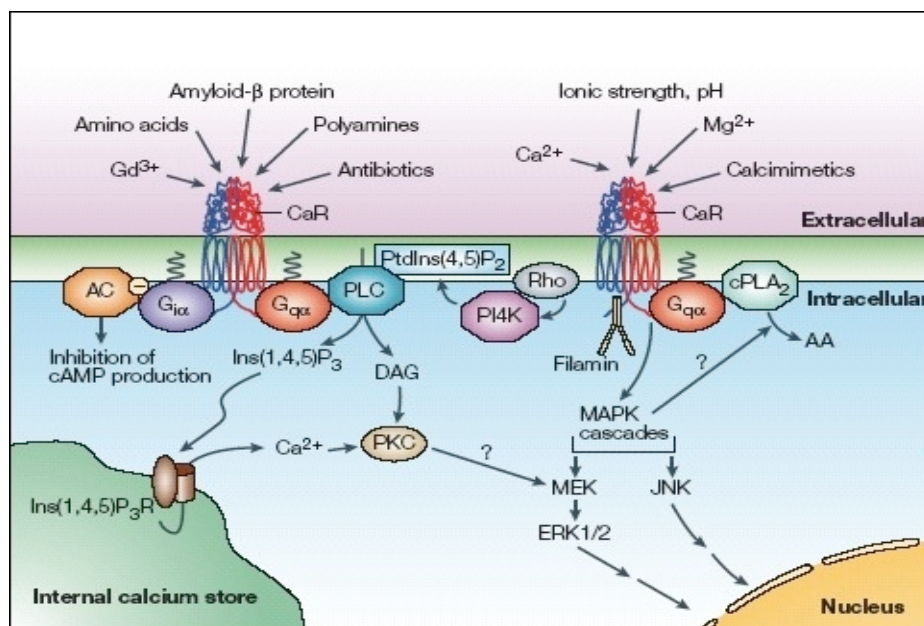


Figura 8. rappresentazione schematica della traduzione del segnale del CaSR. Figura da Hofer AM et al., Nature Rev Mol Cell Bio, 2003.

2.6 Agonisti del CaSR

Il calcio sembra essere un agonista non particolarmente potente del CaSR, visto che per produrre una attivazione emimassimale del recettore è richiesta una concentrazione di 3.5 mM, mentre la sua concentrazione fisiologica è generalmente attorno a 1.3 mM. Tuttavia, il legame del calcio al recettore è un processo altamente cooperativo (coefficiente di Hill ~3) (¹¹⁸), il quale permette al CaSR di funzionare come un sensibile rivelatore degli incrementi e decrementi del Ca^{2+} extracellulare. Il CaSR può riconoscere facilmente piccole fluttuazioni (~200 mM) nella $[\text{Ca}^{2+}]$ extracellulare e questo permette di regolare precisamente la calcemia attraverso meccanismi di feedback che agiscono sulla secrezione di PTH, sul riassorbimento tubulare renale di Ca^{2+} , sull'assorbimento intestinale di Ca^{2+} , ed altri fenomeni dell'omeostasi calcica.

Il CaSR non è attivato solo dal Ca^{2+} , ma anche da una serie di molecole, ioniche e non, che sono state divise in due classi. Gli agonisti di tipo I mimano l'azione del Ca^{2+} , attivando il CaSR anche in sua assenza. Fanno parte di questa categoria i cationi bivalenti (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}), o trivalenti (Gd^{3+}), le proteine policationiche (poliarginina) e gli antibiotici policationici (neomicina, gentamicina). Gli agonisti di tipo II sono agonisti allosterici, cioè agiscono solo in presenza di Ca^{2+} , del quale modificano l'affinità al recettore. Vengono chiamati calciomimetici e calciolitici in base al fatto che aumentino o diminuiscano l'affinità del CaSR al Ca^{2+} . Sono calciomimetici naturali di tipo II le sostanze policationiche quali le poliamine (spermina, spermidina) e l'amiloide, gli aminoacidi aromatici, e le fenilalchilamine dalle quali sono stati poi prodotti i farmaci attivi sul CaSR (NPS R-568, CinacalcetTM). Il sito di legame per i vari tipi di agonisti è diverso, la classe I si lega nel ECD, mentre nella classe II poliamine e aminoacidi si legano nel ECD e le fenilalchilamine hanno i siti nei loop "i2" e "i3" del TMD (^{119, 120, 121}).

Il Mg^{2+} è un agonista di tipo I e può sostituirsi al Ca^{2+} ma la sua attività è due, tre volte meno specifica del Ca^{2+} e ciò produce, alle stesse concentrazioni, un minore incremento di $[\text{Ca}^{2+}]$. In alcuni segmenti tubulari tuttavia questa capacità potrebbe risultare molto rilevante, come nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. La concentrazione di Mg^{2+} nel fluido che arriva all'ansa è quasi doppia rispetto al filtrato perchè nel tubulo prossimale il Mg^{2+} è meno riassorbito rispetto al Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e acqua. In aggiunta al Mg^{2+} altri ioni metallici divalenti e trivalenti possono attivare il CaSR quali La^{3+} , Gd^{3+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} e Pb^{2+} . Alcuni antibiotici quali neomicina, gentamicina e streptomina possono significativamente attivare il CaSR, questa caratteristica fa supporre che il recettore possa essere coinvolto nella mediazione degli effetti nefrotossici degli antibiotici nel tubulo renale.

La spermina è una poliamina (agonista di classe II) che a concentrazioni di 1-100 mM attiva la cascata del CaSR grazie alle cariche positive che possiede. I policationi che attivano il recettore lo fanno con un ordine di potenza che è proporzionale al numero di cariche che hanno: la spermina è il più forte avendo 4 cariche, seguono la spermidina con 3 e la putrescina con 2. La sensibilità del

recettore a queste molecole può avere un significato funzionale, data la presenza di spermina in alcuni compartimenti specifici come il tratto gastro-intestinale e il cervello.

Gli aminoacidi aromatici stimolano il recettore sia in presenza che in assenza di Ca^{2+} supportando così l'idea che il CaSR, espresso nel tratto gastro-intestinale, possa mediare l'effetto calciurico dell'intake dietetico di proteine e più in generale controllare la digestione, l'assorbimento, l'appetito e l'intero metabolismo del corpo (^{122, 123}).

La concentrazione salina è un altro dei fattori che modificano la funzione del recettore: l'aumento della forza ionica riduce la sensibilità del recettore. Questo è un fenomeno che risulta rilevante in tessuti come il rene e il gastrointestinale dove la concentrazione luminale del NaCl aumenta notevolmente. Allo stesso modo in questi tessuti variazioni nel pH extracellulare causano variazioni nella risposta del CaSR al Ca^{2+} (¹²⁴).

Tra le poliamine naturali, la fenilalchilamina è stata modificata per produrre dei farmaci calciomimetici, attivatori allosterici del CaSR (NPS R-568, NPS R-467, AMG-641) o calciolitici, inibitori del CaSR (NPS R-2143) (^{125, 126}); i primi sono utilizzati nella pratica clinica per la cura dell'iperparatiroidismo primitivo o secondario, i secondi non sono ancora stati introdotti nella pratica clinica ma potrebbero avere una potenzialità nella cura delle patologie con calcificazioni dei tessuti molli (calcolosi renale e calcificazioni vascolari).

2.7 Il CaSR e l'omeostasi del calcio

Il Ca^{2+} è un elemento chiave nell'omeostasi dell'organismo: nel microambiente, senza richiedere alcun tipo di sintesi intracellulare, funziona come il più semplice secondo messaggero e come cofattore di 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. Sia la concentrazione extracellulare sia quella intracellulare del Ca^{2+} sono strettamente regolate dal suo trasporto bidirezionale attraverso la membrana plasmatica delle cellule e dalle membrane degli organuli intracellulari come il reticolo endoplasmatico, il reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari e i mitocondri. Poiché il Ca^{2+} è presente nel citosol in concentrazioni così basse, esso è straordinariamente adatto ad agire come secondo messaggero intracellulare. Nel muscolo scheletrico interazioni fra il Ca^{2+} e le proteine leganti il Ca^{2+} , quali troponina C e calmodulina, danno inizio alla contrazione muscolare. Anche l'accoppiamento eccitazione-contrazione della muscolatura cardiaca e in quella liscia è Ca^{2+} -dipendente.

Responsabile della fine regolazione è l'asse calcitonina-PTH-vitamina D che mantiene questo equilibrio coordinando l'azione degli organi coinvolti nell'omeostasi del Ca^{2+} : paratiroidi, tiroide, reni, ossa e apparato gastro-intestinale. La capacità di questi organi di sentire minime variazioni di Ca^{2+} fa in modo che, nell'organismo umano, il coefficiente di variazione del Ca^{2+} plasmatico ionizzato sia circa del 2%. In caso di riduzione di Ca^{2+} plasmatico (ipocalcemia), si attiva la secrezione paratiroidea di PTH che stimola il riassorbimento tubulare di Ca^{2+} dal rene e il

riassorbimento osseo insieme con la produzione renale della forma attiva di vitamina D [1,25(OH)₂D₃] che stimola l'assorbimento intestinale. Al contrario, nel caso in cui si verifichi un aumento di Ca²⁺ plasmatico (ipercalcemia), la tiroide secreta calcitonina che ne riduce i livelli, inibendo il riassorbimento osseo ed accelerando l'escrezione urinaria di Ca²⁺ mentre la secrezione di paratormone viene inibita. Negli ultimi anni è stato sorprendente scoprire che il recettore non è espresso solo negli organi che sentono le variazioni di Ca²⁺ e secernono gli ormoni calciotropici (paratiroidi e tiroide), ma anche negli organi bersaglio di questi ormoni (rene, osso, intestino). Il CaSR è coinvolto anche nella regolazione dell'omeostasi del Mg²⁺, che è un suo agonista, anche se con una forza inferiore al Ca²⁺: 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. Tutte queste funzioni fanno pensare al recettore del Ca²⁺ 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 9).

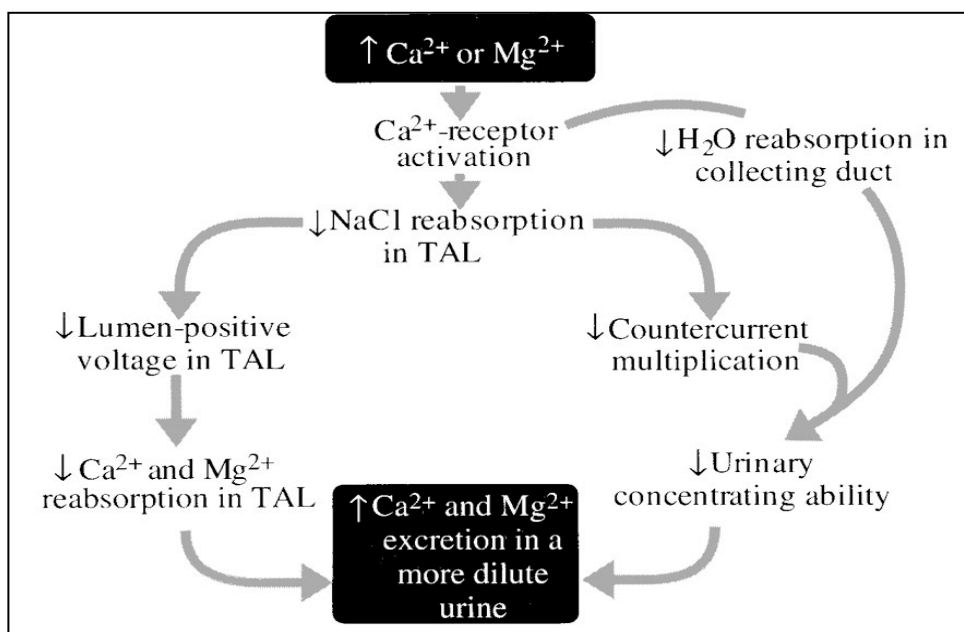


Figura 9: schematizzazione dell'azione del CaSR a livello renale per la regolazione dell'omeostasi del calcio, del magnesio e dell'acqua.

2.8 Espressione tissutale del CaSR

1) Paratiroide

Anche se il preciso meccanismo rimane ancora sconosciuto, un largo numero di studi ha chiaramente dimostrato il ruolo centrale del CaSR nella sintesi e nella regolazione della secrezione di PTH. L'aumento del calcio extracellulare viene sentito dal CaSR presente sulla membrana plasmatica delle paratiroidi, il recettore stimolato attiva il pathway di segnalazione del IP_3 con aumento della $[Ca^{2+}]_i$ ed inibizione della secrezione di PTH (Figura 10). Non è noto se il meccanismo d'inibizione agisca sul DNA bloccando la produzione del PTH o se blocchi la secrezione di ormone già formato contenuto nei granuli secretori (¹²⁷). La diminuzione del livello circolante di PTH porta ad un aumento dell'escrezione di Ca^{2+} , ad una riduzione dell'assorbimento intestinale e ad una minore liberazione di Ca^{2+} dalle riserve ossee (¹²⁸). Il CaSR modula anche la proliferazione delle cellule paratiroidee, riducendola in presenza di elevato Ca^{2+} extracellulare. In casi di mutazioni inattivanti il recettore, si possono verificare fenomeni di iperplasia ghiandolare (¹²⁹).

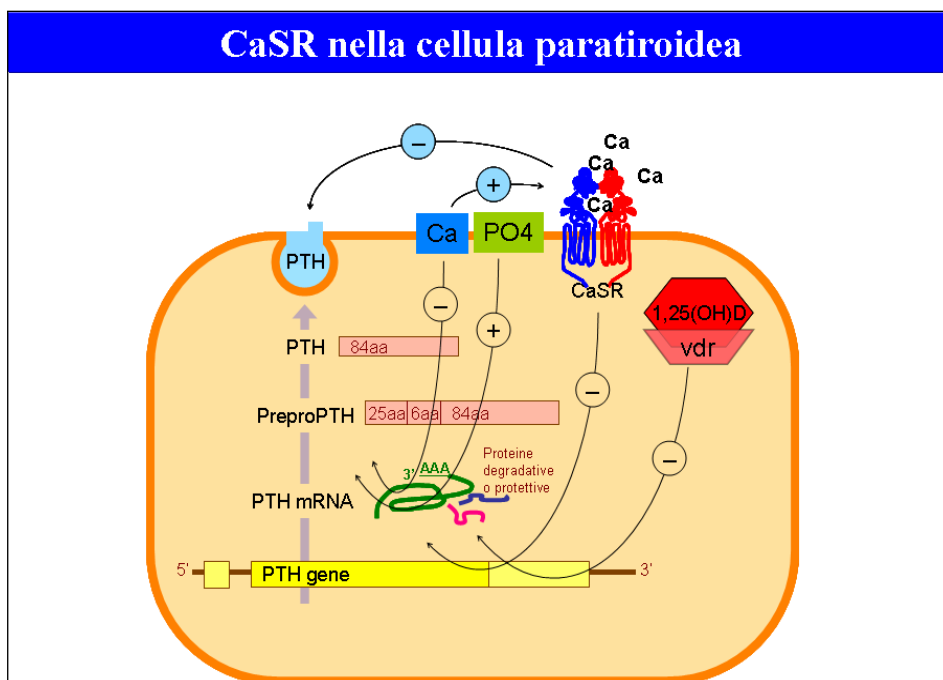


Figura 10: ruolo del CaSR nella secrezione e sintesi del PTH a livello della cellula paratiroidea. Il CaSR media l'inibizione della sintesi e secrezione del PTH prodotta dall'incremento della calcemia. La via usata come signalling cellulare è quella della fosfolipasi C che attiva la liberazione di IP_3 e DAG dai fosfolipidi. Gli IP_3 conducono alla liberazione di calcio dagli stores intracellulari, mentre il DAG attiva la PKC. Questi eventi consolidano l'effetto delle proteine protettive del mRNA del PTH, aumentando quindi la sintesi dell'ormone.

II) Tiroide

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 dei grossi influssi cellulari attraverso canali voltaggio-dipendenti, ma è stata dimostrata la presenza del CaSR su queste cellule (¹³⁰), anche se non tutti gli agonisti attivi nelle paratiroidi, agiscono sulla secrezione di calcitonina, per esempio il Mg^{2+} non ha nessun effetto (¹³¹). Il modello proposto è che il CaSR, attivato dall'aumento di calcio extracellulare, inneschi dei canali Na^+ - Ca^{2+} attraverso la via PLC-DAG-PKC. I canali porterebbero all'entrata di Na^+ e Ca^{2+} , producendo una depolarizzazione cellulare che attiverebbe i canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. L'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ porterebbe ad incremento della secrezione di calcitonina (¹³²) (Figura 11).

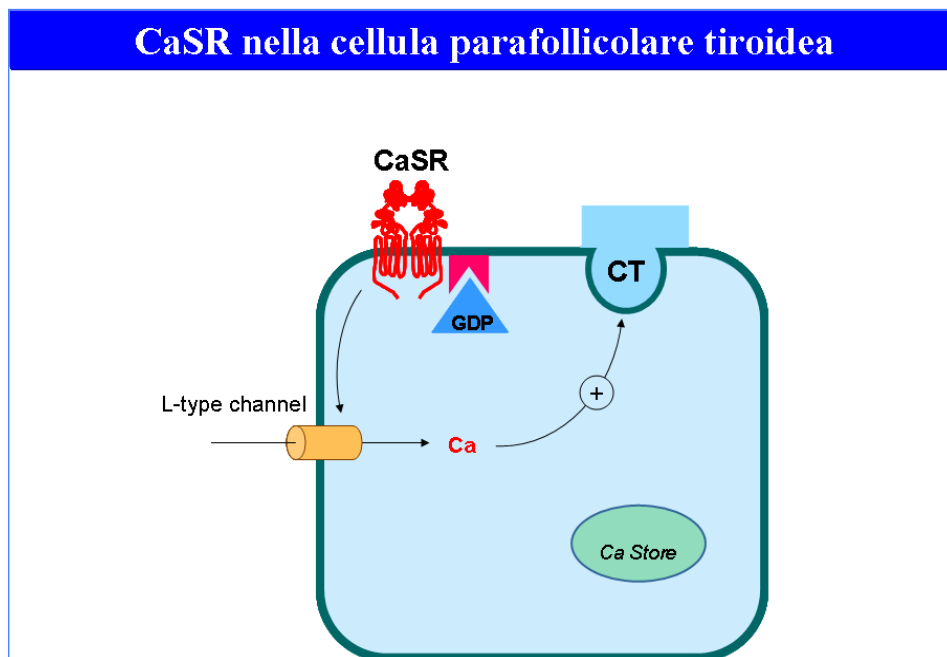


Figura 11: ruolo del CaSR nella secrezione di calcitonina a livello della cellula paratiroidea. La stimolazione del CaSR da parte del calcio extracellulare determina l'apertura di un canale L del calcio che è seguita dall'ingresso di ioni, alla quale poi consegue secrezione di calcitonina.

III) Rene

Cambiamenti nei valori di Ca^{2+} plasmatici alterano molti aspetti della funzionalità renale. Studi immunocistochemici usando anticorpi anti-CaSR hanno dimostrato che il CaSR è distribuito lungo tutto il nefrone e la polarizzazione appare segmento specifico (¹³³). Il recettore ha una posizione luminale nel tubulo prossimale e nel dotto collettore mentre ha una posizione basolaterale nel TAL

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. Le sue funzioni 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 tubolociti. 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 (¹³⁴). Il CaSR può inoltre produrre un effetto antifosfaturico attraverso la riduzione del PTH circolante. Il tubulo prossimale è anche la sede della sintesi di $1,25(OH)_2D_3$, 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 $1,25(OH)_2D_3$ (¹³⁵)(Figura 12a).

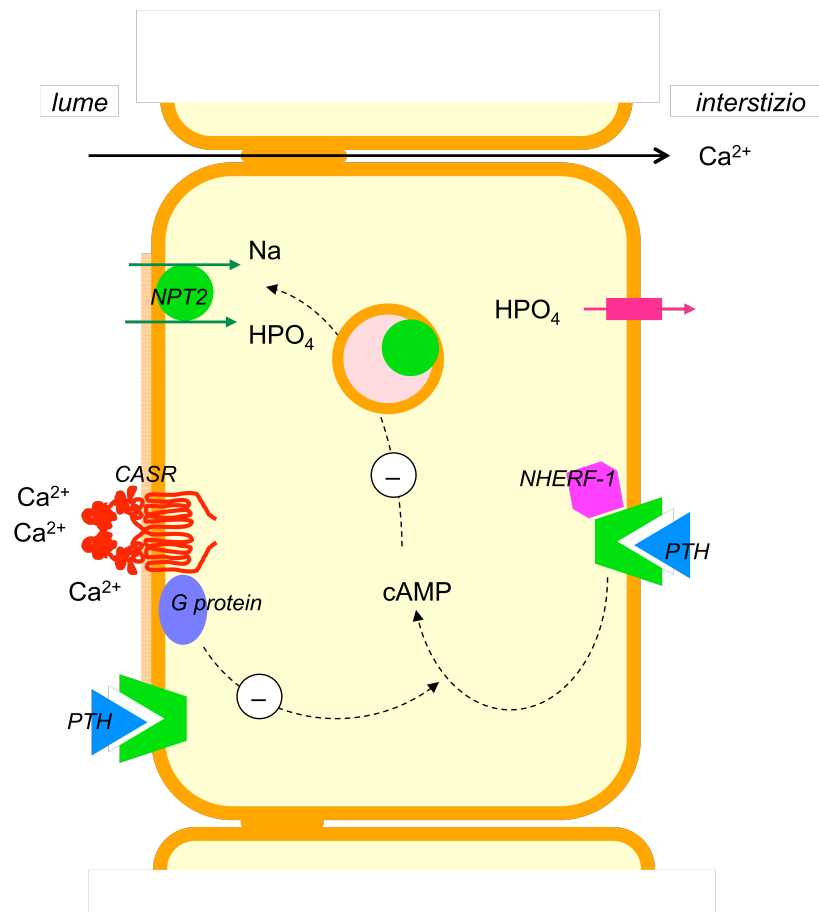


Figura 10a: ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo prossimale. La sua attivazione determina un aumento dell'espressione del trasportatore del fosfato (NPT2) cAMP-dipendente sulla membrana apicale del tubolocita che determinerà un maggiore riassorbimento di fosfato ed un effetto antifosfaturico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

Circa il 20-25% del Ca^{2+} è riassorbito nella corticale ma in misura minore anche nella midollare del tratto ascendente limbico dell'ansa di Henle. In questo tratto il CaSR è espresso sulla membrana

baso-laterale, dove controlla il riassorbimento dei minerali bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}) sia per via paracellulare che transcellulare. Per via paracellulare il riassorbimento avviene grazie al gradiente elettrico dovuto al voltaggio positivo del tubulo. Il cotrasporto $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) riassume Na^+ , K^+ e Cl^- dal lume tubulare. Di questi ioni il Na^+ e il Cl^- escono dalla cellula attraverso la membrana basolaterale grazie al canale per il Cl^- e alla pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ asica. Il K^+ viene riciclato anche grazie ai canali K^+ (ROMK) posti sulla membrana apicale del tubulocita. Questo fa sì che NKCC2 mantenga la sua funzione e che sia garantito un gradiente elettrico positivo. E' questo gradiente a permettere il passaggio degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} 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^+ (¹³⁶), dissipando il gradiente elettrico e sfavorendo così il riassorbimento di Na^+ e di Ca^{2+} (Figura 12b).

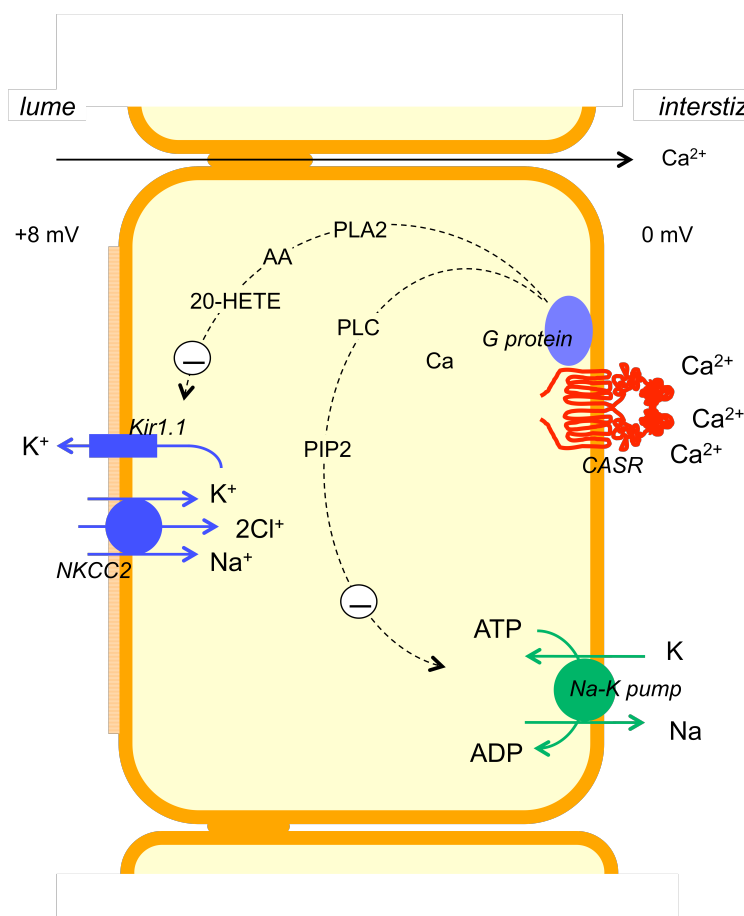


Figura 12b: ruolo fisiologico del CaSR a livello dell'ansa di Henle. A questo livello, il CaSR opera il riassorbimento dei minerali bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}) che avviene per lo più per via paracellulare grazie al gradiente elettrico dovuto al voltaggio positivo del tubulo. Gli aumenti nel calcio 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 lisosomale della claudina-16 (CLDN-16). La CLDN-16 è un componente delle giunzioni strette che

aumenta il riassorbimento di Ca^{2+} che di Mg^{2+} per via paracellulare (¹³⁷). L'attivazione del CaSR impedendo l'esposizione della CLDN-16 nelle giunzioni strette contribuisce alla riduzione del riassorbimento di Ca^{2+} e Mg^{2+} (¹³⁸) (Figura 12c).

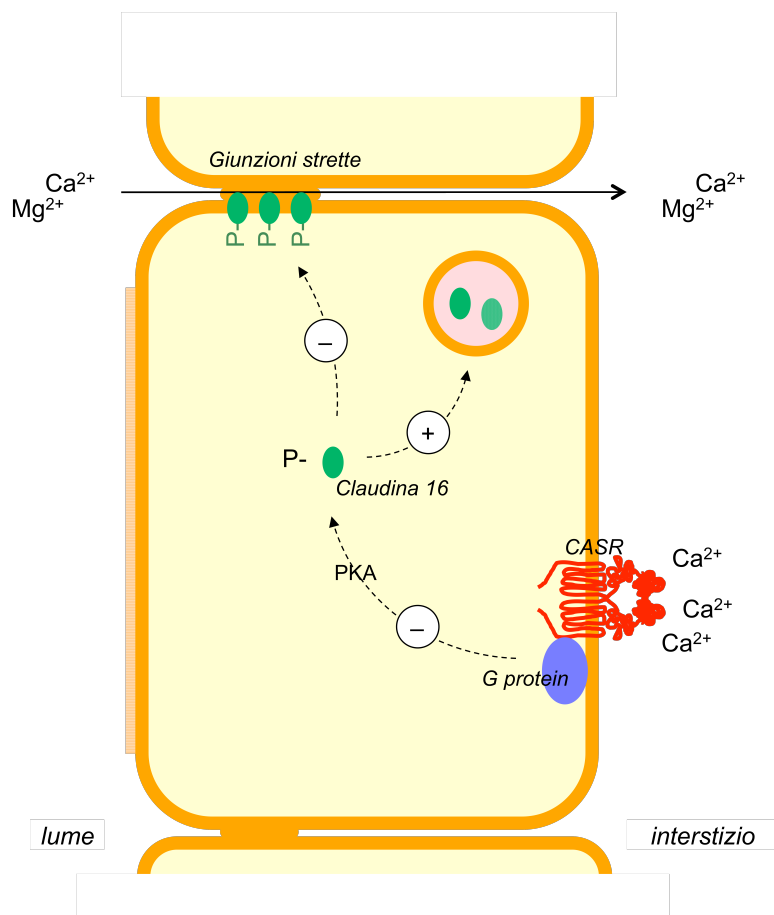


Figura 12c: ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo convoluto. L'attivazione del CaSR impedisce l'esposizione della CLDN-16 a livello delle giunzioni strette diminuendo il riassorbimento paracellulare di Ca^{2+} .

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 (¹³⁹), e estruso nell'interstizio dallo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ e dalla pompa Ca^{2+} -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 12d). 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 (¹⁴⁰) (Figura 12e).

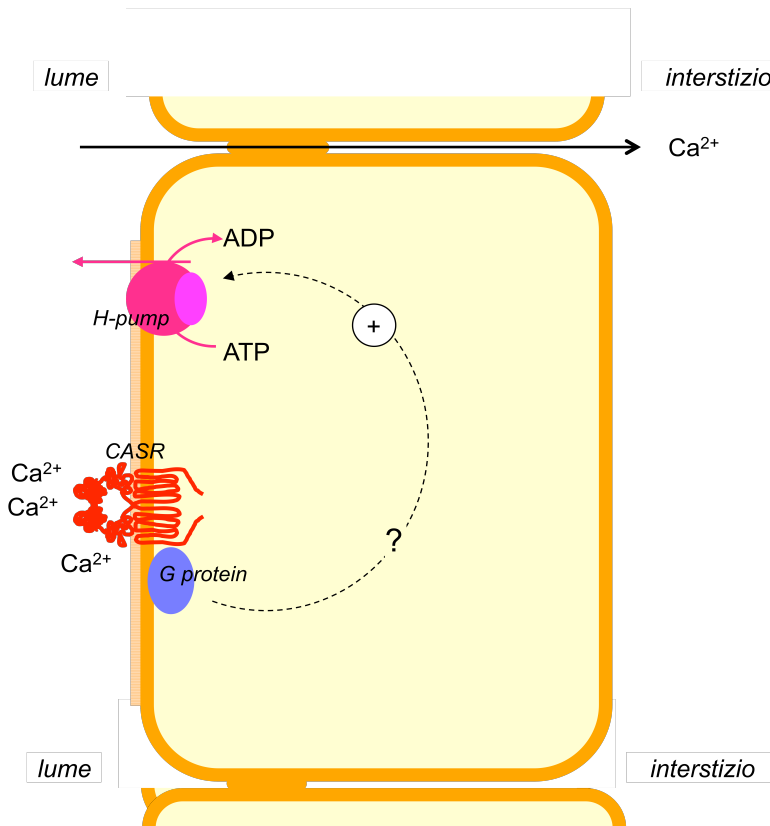


Figura 12d: ruolo del CaSR nel dotto collettore. In questa sede il CaSR attiva la pompa idrogenionica ATP-dipendente con un effetto finale di acidificazione urinaria.

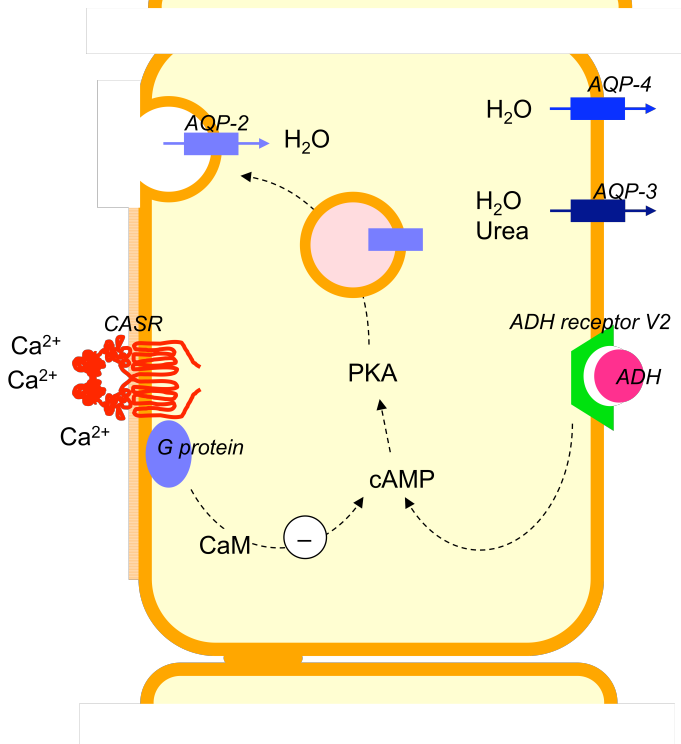


Figura 12e: ruolo fisiologico del CaSR a livello del tubulo collettore. Il CaSR attivato inibisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana apicale, interferendo a livello della via del cAMP e generando perciò un effetto diuretico.

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 13). 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- κ B⁽¹⁴¹⁾. 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 Ca²⁺ è importante per assicurare una corretta crescita e differenziamento della cartilagine in tessuto osseo⁽¹⁴²⁾.

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^(143, 144).

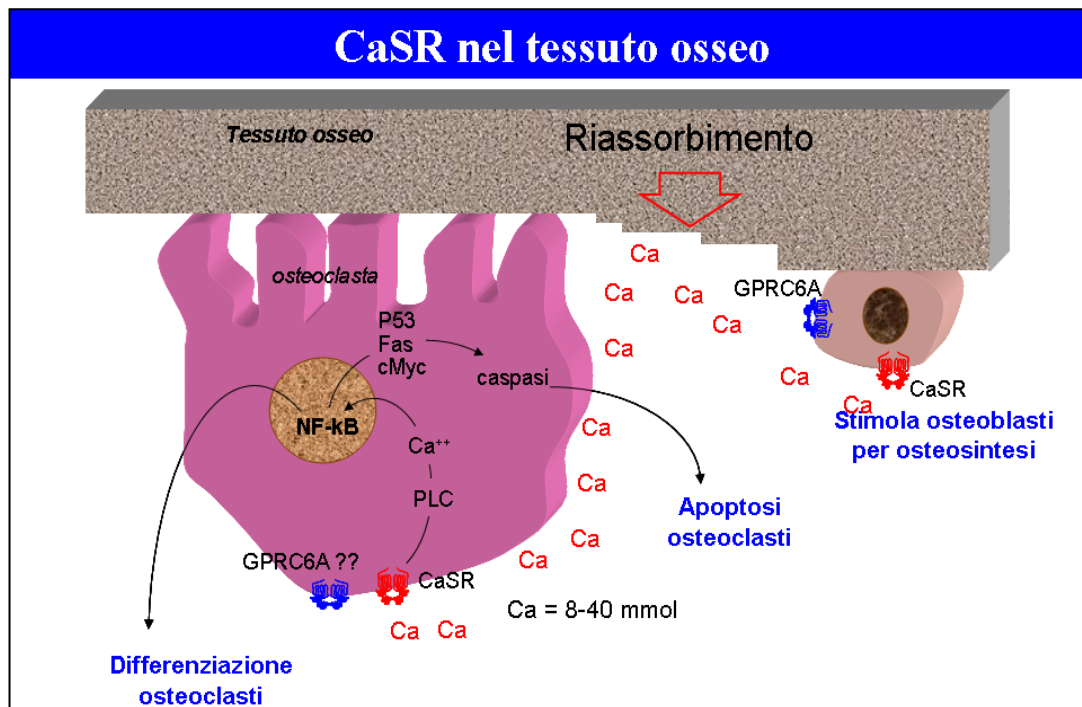


Figura 13: espressione del CaSR a livello del tessuto osseo. L'osteoclasta riceve stimoli in senso apoptotico quando la concentrazione dello ione calcio si eleva e il meccanismo sembra essere mediato dall'attivazione della PLC e la traslocazione nel nucleo di NF- κ B. Il recettore del calcio è espresso anche a livello

osteoblastico, dove la presenza dello ione e i suoi aumenti di concentrazione sembrerebbero indurre uno stimolo alla proliferazione.

V) *Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio*

Il CaSR è espresso anche in numerosi tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio, come il sistema nervoso centrale, il cristallino oculare, il midollo osseo e alcune cellule del sangue, lo stomaco, il pancreas e cheratinociti, tanto che qualche autore inizia a definire il CaSR un gene ubiquitario.

Il recettore è presente in numerosi compartimenti del sistema nervoso centrale, nell'ippocampo, nel cervelletto, nei bulbi olfattivi, dove potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di rilascio dei neurotrasmettitori e nella regolazione dei canali cationici non-selettivi, determinando la depolarizzazione e l'eccitabilità dei neuroni (^{145, 146}). La sensibilità del recettore alle poliamine, come spermina e spermidina, potrebbe lasciar presupporre che il cervello utilizzi questi agonisti per stimolare il recettore.

È stata evidenziata l'espressione del CaSR anche nell'epitelio del cristallino, dove il CaSR modulerebbe l'attività dei canali per il K^+ , giocando così un ruolo nell'omeostasi ionica della lente (¹⁴⁷).

Molte cellule del midollo osseo esprimono il CaSR, inclusi i megacariociti, i precursori della linea eritroide e i precursori della linea mieloide. Tra le cellule mature del sangue, il recettore è presente però solo sui monociti e sulle piastrine, scomparendo negli eritrociti e nei linfociti. Probabilmente la presenza del recettore partecipa alla formazione delle colonie midollari dei precursori degli elementi maturi mediante il controllo del traffico cellulare tra il midollo osseo e il sangue periferico, meccanismi che sono influenzati dalla concentrazione di calcio esterno (¹⁴⁸). I monociti maturi, invece, sembrano utilizzare i meccanismi di controllo del calcio esterno per la secrezione delle citochine, la modulazione della proliferazione e la chemiotassi (¹⁴⁹).

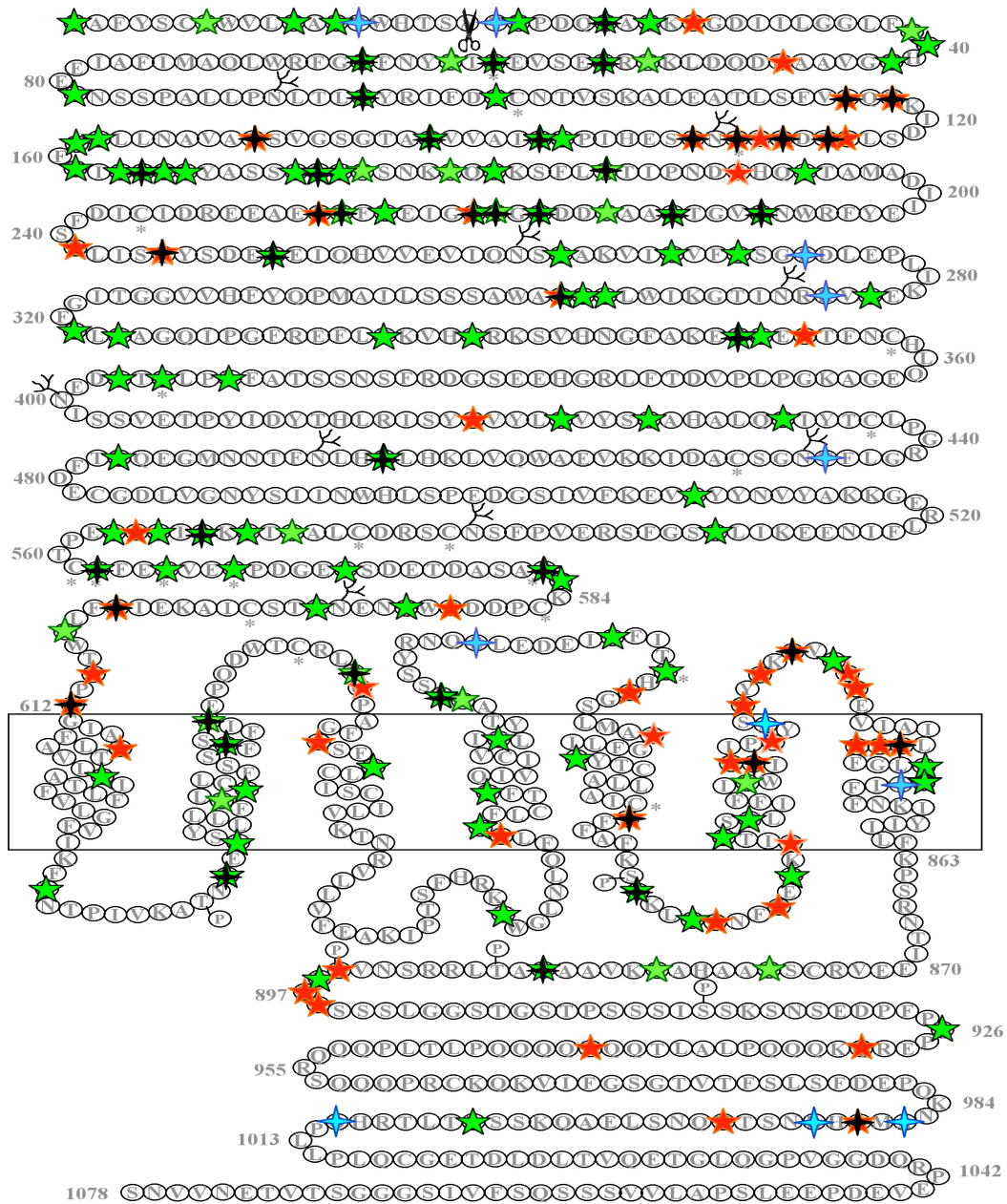
Il CaSR è presente lungo tutto l'apparato gastro-intestinale. Nello stomaco il calcio esterno stimola la secrezione di acido dalle ghiandole gastriche e di bicarbonato dalle cellule parietali che producono la mucosa protettiva. Quindi il recettore è coinvolto sia nella secrezione dell'acido, che nella protezione della mucosa gastrica (¹⁵⁰). Nel pancreas il CaSR regola la secrezione di bicarbonato e nelle isole di Langerhans, sembra essere coinvolto nella secrezione degli ormoni che regolano la glicemia (43). Nel colon sembra invece coinvolto nel riassorbimento del sodio e dei fluidi, riuscendo ad inibire l'azione secretiva dei fluidi da parte di cAMP e cGMP.

2.9 Fisiopatologia del CaSR: malattie monogeniche correlate

Il sequenziamento del gene CaSR avvenuto nel 1993 ha permesso la conoscenza delle basi molecolari di alcuni tipi di patologie ereditarie caratterizzate, fino ad allora, da un'enigmatica alterazione dell'omeostasi calcica. Il substrato che sottende a tutte queste condizioni risiede in mutazioni del recettore del calcio.

La maggior parte delle mutazioni sono state riscontrate nel ECD, che 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 o una diminuzione di funzione, o attivanti, dove si verifica un'ipersensibilizzazione

Le mutazioni inattivanti il CaSR sono spesso ritrovate in due tipi di patologia: l'ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) e l'iperparatiroidismo severo neonatale (NSHPT), mentre le mutazioni attivanti del recettore causano l'ipercalcemia autosomica dominante (ADH), che talora può essere associata alla sindrome di Bartter tipo V (^{151,152,153,154}) (Figure 14 e 15).



- ★ Activating mutation
- ★ Activating mutations at one site
- ★ Inactivating mutation
- ★ Inactivating mutations at one site
- ★ Activating and inactivating mutations at one site
- ★ Polymorphism
- ✂ Cleavage of the signal sequence
- * Conserved cysteine
- ⋈ N-glycosylation
- Ⓟ PKC site

(Original figure: L. D'Souza-Li)

Figura 15: rappresentazione schematica della sequenza aminoacidica del CaSR con indicazione delle mutazioni note indicate dalle stelle. Immagine modificata presente sul sito: www.casrdb.mcgill.ca

La FHH è un disordine a carattere autosomico dominante, presente in eterozigosi nei pazienti. Le mutazioni hanno un effetto dominante-negativo sull'allele sano, perchè le molecole monomeriche mutate possono impedire la formazione di dimeri di CaSR ed influenzare le molecole normali che non riescono a sopperire da sole alle funzioni del recettore. La patologia è caratterizzata da lieve ipercalcemia ed ipermagnesemia, livelli normali o quasi di PTH e vitamina D, scarsa escrezione urinaria e normale assorbimento intestinale di Ca^{2+} . Il disordine è considerato benigno, generalmente i pazienti con FHH sono asintomatici e la malattia riscontrata casualmente. Possono comunque presentarsi condizioni morbose aggiuntive quali condrocalcinosi nell'età anziana, casi di pancreatite acuta e colelitiasi (¹⁵⁵). L'ipercalcemia è sostenuta da un aumentato riassorbimento tubulare di Ca^{2+} e da una secrezione inappropriatamente alta di PTH. La malattia viene inclusa negli iperparatiroidismi familiari insieme con la neoplasia endocrina multipla tipo 1, causata da mutazione del gene della menina, la sindrome da iperparatiroidismo associato al tumore della mandibola attribuita al gene parafibromina e l'iperparatiroidismo primitivo familiare. Alcuni soggetti vengono paratiroidectomizzati anche se in questi pazienti l'operazione chirurgica dovrebbe essere evitata perché il soggetto rimane ipercalcemico a causa del difetto genetico che continua ad influenzare il maggiore riassorbimento di Ca^{2+} urinario. Nelle famiglie affette si riscontra spesso un'associazione con la nefrolitiasi (¹⁵⁶).

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: ritardo di crescita, 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 a causa dei livelli elevati di calcemia (¹⁵⁷).

L'ADH è una malattia autosomica dominante, causata da mutazioni, usualmente in eterozigosi, del gene CaSR che aumentano il livello di sensibilizzazione del recettore, ovvero ne provocano un guadagno funzionale cosicché bastano minori concentrazioni di calcio extracellulare per attivarlo. Si tratta di una patologia che può palesarsi con diversi gradi di gravità e variabilità nei sintomi. Si manifesta con bassi livelli di calcemia, che può essere sintomatica per convulsioni e tetanie. Usualmente i sintomi si manifestano fin dai primi giorni di vita e possono sviluppare progressivamente deficit accrescitivo e nefrocalcinosi. In associazione all'ipocalcemia, si riscontra un'iperfosfatemia o valori di fosfato ai limiti superiori di norma ed un'ipomagnesemia. I livelli di PTH sono bassi, nelle forme più gravi il PTH è indosabile. L'ipercalciuria è notevole tanto che quest'ultima è stata proposta come criterio di differenza con le altre forme di ipoparatiroidismo idiopatico (^{158, 159}).

La sindrome di Bartter di tipo V si riscontra nei pazienti con ADH causata da mutazione attivanti del gene CaSR. Oltre ai sintomi della ADH, il fenotipo è caratterizzato dalla presenza dei sintomi classici della sindrome di Bartter, quali ipokaliemia, alcalosi metabolica, iper-reninemia e

iperaldosteronismo secondario. Anche in questo caso i sintomi possono essere di variabile intensità. Si manifesta a causa della inibizione del riassorbimento di Na^+ e Cl^- mediato da NKCC2 a livello del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle.

Accanto a questi due generi di mutazioni, sono state successivamente riconosciute condizioni di autoimmunità che, agendo sul CaSR, generano quadri fenotipici simili a quelli generati dalle mutazioni seppur in assenza di mutazioni genetiche. Anticorpi inattivanti diretti contro il CaSR causano Autoimmune Hypocalciuric Hypercalcemia (AHH) in cui i pazienti presentano ipocalciuria nonostante l'ipercalcemia quindi, gli anticorpi possono produrre un quadro clinico e biochimico simile alla FHH (¹⁶⁰). Al contrario alcuni anticorpi anti-CaSR, con meccanismi ancora sconosciuti, possono attivare il CaSR dando origine ad un quadro clinico simile all'ADH. Gli anticorpi sopprimono la secrezione di PTH, ciò dà origine ad individui con un marcato ipoparatiroidismo (¹⁶¹). La definizione della corretta patogenesi delle condizioni legate alla presenza di autoanticorpi diretti contro il CaSR necessita 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.

2.10 Il CaSR nelle malattie complesse acquisite

Le patologie acquisite su cui più si indaga sul ruolo del CaSR sono le disfunzioni delle paratiroidi quali l'iperparatiroidismo primario e secondario.

L'iperparatiroidismo primario (PHPT) è un disordine endocrino generato nella maggior parte dei casi da tumori singoli a carico di una ghiandola paratiroidea. I pazienti affetti da questa malattia presentano un'ipersecrezione di PTH, una conseguente ipercalcemia e modificazioni del turnover osseo, con riduzione della densità ossea stessa. Molti soggetti iperparatiroidici sono inoltre 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 (¹⁶², ¹⁶³). E' stato 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 (¹⁶⁴). Altri studi condotti sulla relazione tra la proliferazione cellulare paratiroidea 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) (¹⁶⁵).

L'iperparatiroidismo secondario (HPT) si sviluppa nel corso di insufficienza renale cronica, a seguito di fenomeni tipici di questa condizione quali la ritenzione di fosfato, l'ipocalcemia e la riduzione della sintesi di $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Molti studi hanno riscontrato bassi livelli d'espressione del recettore nelle paratiroidi iperplastiche dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica fin dalle prime fasi di riduzione del filtrato glomerulare. I fenomeni di iperplasia delle ghiandole paratiroidi che si verificano nel corso di HPT sono legati al ruolo di controllo del recettore sulla proliferazione cellulare paratiroidea.

Il ruolo del CaSR nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare è alla base del coinvolgimento del recettore in alcuni tumori e, recentemente, è stato proposto anche per i modelli del meccanismo di metastatizzazione grazie al suo intervento nell'homing cellulare.

E' stato osservato che nell'adenocarcinoma del colon, il CaSR appare down-regolato in relazione diretta con il grado di differenziazione cellulare (¹⁶⁶). Il CaSR sembra infatti essere un segno di maturità e differenziazione delle cellule intestinali e la sua stimolazione da parte del Ca^{2+} si associa a quella di sostanze ad attività antiproliferative, come le proteine p21 e p27, la g-catenina e la E-caderina (¹⁶⁷, ¹⁶⁸).

Il CaSR è fisiologicamente coinvolto nella creazione della nicchia endostale delle cellule staminali ematopoietiche (HSC). Esso infatti stimola l'adesione delle HSC circolanti al collagene di tipo I e alla fibronectina dell'endostio, grazie alla elevata concentrazione di calcio nell'ambiente endo-osseo (5-40 mmol/l) che stimola il CaSR. Successivamente all'identificazione del sito di homing, la nicchia della HSC viene ad essere regolata dagli osteoblasti e dagli osteoclasti. Una simile sequenza di eventi potrebbe verificarsi nell'insediamento osseo delle cellule cancerose circolanti, dando così origine alle metastasi. Il CaSR potrebbe pertanto essere l'elemento cruciale nel processo di colonizzazione da parte dei secondarismi ossei. La sua espressione nel tumore primitivo è stata infatti associata alla capacità di generare metastasi da parte di linee cellulari di cancro prostatico e mammario (^{169,170}).

Il CaSR sembra anche avere un ruolo specifico nelle metastasi osteolitiche perché stimola, nelle cellule neoplastiche, la produzione del PTH-related peptide (PTHrP) che, attivando l'osteoclastogenesi, sostiene il riassorbimento e la lisi ossea e causa talvolta ipercalcemia (^{171,172,173}). Nel corso del riassorbimento vengono rilasciati dall'osso fattori di crescita quali il TGF β e l'IGF, che sostengono lo sviluppo locale delle cellule neoplastiche. Inoltre gli ioni Ca²⁺ liberati, attraverso il CaSR, stimolano la produzione di PTHrP (¹⁷⁴). Si realizza così il circolo vizioso delle metastasi ossee nel quale il PTHrP prodotto dalle cellule neoplastiche stimola l'osteolisi. Quest'ultima, attraverso la liberazione di fattori di crescita e Ca²⁺, stimola a sua volta lo sviluppo locale delle cellule neoplastiche a formare metastasi e la produzione ulteriore di PTHrP. Nel circolo vizioso il CaSR entra in gioco perché, in presenza di elevate concentrazioni di Ca²⁺ indotte dall'osteolisi, stimola la produzione di PTHrP con un feedback positivo (¹⁷⁵). Il gene del PTHrP è usualmente espresso solo nella vita fetale, ma viene ri-espresso nelle neoplasie.

Il CaSR può favorire lo sviluppo delle metastasi senza intervenire sulla produzione di PTHrP, ma grazie all'elevata concentrazione di calcio nell'ambiente osseo che, interagendo con il recettore, attiva processi di adesione e di proliferazione mediati da chinasi come Akt.

2.11 Mutazioni e polimorfismi del gene del CaSR

In studi di famiglie o individui non relati sono state individuate più di 200 mutazioni nella sequenza nucleotidica del gene CaSR. Le mutazioni sono alterazioni capaci di modificare la funzione del recettore, contribuendo all'insorgenza di patologie complesse. A seconda del cambio aminoacidico indotto e della posizione in cui sono localizzate sono state identificate 135 mutazioni di tipo attivante e 68 di tipo inattivante. Le mutazioni inattivanti sono state associate a FHH e NSHPT mentre quelle attivanti sono state associate ad ADH (<http://www.casrdb.mcgill.ca>).

Inoltre sono stati identificati anche vari polimorfismi, sia esonici che intronici, nel locus del gene CaSR. I più comuni polimorfismi di singola base sono: Ala986Ser, Arg990Gly e Gln1011Glu.

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% (¹⁷⁶) ed è stata associata ad un lieve aumento della calcemia; perciò teoricamente potrebbe avere un'azione inattivante sul recettore (^{177, 178}). 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). La frequenza di questo polimorfismo nella popolazione caucasica è del 8-10%. L'allele 990Gly si associa ad un aumento dell'escrezione di Ca²⁺ e all'iperparatiroidismo primario (¹⁷⁹). Negli studi condotti su una popolazione sana i livelli di Ca²⁺ ionizzato plasmatico sono risultati inferiori nei soggetti portatori della variante 990Gly, pur in presenza di valori normali di PTH. Pazienti caucasici con PHPT mostrano valori di PTH inferiori in associazione con l'allele 990Gly (¹⁸⁰). Inoltre in studi condotti su popolazioni italiane con PHPT, il polimorfismo 990Gly si associa al rischio di sviluppare nefrolitiasi calcica ed a più alti valori di calciuria. In uno studio su una popolazione giapponese, dove la frequenza allelica è opposta a quanto rilevato nella popolazione europea (l'allele più raro risulta essere 990Arg), nei soggetti con PHPT l'allele 990Gly è associato ad un livello di PTH inferiore rispetto al 990Arg (¹⁸¹), lo stesso risultato è stato ottenuto nei pazienti uremici nipponici con HPT secondario (¹⁸²). Questi dati indicano la possibile azione attivante del polimorfismo sull'attività del recettore. I meccanismi coinvolti a livello cellulare sono ancora da chiarire, ma data la posizione del polimorfismo sulla coda citoplasmatica del recettore, è plausibile pensare al coinvolgimento del pathway di segnalazione intracellulare.

Infine 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 (¹⁸³).

2.12 Variazioni di espressione del gene CaSR

L'alterata espressione del CaSR può giocare un ruolo molto importante nella patogenesi o nella progressione di alcune patologie. Le ghiandole paratiroidi di pazienti con iperparatiroidismo primario e secondario severo hanno una ridotta espressione del CaSR (¹⁸⁴). Variazioni dell'espressione del CaSR vitamina D-dipendente sembrano alterare il metabolismo del Ca²⁺ contribuendo alla formazione di calcoli. Alterazioni dell'espressione del CaSR sono state ritrovate nelle neoplasie paratiroidi e nel cancro al colon, alla prostata ed al seno (¹⁸⁵).

2.13 Il CaSR nella calcolosi renale

Il CaSR è un ottimo candidato per spiegare la suscettibilità alla nefrolitiasi, i cambiamenti elettrolitici causati da alterazioni funzionali del CaSR potrebbero essere alla base della

precipitazione salina nel tubulo renale. L'attivazione del CaSR nelle cellule tubulari induce inibizione dell'escrezione di Ca^{2+} nel TAL e nel tubulo contorto distale causando ipersaturazione urinaria (effetto prolitogeno). Viceversa la sua attivazione incrementa il riassorbimento di fosfato, nel tubulo contorto prossimale, e genera un effetto diuretico e di acidificazione urinaria nel dotto collettore (effetti antilitogeni).

Nel periodo postprandiale si possono verificare elevate calcemie (¹⁸⁶) che stimolano le cellule del tratto ascendente spesso dell'ansa, che esprimono il CaSR sulla membrana basolaterale, ad inibire il riassorbimento dello ione per ottenere una precoce eliminazione del carico di Ca^{2+} . L'elevata concentrazione di Ca^{2+} nel fluido tubulare stimolerebbe poi le cellule del dotto collettore a non riassorbire acqua, diluendo così i sali di Ca^{2+} nel fluido tubulare e ad acidificare le urine. Questa possibile sequenza di eventi potrebbe avere un senso di protezione del tubulo, in quanto servirebbe ad evitare la precipitazione intratubulare dei sali di Ca^{2+} indotta dall'alto introito di Ca^{2+} che si verifica subito dopo i pasti.

2.14 Base di partenza scientifica

Studi nell'iperparatiroidismo primitivo, indicano che il CaSR potrebbe avere un ruolo nella litogenesi, poiché i pazienti portatori della variante allelica 990Gly al polimorfismo Arg990Gly sono più soggetti a nefrolitiasi di coloro che portano l'allele 990Arg. Essendo la calcolosi renale una malattia familiare a patogenesi complessa, è possibile che il CaSR sia responsabile, con alcune sue varianti alleliche polimorfiche, della predisposizione dei pazienti allo sviluppo di calcolosi renale (¹⁸⁷). Sulla base di questa ipotesi, è stato intrapreso uno studio caso-controllo in cui 21 SNPs, localizzate lungo tutto il gene CaSR, sono state genotipizzate in 213 controlli e 312 calcolotici normocitraturici (l'ipocitraturia potrebbe mascherare l'effetto del CaSR nella calcolosi renale) (¹⁸⁸). L'analisi di associazione statistica e lo studio aplo-tipico hanno messo in evidenza una regione fortemente associata alla calcolosi renale in pazienti normocitraturici tra gli SNPs rs7652589 ($p=0.0009$) ed rs1501899 ($p=0.0004$). I 2 SNPs sono localizzati nella regione regolativa del CaSR rispettivamente a monte ed a valle dei promotori P1 e P2 (Figura 16).

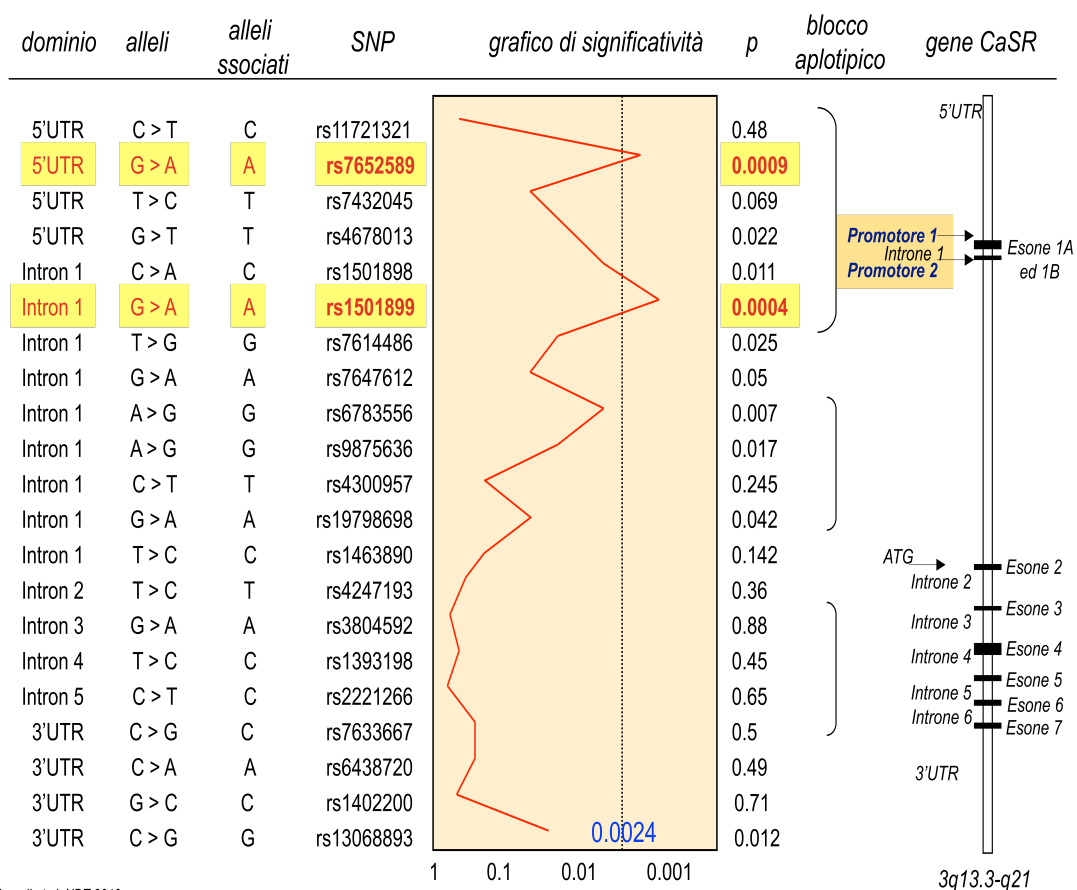


Figura 16: grafico di significatività statistica di 21 SNPs distribuiti lungo tutto il gene CaSR; Vezzoli et al 2010 (¹⁸⁸).

Variazioni nucleotidiche nella regione regolativa potrebbero modificare l'espressione del CaSR attraverso un'alterata regolazione della trascrizione del gene. Cambiamenti dell'espressione del CaSR nelle cellule renali potrebbero influenzare i normali meccanismi di protezione della precipitazione tubulare e favorire precipitazioni tubulari di fosfato di Ca^{2+} e di conseguenza la nefrolitiasi.

3. SCOPO DELLA TESI

**“Siccome una giornata bene spesa dà lieto dormire,
così una vita bene usata dà lieto morire”**

Leonardo da Vinci

3.1 Obiettivo dello studio

Questo lavoro di tesi ha lo scopo di dimostrare l'ipotesi che il recettore di membrana CaSR possa essere coinvolto nell'insorgenza della nefrolitiasi calcica. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo intrapreso uno studio caso-controllo multicentrico che ha permesso di valutare l'associazione di alcuni SNPs localizzati nella regione regolatrice del CaSR con il fenotipo calcolosi renale di calcio in pazienti normocitraturici. Eventuali associazioni con questi SNPs saranno valutate a livello funzionale con uno studio d'espressione sui livelli di mRNA del CaSR nel rene e con uno studio cellulare con un gene-reporter assay per il promotore del gene. Il fine ultimo è comprendere se questi polimorfismi possano avere un ruolo nell'alterazione della trascrizione del CaSR nel tessuto renale, predisponendo quindi gli individui portatori di tali SNPs allo sviluppo della patologia.

4. MATERIALI E METODI

**“Questo per isperienza è provato,
che chi non si fida mai sarà ingannato”**

Leonardo da Vinci

4.1 Soggetti e tessuti

Centosessantasette pazienti normocitraturici affetti da nefrolitiasi calcica (età 42 ± 0.6 anni, peso 69 ± 0.8 kg, di cui il 57.48% uomini (n=96) e il 42.52% donne (n=71), sono stati reclutati tra i soggetti afferenti agli ambulatori di nefrologia degli Ospedali San Raffaele di Milano (n=68), Policlinico di Padova (n=7), Policlinico di Parma (n=84), Ospedale Careggi di Firenze (n=8).

Duecentotredici soggetti sani (età 41 ± 0.6 anni, peso 71 ± 1 kg, di cui il 55.4% uomini (n=118) e il 44.6% donne (n=95), sono stati reclutati come controlli tra i soggetti afferenti al centro trasfusionale del Policlinico di Milano (n=9), al centro donazioni dell'AVIS di Milano (n=106), all'Ospedale San Raffaele di Milano (n=35) e al Policlinico di Parma (n=62).

I criteri di inclusione per i soggetti calcolotici consistevano nell'aver espulso uno o più uroliti composti da ossalato o fosfato di calcio o misti, oppure che fosse stata dimostrata all'ecografia renale la presenza di una formazione litiasica, opaca alla radiografia, di diametro maggiore o uguale a 0.4 cm. Essi erano tutti di razza caucasica, presentavano normali valori plasmatici di calcio, fosfato e creatinina e normali valori di citrato nelle urine. Non avevano altre patologie rilevanti eccetto la nefrolitiasi calcica idiopatica e non erano affetti da forme secondarie di calcolosi renale (quali iperparatiroidismo primitivo, malassorbimento, acidosi tubulare o altro). Ulteriore condizione necessaria per l'inclusione era la non assunzione di farmaci attivi sul metabolismo minerale negli ultimi sei mesi.

I controlli sono stati inclusi in modo tale da soddisfare gli stessi criteri dei pazienti, eccetto l'assoluta negatività per nefrolitiasi nella storia personale e familiare.

Criteri di esclusione per controlli e pazienti sono stati la non appartenenza alla razza caucasica; l'utilizzo di terapie che influenzassero l'omeostasi del calcio o del citrato: steroidi, vitamina D, sali di calcio, bifosfonati, diuretici tiazidici, calcio-antagonisti o altro; malattie croniche diverse dalla calcolosi calcica quali neoplasie, malattie reumatiche, IRC, etc. Ulteriori criteri di esclusione sono stati la presenza di idronefrosi o di altre complicanze capaci di compromettere la funzione renale e la presenza di calcoli nella via urinaria di dimensioni superiori a 1 cm.

Tutti i casi ed i controlli reclutati sono stati genotipizzati per 4 SNPs del gene CaSR.

Centonove biopsie di tessuti renali sono state prelevate da individui nefrectomizzati presso l'Ospedale San Raffaele di Milano. Dal tessuto sano ricavato dalle biopsie è stato estratto DNA genomico per la genotipizzazione di 3 SNPS del gene CaSR ed RNA totale per la quantificazione dell'mRNA.

4.2 Predizione dei siti di legame per i fattori di trascrizione

Per predire i siti di legame dei fattori di trascrizione al DNA sono stati usati il database TRANSFAC 12.1 ed il tool bioinformatico MATCH 11.2. Il tool di predizione bioinformatica fornisce dati riguardanti la qualità di legame tra una sequenza ed una libreria di fattori di trascrizione (matrice).

MATCH 11.2 dà informazioni sulla forza di legame (core score) tra la sequenza nucleotidica e le 5 posizioni più conservate dei fattori di trascrizione (core region) della matrice. Il punteggio può variare da 0 ad 1, dove 1 corrisponde al legame più forte.

Il software è stato usato per individuare eventuali modifiche nei siti di legame tra DNA e fattori di trascrizione dovuti alla presenza degli SNPs localizzati tra i SNPs rs7652589 e rs1501899. Le modifiche identificate sono state definite come legami modificati, creati o distrutti dalla variante allelica dello SNP. Le informazioni sui TF sono ottenute dalle banche dati TRANSFACT 12.1 e SwissProt database (<http://us.expasy.org/sprot/>)

4.3 Estrazione del DNA

I pazienti e i controlli arruolati per lo studio caso-controllo sono stati sottoposti a prelievo di sangue per l'estrazione del DNA (10 ml di sangue) in EDTA come anticoagulante. Il campione, diviso in diverse aliquote, è stato marcato con una sigla, per garantirne l'anonimato, e conservato a -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Le diverse unità di reclutamento hanno inviato i campioni di sangue dei propri pazienti e controlli presso l'unità di Milano che si è occupata dell'allestimento della banca di DNA. È stata quindi eseguita l'estrazione del DNA genomico dai campioni raccolti mediante protocollo standard salting out. Il DNA estratto dalle cellule di sangue periferico è stato quantificato con spettrofotometro, diluito in piastra ad una concentrazione finale di 10 ng/μl e stoccato a -20°C.

Nei tessuti renali il DNA genomico è stato estratto mediante l'Eurogold Tissue-DNA Mini Kit (EuroClone, Devon, UK) presso il laboratorio di Nefrologia del San Raffaele di Milano.

4.4 Genotipizzazione

Centosessantasette pazienti e duecentotredici controlli sono stati genotipizzati per 4 SNPs localizzati nella regione regolativa del CaSR (Tabella 1) mediante tecnica di discriminazione allelica basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti Taqman® sul sistema 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems, Foster City, CA). 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, Foster City, CA). I genotipi sono stati assegnati in automatico dal Applied Biosystems Software Package SDS 2.1.

I 4 SNPs genotipizzati nello studio caso-controllo sono stati selezionati nella regione regolatrice del gene in base ad una predizione bio-informatica sui siti di legame per fattori di trascrizione e in base alla frequenza dell'allele minore maggiore del 10% (Tabella 1).

SNP	posizione nucleotidica	cambio di base wt/pol	frequenza allele polimorfico	regione
1) rs7648041	28394994	C > T	26.3%	5'UTR
2) rs7648044	28395006	C > T	19%	5'UTR
3) rs6776158	28396995	A > G	28.8%	P1
4) rs1048213	28398053	C > T	39%	P2

Tabella 1. Elenco dei 4 SNPs del gene CaSR situati nella regione regolativa del CaSR. Dati ottenuti dall'NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Con la medesima procedura è stata seguita la genotipizzazione sui 109 tessuti renali per i 3 SNPs risultati associati alla nefrolitiasi (rs7652589, rs6776158 ed rs1501899).

4.5 Quantitative real time PCR

L'RNA totale è stato estratto da 10-30 mg di tessuto ottenuto da biopsie renali, utilizzando il PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) e quantificato mediante spettrofotometro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). L'espressione dell'mRNA del CaSR è stata determinata con quantitative real time PCR su cDNA retrotrascritto da RNA totale. La real time PCR è stata condotta amplificando 25 ng di cDNA con SYBR Premix Ex Taq utilizzando Applied Biosystems 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 o 60° C per il GAPDH (gene housekeeping) per 60", e 55°C per 30". I dati di fluorescenza sono stati registrati a 57-60°C. Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA del CaSR sono: 5'ATGCCAAGAAGGGAGAAAGACTCTT 3' (CaSR Forward) e 5'TCAGGACACTCCACACTCAAAG 3' (CaSR Reverse). Le sequenze dei primers utilizzati per il gene GAPDH sono: 5' CTCATGACCACAGTCCATGCCATC 3' (GAPDH Forward) e 5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT 3' (GAPDH 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/mRNAGAPDH.

4.6 Colture Cellulari

Le human embryonic kidney 293 (HEK293) (Cell Bank, IST, Genova, Italia) e le human kidney cells (HKC-8) (fornite dal Prof. Geoffrey Hendy, McGill University, Montreal-Canada) sono state coltivate in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) con 10% siero fetale bovino (GIBCO, Grand Island, NY) e 1% penicillina/streptomina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in ambiente a 5% di CO₂ e 95% di umidità.

4.7 Mutagenesi sito diretta

Per il saggio luciferasico è stato utilizzato un costrutto gene-reporter con il gene luciferasi a valle del P1 per il gene CaSR (Figura 17).

Il costrutto del gene CaSR contenente il P1 wild-type (P1-WT) è stato donato dal Prof. Geoffrey Hendy e dalla Dott.ssa Lucie Canaff (McGill University, Montreal, Canada). Il P1, l'esone 1A e la 5' UTR dell'esone 2 sono stati inseriti nel plasmide pGL3 basic a monte del gene reporter Luc⁺ che codifica per l'enzima firefly luciferasi. Il costrutto contenente la variante polimorfica rs6776158 (P1-POL) è stato generato usando il kit di mutagenesi sito-diretta QuikChange XL (Stratagene, San Diego, CA). La mutazione A→G è stata introdotta con un'amplificazione per PCR, utilizzando due

primers sovrapposti con al centro della loro sequenza il nucleotide con la mutazione da inserire (forward mutagenic primer: 5'GAGGTAGATGTTATCGCCATTTTGCAGAGAAG 3'; reverse mutagenic primer: 5'CTTCTCTGCAAATGGCGATAACATCTACCTC 3'). La Taq Expand High Fidelity^{PLUS} Enzyme (Roche, Indianapolis IN) è stata utilizzata per la PCR per 20 cicli di amplificazione, secondo le indicazioni del QuickChange XL mutagenesis kit. Il prodotto di PCR è stato trattato con la metilasi DpnI che riconosce e taglia specificamente solo i plasmidi metilati (WT) o quelli emimetilati (WT/POL). I plasmidi polimorfici del SNP rs6776158 sono stati amplificati nelle cellule competenti MAX efficiency DH-5aTM di *E. Coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e il DNA plasmidico è stato estratto con il QIAGEN Plasmid mini kit (QIAGEN, Valencia, CA). Le sequenze del DNA plasmidico wild-type (P1-WT) e mutante (P1-POL) sono state confermate con sequenziamento automatico utilizzando il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit sul sequenziatore ABI 3130XL (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). Sui plasmidi confermati dal sequenziamento è stata effettuata amplificazione batterica e un'estrazione di DNA plasmidico con il QIAfilter plasmid maxi kit (QIAGEN, Valencia, CA). Il DNA plasmidico è stato quantizzato mediante spettrofotometro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) ed testato per un'analisi qualitativa con digestione enzimatica. I plasmidi sono stati digeriti a 37°C per 2 ore con SacI (1 sito di taglio) che linearizza il vettore ed HindIII (2 siti di taglio) che dà origine a 2 frammenti di 4500 e 2500 bp. I frammenti sono analizzati su gel d'agarosio 1% per verificarne la corretta dimensione.

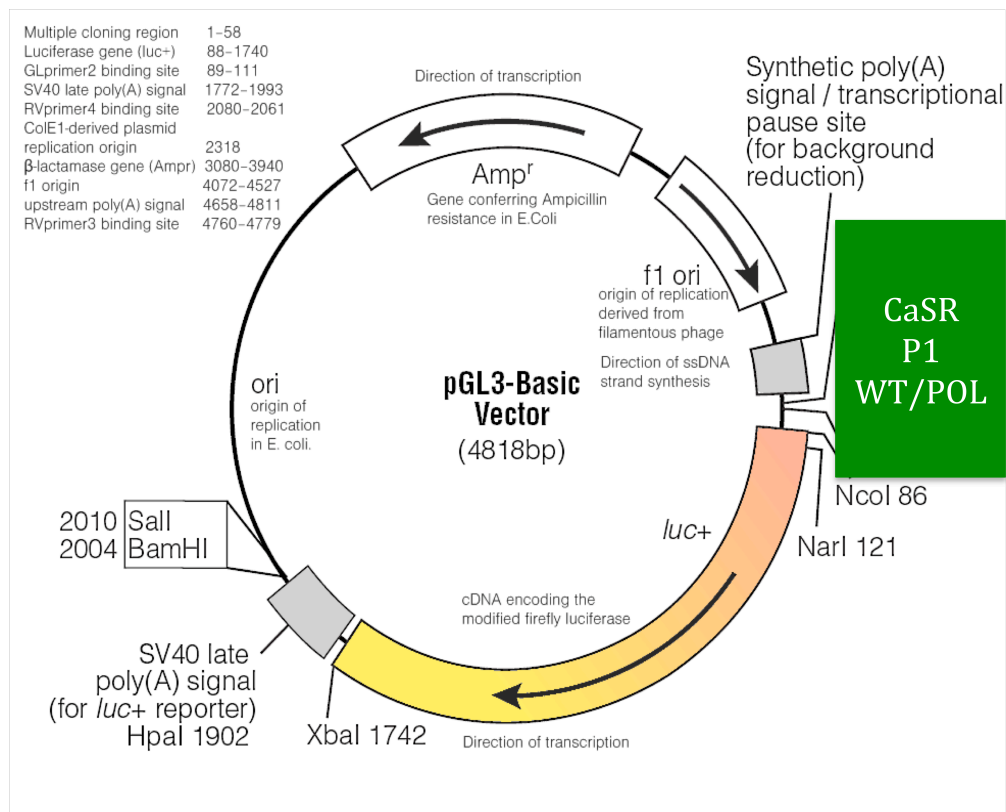


Figura 17: rappresentazione di pGL3 basic con l'inserimento a monte del gene reporter *luc+* del promotore P1 WT o polimorfico per lo SNP rs6776158 (rispettivamente P1-WT e P1-POL).

4.8 Trasfezioni transienti

La trasfezione è stata effettuata in cellule HEK-293 o HKC-8 cresciute in piastre da 96-well utilizzando Fugene HD transfection Reagent (Promega, Madison, WI). Entrambi i tipi cellulari sono stati cotrasfettati con il costrutto P1-WT e il plasmide pGL4.74[hRLuc/TK] (Promega, Madison, WI) oppure con P1-POL e pGL4.74. Il plasmide pGL4.74, contenente il gene Renilla luciferasi (RLuc), è un controllo interno che permette di normalizzare la variabilità sperimentale del gene firefly luciferasi contenuto in pGL3 basic. Inoltre come controllo negativo le cellule sono state cotrasfettate con il plasmide pGL3 basic vuoto e pGL4.74.

In ogni well sono seminate 20.000 cellule in 100 μ L di DMEM 10% e tenute in coltura per 24h. Per la trasfezione sono state preparate 3 mix contenenti: a) pGL3-P1-WT con pGL4.74, b) pGL3-P1-POL con pGL4.74 ed c) pGL3-basic con pGL4.74, sempre in rapporto rispettivamente di 40:1.

Duecento ng di DNA plasmidico totale per ogniuna delle 3 mix e 0.8 μ L di Fugene HD transfection reagent sono stati aggiunti a terreno optiMEM per un volume finale di 10,8 μ L per well ed incubati per 15' a room temperature (rapporto Fugene:DNA=4:1). La misurazione dell'attività luciferasica è stata effettuata 48 ore dopo la trasfezione.

4.9 Stimolazione con vitamina D

L' $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (Sigma Aldrich, St Louis, MO), comunemente chiamata calcitriolo o vitamina D, è stata diluita in etanolo 95% al fine di avere una stock solution alla concentrazione di 30 μ M. Le cellule trasfettate con il costrutto P1-WT o P1-POL sono state stimolate con vitamina D₃, diluita in DMEM, alla concentrazione finale di 10 o 100 nM con un'incubazione di 8 o 24 ore.

4.10 Saggio luciferasico

Per il saggio luciferasico è stato utilizzato il Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI). Quarantotto ore dopo la trasfezione, il terreno di trasfezione è stato sostituito con 75 μ L di DMEM 10% fresh e le cellule sono state trasferite in piastre opache da 96 multi-well, specifiche per luminometria. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 75 μ L di Dual-Glo Luciferase Reagent per 10' a room temperature per misurare l'attività della firefly luciferasi. La lettura è stata effettuata con il luminometro Glomax Multi Detection System (Promega, Madison, WI), con tempi di integrazione di 5". Ulteriori 75 μ L di Dual Glo Stop & Glo Reagent sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per 10' a room temperature ed è stata effettuata una nuova lettura al luminometro per rilevare l'attività di Renilla luciferasi. I dati ottenuti sono espressi come il rapporto Luciferasi/Renilla e sono stati normalizzati sui valori del controllo negativo (pGL3-basic vuoto).

4.11 Analisi statistica

Il potere statistico del test di distribuzione allelica è stato valutato mediante software FINETTI generetor (disponibile online all'indirizzo web: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Per ognuno dei 4 SNPs in esame, mediante test chi-quadrato, è stato valutato il rispetto dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, la distribuzione della frequenza genotipica e la distribuzione della frequenza allelica. Il rischio relativo di essere calcolotico è stato stimato come Odds Ratio (OR) con intervallo di confidenza del 95% (95% CI) nei soggetti con diverso genotipo o aplotipo del gene CaSR.

Le variabili quantitative dei valori di mRNA del CaSR nei tessuti renali e i valori di luciferasi del saggio enzimatico sono state riportate come valore medio \pm errore standard. Le differenze nei valori medi sono state valutate mediante il t-test di Student. Queste analisi statistiche sono state condotte con software SPSS 11 (SPSS Inc., Chicago, IL).

5. RISULTATI

**“É meglio essere ottimisti ed avere torto
piuttosto che pessimisti ed avere ragione”**

Albert Einstein

5.1 Analisi bioinformatica della regione regolatrice del gene CaSR

La regione aplo-tipica del gene CaSR, delimitata dagli SNPs rs7652589 e rs1501899, è risultata associata alla calcolosi renale di calcio (¹⁸⁸). Allo scopo di dettagliare questa regione, si è proceduto alla selezione di ulteriori SNPs, compresi tra i due associati, con una frequenza dell'allele minore (MAF) superiore al 10% (Tabella 2). A questo scopo è stata consultata la banca dati dbSNP dell'NCBI per la popolazione caucasica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

rs ID	Contig position	MAF (%)	Alleles	Promoter position
rs7652589	28384244	33.3	A>G	5'UTR
rs7630625	28384351	48.3	G>A	5'UTR
rs4678000	28385881	35	G>A	5'UTR
rs7648041	28394994	26.3	C>T	5'UTR
rs7648044	28395006	19	C>T	5'UTR
rs7615600	28395079	12.5	C>T	5'UTR
rs4678012	28395452	12.5	G>A	5'UTR
rs6776158	28396995	28.8	A>G	P1
rs34028592	28397167	16.7	A>G	Exon1A
rs6789267	28397211	11.9	C>T	Exon1A
rs35546563	28397494...28397497	28.6	.>AACA	Exon1A
rs1048213	28398053	39	C>T	P2
rs9883099	28398091	25	A>C	P2
rs34250791	28398341	14.3	C>G	Exon1B
rs9883981	28398412	31	G>A	Exon1B
rs7638059	28398982	11.9	T>A	Intron1B
rs6780443	28398988	23.8	C>A	Intron1B
rs7650687	28399082	15.2	A>T	Intron1B
rs7628990	28399357	13	G>T	Intron1B
rs10674556	28399983-28399984	10.9	AT>..	Intron1B
rs34968500	28400087...28400088	15.2	AG>..	Intron1B
rs1501899	28402474	32	A>G	Intron1B

Tabella 2: elenco degli SNPs localizzati all'interno della regione aplo-tipica associata alla calcolosi renale di calcio. In tabella sono mostrate le posizioni del contiguo, le frequenze dell'allele minore, le variazioni alleliche e le posizioni funzionali nel gene CaSR, secondo i dati ottenuti dal database dbSNP-NCBI.

Gli SNPs sono localizzati a monte della regione codificante del CaSR, quindi potrebbero alterare regioni regolatrici dell'espressione del gene, come i siti di legame per i fattori di trascrizione (TF). Per predire la presenza di siti di legame per fattori di trascrizione eucariotici è stato utilizzato il tool bioinformatico di predizione MATCHTM 11.2, sulla base delle informazioni sui fattori di trascrizione contenuti nel database TRANSFAC[®] 12.1. Il tool ha la capacità di predire tutti le modifiche a carico dei siti di legami per i fattori di trascrizione eucariotici date dalla presenza di SNPs. Il tool fornisce informazioni sull'interazione TF-DNA e assegna un punteggio relativo alla forza di legame di ogni interazione che va da 0 ad 1 (core score), dove 1 è l'interazione più forte (Tabella 3).

SNPs	variazioni alleliche	TF	core_score WT	core_score pol	Legame TF-DNA
rs7630625	A>G	NF-AT		1	AGGIUNTO
		HOXA4		0.919	AGGIUNTO
		CETS1P54-2	1		RIMOSSO
rs4678000	A>G	FOXJ2-L		0.897	AGGIUNTO
		TTF-1 (Nkx2-1)	1		RIMOSSO
rs7648041, rs7648044	CC TT=CC CT	WT1-KTS		0.981	RIMOSSO
	CC TC=CT TC	PAX2	0.979	0.986	MODIFICATO
	CC TC=CT TC	VDR	0.953		RIMOSSO
rs7615600	C T	GATA4		0.884	AGGIUNTO
		XVENT1		0.81	AGGIUNTO
rs4678012	A>G	FAC1		0.897	AGGIUNTO
		Hand1:E47	1		RIMOSSO
rs6776158	A G	PAX4	0.903		RIMOSSO
		GATA	1		RIMOSSO
rs34028592	A G	C/EBPalpha		0.977	AGGIUNTO
rs6789267	C T	Oct-04	0.687	0.815	MODIFICATO
		PAX6	0.93	0.772	MODIFICATO
		MYB	1		RIMOSSO
		IPF1		1	AGGIUNTO
rs35546563	AACA>del	XVENT1	0.81	0.837	MODIFICATO
		SRY	0.966		RIMOSSO
		PAX4		0.81	AGGIUNTO
rs1048213, rs9883099	CA CC	MYB		0.893	AGGIUNTO
	CA TA=CA TC=CC TA	CETS1P54-3	0.926		RIMOSSO
rs34250791	C G	ZF5	0.807		RIMOSSO
		PAX-5		0.819	AGGIUNTO
rs9883981	A G	MAZ		1	AGGIUNTO
		CAC-D		0.948	AGGIUNTO
rs7638059, rs6780443	TC AA=TA TC=AA AC	TAL-1beta	0.882	1	MODIFICATO
	TC AA=AA TA	BRCA1:USF2		0.997	AGGIUNTO
	TC AA=AA AC	AP4	1		RIMOSSO
rs7650687	A T	GATA4	0.814		RIMOSSO
		TBP		1	AGGIUNTO
rs7628990	G T	BCL6	0.98		RIMOSSO
		CHOP10:C/EBPa	1		RIMOSSO
rs10674556	AT -	Oct-01	0.94		RIMOSSO
		HOXA4	1		RIMOSSO
rs34968500	AG -	HOXA4		0.919	AGGIUNTO

Tabella 3: risultati dell'analisi bioinformatica con il tool MATCHTM 11.2 in cui sono mostrati gli SNPs selezionati dal dbSNP-NCBI e le rispettive varianti alleliche, i TF le cui core regions contengono lo SNP d'interesse, le possibili modificazioni della forza di legame TF-DNA (core score) e le modifiche del legame TF-DNA. Queste ultime sono riportate come legami aggiunti (in rosso), rimossi (in giallo) o modificati (in verde):

I TF sono stati analizzati sulla base della forza di legame al DNA (core score), del ruolo biologico e dell'espressione tissutale. Per la genotipizzazione sono stati scelti gli SNPs che davano un core score superiore allo 0.8 e che determinavamo modifiche per TF con un possibile ruolo nella regolazione della trascrizione dell'mRNA del CaSR o con un generico ruolo nella trascrizione genica compatibili con le alterazioni fisiopatologiche renali. Inoltre sono stati analizzati gli SNPs, localizzati in posizioni chiave per la regolazione della trascrizione del CaSR, come nei due promotori P1 e P2. Alla luce di quest'analisi sono stati scelti:

- rs7648041 la cui variante allelica rimuove il sito di legame per Wilms' Tumor (WT1), un fattore di trascrizione espresso specificamente nei reni e nelle cellule ematopoietiche;
- rs7648044 la cui variante allelica rimuove il sito di legame del Vitamin D receptor (VDR), un fattore di trascrizione che ha un ruolo centrale dell'omeostasi del calcio perché modula l'azione della vitamina D ed è noto regolare l'espressione del gene CaSR;
- rs6776158 che è localizzato all'interno del P1 del gene CaSR, la cui variante allelica modifica il sito di legame di Ying Yang 1 (YY1), un fattore di trascrizione con il duplice ruolo di attivatore o repressore su un gran numero di geni virali e cellulari e che può avere un ruolo importante nello sviluppo e nella differenziazione cellulare;
- rs1048213 che è localizzato all'interno del P2 del gene CaSR, selezionato al puro scopo di avere un marker genetico anche all'interno del secondo promotore del gene.

5.2 Studio caso-controllo

Per lo studio caso-controllo, i 4 SNPs selezionati sono stati genotipizzati in 167 calcolotici normocitraturici e 213 controlli sani, mediante tecnica di discriminazione allelica basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti Taqman. I risultati della genotipizzazione hanno mostrato che la frequenza allelica dello SNP rs6776158 aveva un'associazione statisticamente significativa con la patologia, con χ^2 di 12.62 ($p=0.00084$). In particolare, l'allele polimorfico aveva una frequenza maggiore nei calcolotici normocitraturici (37.8%) rispetto ai controlli (26.4%). Gli altri SNPs non sono risultati associati al fenotipo calcolosi (Tabella 4 e Figura 18). I dati indicano che il genotipo polimorfico rappresenta un forte fattore di rischio per la patologia perché gli individui omozigoti per l'allele polimorfico hanno una probabilità 3 volte superiore agli altri 2 genotipi di sviluppare la calcolosi renale di calcio (Odds ratio=2.968, CI 95% = 1.647-7.118).

SNP	Casi		Controlli		p-value
	allele WT n (%)	allele POL n (%)	allele WT n (%)	allele POL n (%)	
rs7648041	232 (70.3%)	98 (29.7%)	288 (69.9%)	124 (30.1%)	0.9058
rs7648044	264 (80%)	66 (20%)	343 (82.4%)	73 (17.6%)	0.3929
rs6776158	205 (62.1%)	125 (37.9%)	306 (73.5%)	110 (26.5%)	0.00084
rs1048213	262 (79.4%)	68 (20.6%)	312 (76%)	98 (24%)	0.2852

Tabella 4: frequenze alleliche e p-value degli SNPs genotipizzati nello studio caso-controllo.

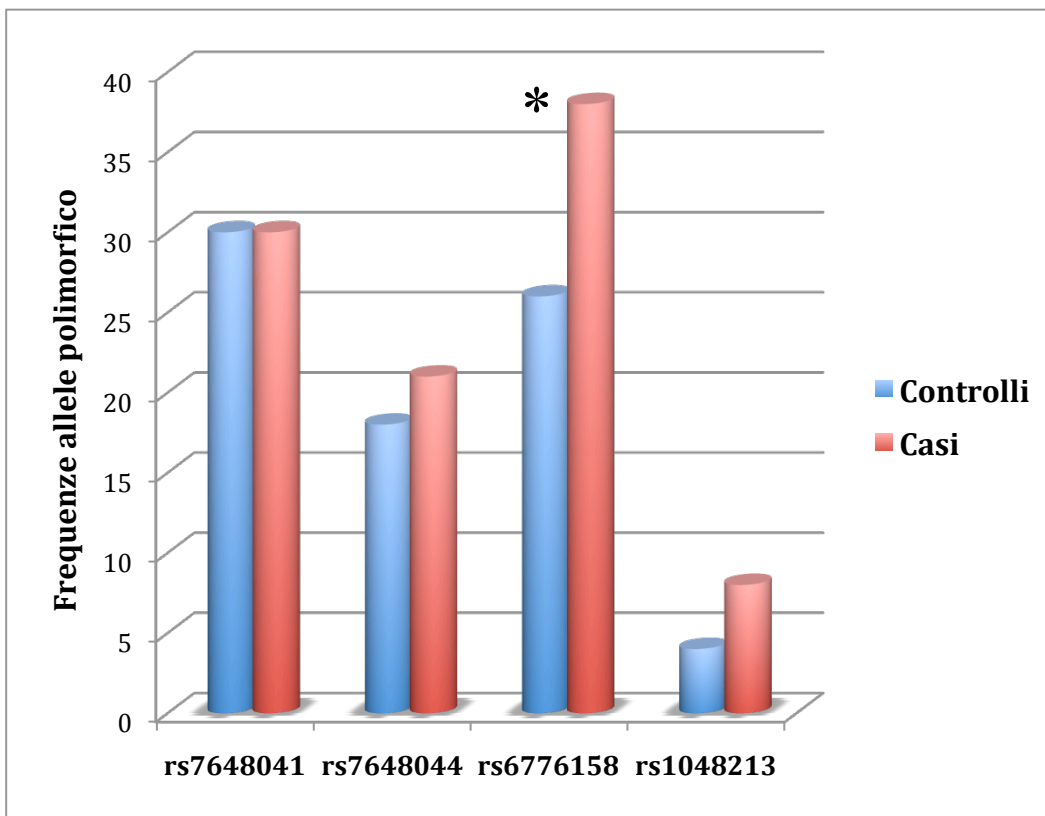


Figura 18: rappresentazione grafica delle frequenze dell'allele polimorfico nello studio caso-controllo.

5.3 Valutazione dei livelli di mRNA del CaSR in presenza delle varianti genetiche associate alla patologia

La variante polimorfica rs6776158 potrebbe diminuire l'affinità di legame per YY1, inoltre lo SNP è localizzato all'interno del P1, 159 bp a monte del sito d'inizio della trascrizione (+1), in una posizione rilevante perchè vicina alla CCAAT box, alla TATA box ed al Vitamin D Receptor Element (VDRE) (Figura 19). Sulla base delle sue caratteristiche lo SNP potrebbe alterare l'attività trascrizionale del P1 del CaSR determinando una minore o una maggiore espressione del gene.

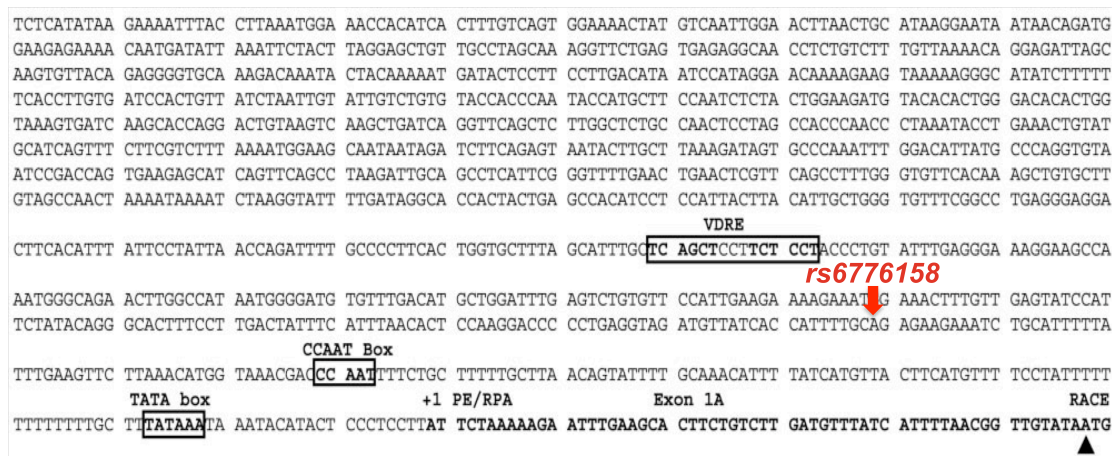


Figura 19: sequenza nucleotidica del P1 in cui sono evidenziati il VDRE, la CCAAT e la TATA boxes, il sito d'inizio della trascrizione (+1) e la posizione dello SNP rs6776158 (figura modificata da Canaff L. et al,⁶⁶).

Centonove biopsie renali di midollare e 109 biopsie di corticale sono state reclutate da individui che avevano subito una nefrectomia totale per neoplasia renale. Le indagini preliminari di anatomia patologica hanno garantito la provenienza delle biopsie da porzioni di tessuto non tumorale. Dalle biopsie sono stati estratti DNA ed RNA totale. Il DNA è stato utilizzato per la genotipizzazione dei 3 SNPs localizzati nella regione regolatrice del CaSR ed associati alla calcolosi renale di calcio: i 2 SNPs risultati associati alla nefrolitiasi in un precedente studio caso-controllo (rs7652589 e rs1501899,¹⁸⁸) e lo SNP rs6776158 identificato in questo studio. L'RNA è stato utilizzato per la quantizzazione dell'mRNA del CaSR mediante real time PCR sia in tessuti della midollare che tessuti della corticale renale. I valori, espressi come rapporto mRNA CaSR/mRNA GAPDH, hanno evidenziato un'espressione del CaSR quasi tripla nella porzione midollare rispetto a quella corticale (n=10, 2.94±1.8 vs n=10, 1.12 ±0.56). Per questo motivo si è preferito valutare l'espressione del gene solo nel tessuto midollare.

Le analisi di associazione tra genotipo e livelli di mRNA hanno mostrato che 2 dei 3 SNPs associati alla nefrolitiasi determinavano una riduzione dei livelli di mRNA del CaSR. In particolare gli individui omozigoti per le varianti alleliche degli SNPs rs6776158 ed rs1501899 mostravano una

diminuzione statisticamente significativa dell'mRNA del CaSR con un p-value=0.0157 ed un rapporto mRNA CaSR/mRNA GAPDH quasi della metà rispetto agli individui eterozigoti ed omozigoti per l'allele WT. I 2 SNPs mostravano gli stessi valori perchè perfettamente in linkage disequilibrium in tutta la popolazione genotipizzata (Tabella 5 e Figura 20).

SNP	Media quantità mRNA CaSR/mRNA GAPDH		p-value (t-test)
	Omozigoti allele WT-ed eterozigoti	Omozigoti allele POL	
rs7652589	2.695 (n=95)	2.243 (n=14)	0.4813
rs6776158	2.753 (n=97)	1.696 (n=12)	0.0157
rs1501899	2.753 (n=97)	1.696 (n=12)	0.0157

Tabella 5: valori medi del rapporto mRNA CaSR/mRNA GAPDH degli individui eterozigoti ed omozigoti per l'allele WT confrontati con gli individui omozigoti per l'allele polimorfico e valore di p-value del t-test di Student.

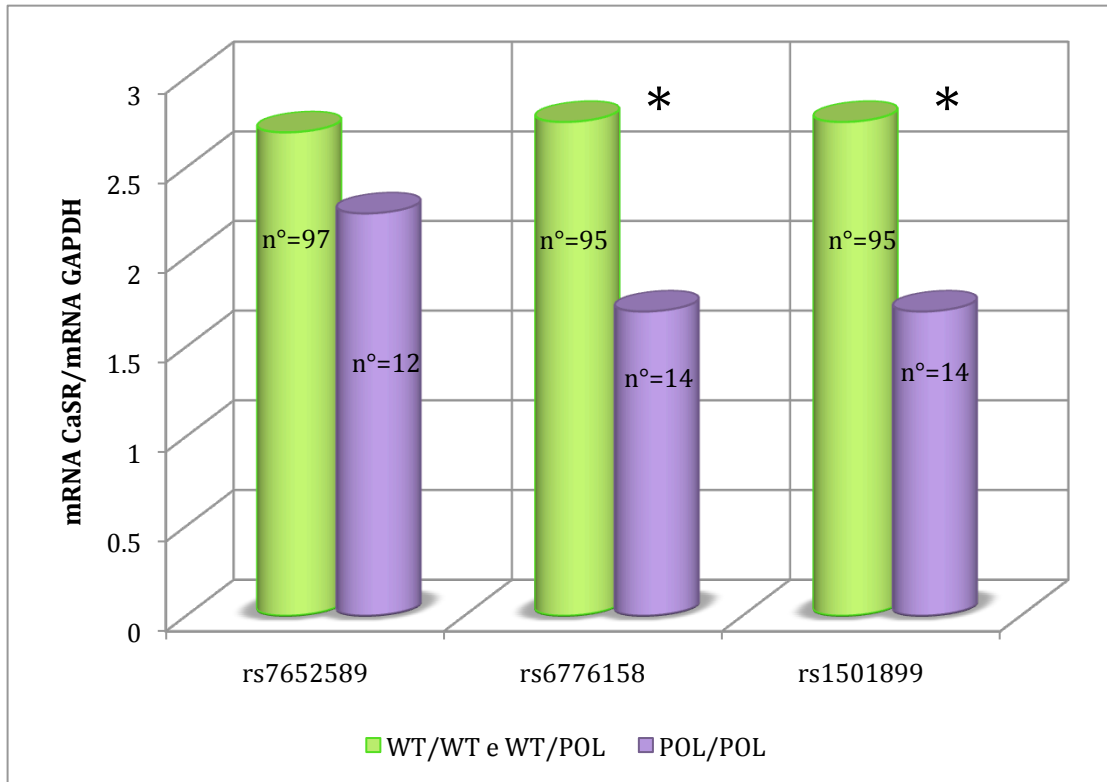


Figura 20: valori medi dell'mRNA del CaSR espresso come rapporto mRNA CaSR/mRNA GAPDH in presenza degli SNPs rs7652589, rs6776158 ed rs1501899.

5.4 Saggio Luciferasico

La minore quantità di mRNA del CaSR, misurata nel tessuto midollare renale di individui omozigoti per l'allele polimorfico degli SNPs rs6776158 e rs1501899 ha fatto ipotizzare un loro possibile coinvolgimento nella regolazione della trascrizione del gene CaSR. In particolare vista la localizzazione all'interno del P1 di rs6776158, lo SNP potrebbe avere un ruolo primario nell'attività del promotore. Per supportare questa ipotesi abbiamo effettuato un saggio luciferasico in cellule HEK-293 ed HKC-8 con un costrutto in cui il gene luciferasi (Luc+) è guidato dal promotore 1 WT per rs6776158 (P1-WT) o dal promotore 1 polimorfico per rs6776158 (P1-POL).

In accordo col dato precedente, il saggio ha evidenziato un diminuzione dell'attività luciferasica in presenza del P1-POL nelle HKC-8, con una differenza statisticamente significativa (ratio 1.47 vs 1.17, $p=0.022$). Nelle cellule HEK-293 i livelli di espressione mostravano lo stesso trend anche se privo di significatività statistica (ratio 1.65 vs 1.50) (Figura 21).

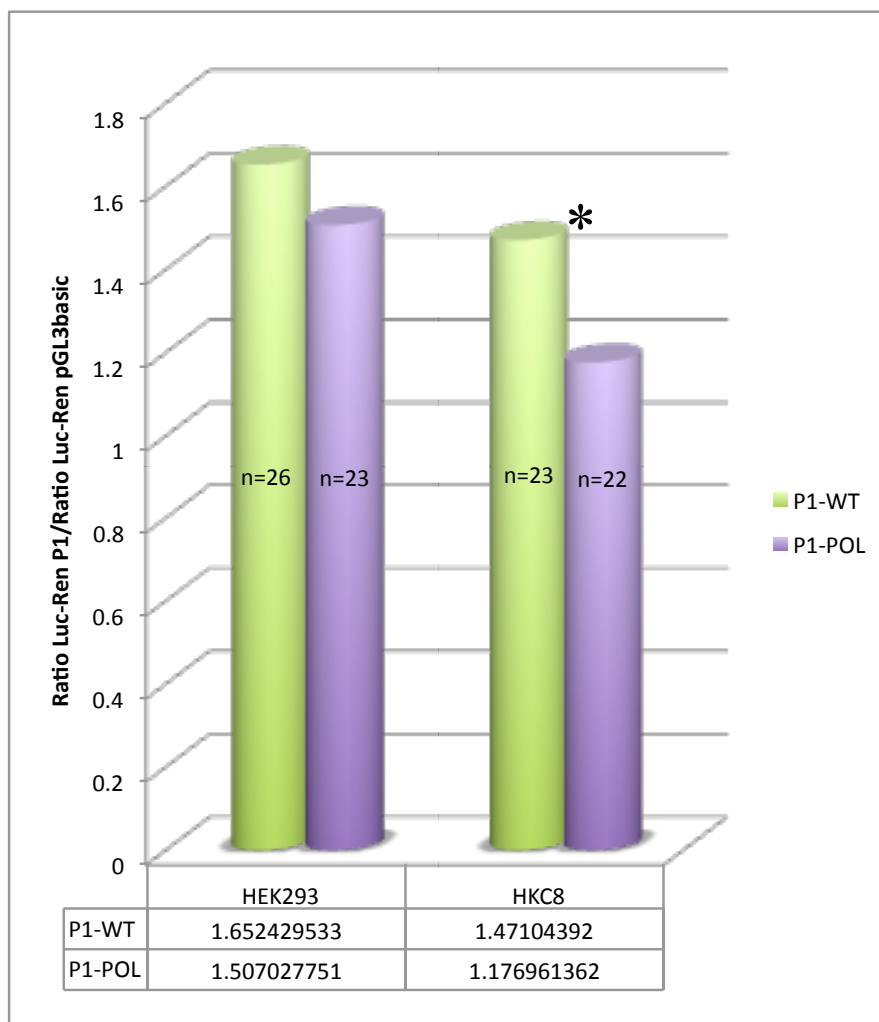


Figura 21: valori medi di luciferasi espressa come rapporto tra Luc/Ren del P1 e Luc /Ren di pGL3 basic sia nelle cellule HEK-293 che nelle HKC-8 trasfettate con i plamidi P1-WT e P1-POL.

Al fine di indurre l'attività del promotore, le cellule sono state trattate con 10 nM di vitamina D₃ per 24 ore prima della misurazione dell'attività luciferasica. I risultati mostravano un aumento dell'attività del promotore in entrambi i tipi cellulari, come atteso, e ancora una volta una differenza di attività tra P1-WT e P1-POL sia nelle HEK-293 che nelle HKC-8, pur se meno marcata in quest'ultime (Figura 22).

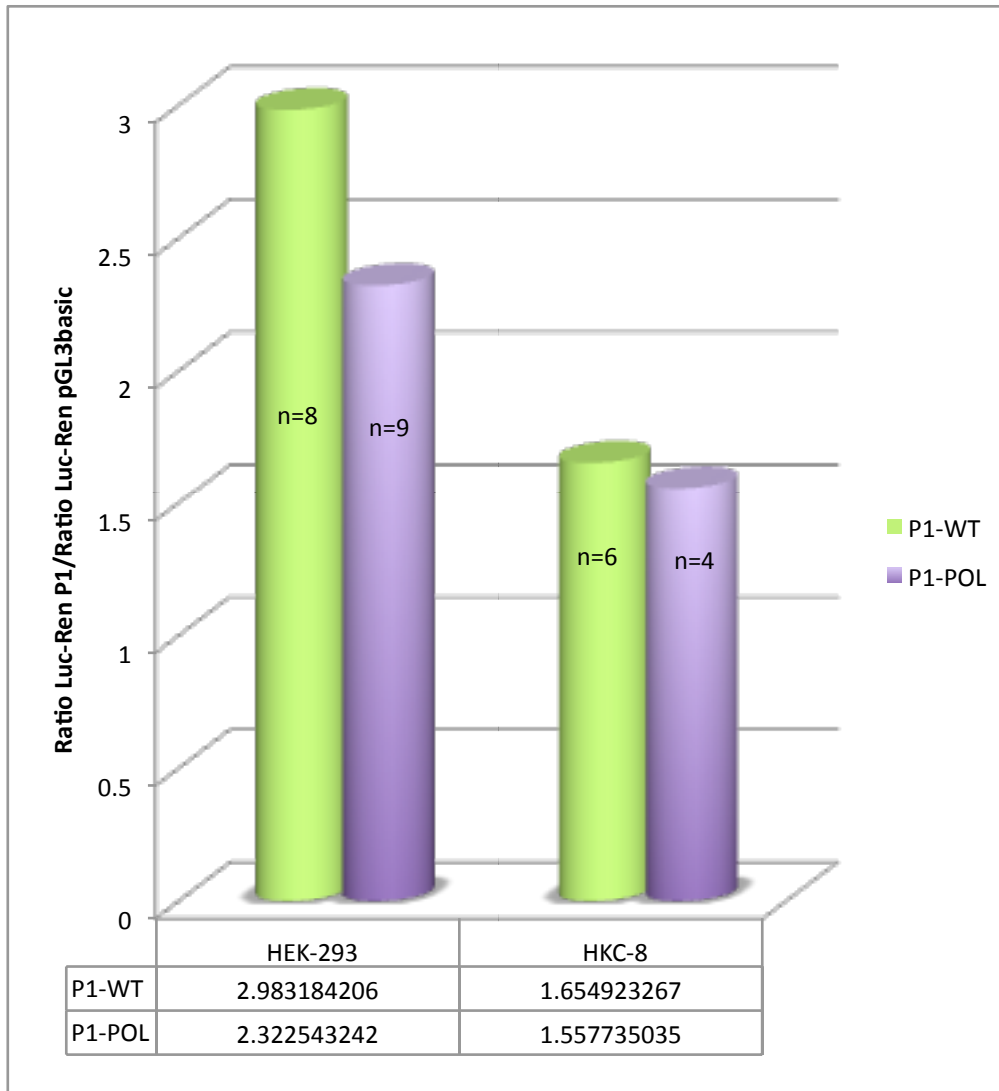


Figura 22: risultati del saggio luciferasico in HEK-293 ed HKC-8 trasfettate con P1-WT e P1-POL e stimolate con 10 nM di vitamina D₃ per 24 ore.

Le HEK-293, che sembrano rispondere meglio all'azione della vitamina D₃, sono state trattate anche con 100 nM per 24 ore. In linea con gli altri risultati si evidenziava una diminuzione dell'attività luciferasica delle cellule trasfettate con il P1-POL rispetto a quelle trasfettate con P1-WT. L'attività del promotore aumentava in maniera dose-dipendente aumentando la concentrazione di vitamina D₃ e la differenza tra i due costrutti rimaneva evidente (Figura 23).

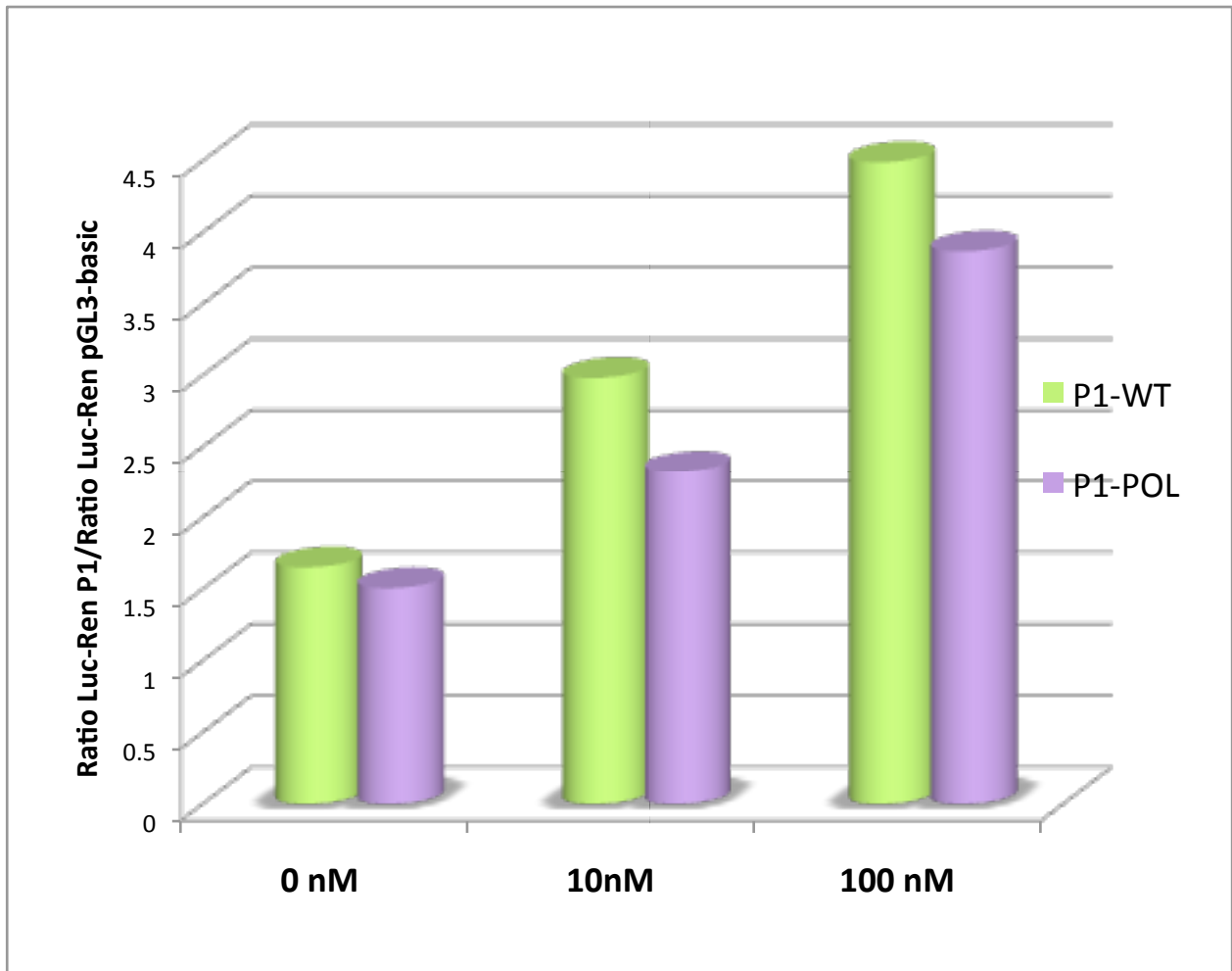


Figura 23: HEK-293 trasfettate con P1-WT e P1-POL non trattate o trattate con 10 e 100 nM di vitamina D₃ 24 ore prima della lettura luciferasica.

5.5 Discussione

La nefrolitiasi calcica è una malattia a carattere multifattoriale in cui sia fattori ambientali che genetici possono contribuire alla manifestazione fenotipica della patologia. Studi caso-controllo di associazione tra polimorfismi localizzati in geni candidati e calcolosi renale hanno indicato il gene CaSR come uno dei possibili determinanti genetici della malattia.

Il CaSR, espresso nei tessuti coinvolti nell'omeostasi del Ca^{2+} , è il sensore cellulare delle variazioni di Ca^{2+} extracellulare ed è implicato nella regolazione del metabolismo del Ca^{2+} . Nel rene il recettore ha differenti effetti a seconda del segmento tubulare in cui è localizzato. La sua attivazione determina:

- nel tubulo contorto prossimale, un effetto antifosfaturico attraverso l'aumento del riassorbimento di PO_4^{4-} ;
- nel dotto collettore, acidificazione urinaria ed un effetto diuretico attraverso l'inibizione del riassorbimento di acqua.

Per questo motivo, l'attivazione del CaSR aziona 3 meccanismi con chiari effetti antilitogeni che potrebbero impedire la precipitazione di cristalli nel tubulo renale e di conseguenza prevenire la nefrolitiasi calcica.

D'altro canto, nel tratto ascendente dell'ansa di Henle e nel tubulo convoluto distale l'attivazione del CaSR determina un effetto ipercalciorico attraverso l'inibizione del riassorbimento sia attivo che passivo di Ca^{2+} . In questo caso l'ipercalcioria potrebbe favorire la precipitazione salina ed avere un effetto prolitogeno. Allo scopo di comprendere il possibile ruolo del CaSR nell'insorgenza della nefrolitiasi calcica, nel laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di tesi è stato intrapreso uno studio caso-controllo in cui polimorfismi genetici distribuiti uniformemente lungo tutto il gene CaSR sono stati genotipizzati in 213 controlli e 312 calcolotici normocitraturici (¹⁸⁸). I risultati hanno mostrato che gli SNPs rs7652589 ed rs1501899, localizzati rispettivamente 12 Kb a monte e 4 Kb a valle dei promotori P1 e P2 (Figura 16), erano associati alla patologia con un p-value rispettivamente di 0.0009 e 0.0004. In particolare, gli alleli polimorfici avevano una frequenza maggiore nei calcolotici (38% e 37.3%) rispetto ai controlli (27.5% e 26.2%).

Sulla base di queste evidenze è stata consultata la banca dati dbSNP dell'NCBI per individuare ulteriori SNPs, all'interno della regione associata, che potessero avere un ruolo nell'eziopatogenesi della calcolosi renale determinando alterazioni della regolazione della trascrizione dell'mRNA del CaSR. È stata condotta un'analisi bioinformatica sulla predizione di siti di legame per fattori di trascrizione e sono stati selezionati SNPs che potevano variare il sito di legame per importanti fattori di trascrizione renali o che si posizionavano all'interno dei promotori del CaSR, P1 e P2. Seguendo questi criteri, sono stati individuati 4 SNPs (rs7648041, rs7648044, rs6776158 ed rs1048213) con un possibile ruolo nella trascrizione del gene CaSR.

Per capire se gli SNPs potessero determinare alterazioni dell'espressione del CaSR, è stato intrapreso uno studio caso-controllo nella stessa popolazione utilizzata nello studio caso-controllo

precedente (¹⁸⁸). Duecentotredici controlli sani e 167 calcolotici normocitraturici sono stati genotipizzati per i 4 SNPs selezionati. I risultati hanno messo in evidenza che lo SNP rs6776158, localizzato all'interno del P1, è associato alla patologia con un p-value di 0.00084. Ancora una volta, l'allele polimorfico ha mostrato una maggiore frequenza nei calcolotici (37.8%) rispetto ai controlli (26.4%). Dal punto di vista genotipico, gli individui omozigoti per l'allele polimorfico hanno mostrato una probabilità di sviluppare la patologia tripla rispetto agli altri 2 genotipi (O.R.=2.968). Gli altri 3 SNPs non sono risultati associati alla patologia.

La localizzazione nella regione al 5' UTR del gene dei 3 SNPs rs7652589, rs1501899 ed rs6776158, risultati associati alla calcolosi renale nei due studi caso-controllo, lascia ipotizzare un loro ruolo nel controllo dell'espressione del gene CaSR. A questo scopo i livelli di mRNA del CaSR sono stati quantizzati in tessuto renale proveniente da soggetti sottoposti a biopsia per diagnosi di neoplasia renale. La quantizzazione è avvenuta sia nella midollare che nella corticale della porzione normale di tessuto renale. Vista l'espressione del CaSR significativamente maggiore nel tessuto midollare rispetto al corticale, si è deciso di considerare i valori di espressione solo della midollare. Si è analizzata la correlazione tra i livelli di mRNA del CaSR e i genotipi agli SNPs rs7652589, rs1501899 ed rs6776158. I livelli di trascritto del CaSR sono risultati significativamente ridotti negli individui portatori del genotipo omozigote per l'allele polimorfico agli SNPs rs6776158 ed rs1501899 (p-value=0.0157). Gli SNPs rs6776158 ed rs1501899 sono risultati in perfetto linkage disequilibrium, per questo motivo entrambi in sinergia o separatamente potrebbero spiegare la riduzione della quantità di trascritto.

A questo punto la nostra attenzione si è focalizzata sullo SNP rs6776158 perché localizzato all'interno del P1, rispettivamente 50, 130 e 159 bp a monte della CCAAT box, TATA box e del sito d'inizio della trascrizione. La posizione dello SNPs rs6776158 all'interno del P1 ha permesso di preparare dei costrutti in cui il P1 avesse in posizione rs6776158 il nucleotide A (WT) oppure il nucleotide G (POL). Il P1 con l'allele WT (P1-WT) oppure il P1 con allele polimorfico (P1-POL) sono stati posizionati all'interno del vettore pGL3-basic affinché potessero guidare la trascrizione del gene Luc+ che codifica per l'enzima firefly luciferasi. Per valutare l'influenza dello SNP rs6776158 sull'attività del P1 è stata misurata la quantità di firefly luciferasi prodotta sotto la guida sia del P1-WT che del P1-POL.

I 2 differenti costrutti, P1-WT e P1-POL, sono stati trasfettati nelle cellule HEK-293, che non esprimono in maniera endogena il CaSR, e nelle cellule HKC-8 che esprimono in maniera endogena il CaSR. Al luminometro è stata misurata la quantità di luciferasi prodotta dai due promotori. In accordo con i risultati attesi, sia le cellule HEK-293 che le HKC-8 hanno mostrato una diminuzione della quantità di luciferasi prodotta quando la trascrizione del gene era regolata da P1-POL. In particolare, la diminuzione è risultata statisticamente significativa (p-value=0.022) nelle HKC-8 che esprimono endogenamente il CaSR. La differenza rimane anche quando il promotore è stimolato con la vitamina D.

Per la prima volta, si evidenzia un possibile ruolo dello SNP rs6776158 nella regolazione genica del CaSR, ma rimane ancora da indagare quale sia il meccanismo alla base, con eventuali ulteriori studi funzionali che potrebbero confermare il legame del DNA con il fattore di trascrizione YY1 o qualche altro fattore di trascrizione.

Dal punto di vista fisiopatologico, un maggiore rischio di manifestare calcolosi renale di calcio ed una diminuzione dell'espressione del CaSR nel tessuto renale degli individui omozigoti per l'allele polimorfico alla SNP rs6776158 fanno ipotizzare che la diminuzione della quantità di trascritto del CaSR potrebbe indurre una maggiore suscettibilità al fenotipo calcolosi renale di calcio.

L'attivazione del CaSR nel rene determina l'attivazione di 3 meccanismi antilitogeni (effetto fosfaturico, diuretico e di acidificazione urinaria). La nostra ipotesi è che un decremento nella quantità di trascritto possa provocare la perdita degli effetti antilitogeni e quindi possa determinare:

1. un maggiore carico di fosfato del tubulo contorto prossimale;
2. una diminuzione dell'effetto diuretico;
3. una diminuzione dell'acidificazione urinaria

e di conseguenza favorire la precipitazione dei sali di calcio-fosfato e calcio-ossalato che potrebbero funzionare da centri di nucleazione per la formazione dei calcoli di calcio.

In accordo con la nostra ipotesi, topi knockout per il canale del Ca^{2+} Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 5 (TRPV5) mostravano ipercalciuria, poliuria, urine acide ma non precipitazioni saline. Se negli stessi ratti veniva inibita la pompa idrogenionica rene-specifica essi presentavano ipercalciuria e poliuria (come in precedenza) ma urine alcaline e precipitazione di fosfato di calcio tubulare (¹⁸⁹). Questo lavoro mette in evidenza l'importanza dell'acidificazione urinaria nell'eziogenesi della calcolosi renale. Inoltre, ratti uremici in cui calcificazioni vascolari vengono indotte dalla vitamina D, trattati con attivatori del CaSR (calciomimetici) mostravano una diminuzione o un'assenza di calcificazioni rispetto ai non trattati (¹⁹⁰). In un ulteriore studio, è stato osservato un rallentamento delle calcificazioni arteriose in soggetti dializzati trattati con calciomimetici (¹⁹¹), che potrebbe spiegarne anche la minore mortalità (¹⁹²).

Anche se studi precedenti avevano evidenziato un'associazione tra nefrolitiasi e polimorfismi del gene CaSR (¹⁸⁸, ¹⁹³), il mio studio suggerisce, per la prima volta, un possibile ruolo di uno SNP localizzato nella regione regolatrice del CaSR, rs6776158 sito all'interno del promotore 1, nella fisiopatologia della calcolosi renale di calcio.

6. CONCLUSIONI

“Una volta che avrete imparato a volare,
camminerete sulla terra guardando il cielo
perchè è là che siete stati ed è là che vorrete tornare”

Leonardo da Vinci

Questo studio ci ha permesso di:

1. individuare uno nuovo SNP, rs6776158, localizzato all'interno del promotore 1 del gene del CaSR, associato alla calcolosi renale di calcio;
2. correlare gli SNPs rs1501899 (localizzato nell'introne 1 ed associato alla calcolosi in uno studio precedente, ¹⁸⁸) e rs6776158 ad una minore quantità di mRNA del CaSR nel tessuto midollare renale;
3. confermare, mediante saggio luciferasico in cellule HEK-293 ed HKC-8, una diminuzione dell'attività del promotore 1 in presenza dell'allele polimorfico al rs6776158 rispetto al WT, sia nelle cellule non trattate che stimolate con 10 e 100 nM di vitamina D₃.

In conclusione, questo lavoro ha evidenziato un possibile effetto della ridotta espressione del gene CaSR nell'eziopatogenesi della calcolosi renale di calcio e un possibile ruolo della SNP rs6776158 nella regolazione genica del recettore.

Futuri sviluppi

Studi di correlazione tra genotipo e quantità di proteina CaSR nel tessuto renale saranno necessari al fine di chiarire definitivamente il ruolo dello SNP rs6776158 nell'alterazione dell'espressione del gene CaSR. Per validare sperimentalmente il ruolo di fattori di trascrizione nella regolazione della trascrizione, saranno necessari saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) che potrebbero confermare il legame del DNA con il fattore di trascrizione YY1 o qualche altro fattore di trascrizione il cui legame può essere rimosso o aggiunto dalla variazione nucleotidica.

In prospettiva farmacogenetica, questo studio potrebbe contribuire a definire il profilo genetico da valutare per i trattamenti farmacologici come, per esempio, con antagonisti ed agonisti del CaSR quali i calciolitici o i calciomimetici.

7. BIBLIOGRAFIA

**“Due cose sono infinite:
l’universo e la stupidità umana,
ma riguardo l’universo ho ancora dei dubbi”**

Albert Einstein

-
- ¹ Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition. New York, McGraw-Hill, 2001.
- ² Maloney ME, Springhart WP, Ekeruo WO, Young MD, Enemchukwu CU, Preminger GM. Ethic Background has minimal impact on the etiology of nephrolithiasis. *J Urol*. 2005 Jun;173(6):2001-4.
- ³ Trinchieri A, Coppi F, Montanari E, Del Nero A, Zanetti G, Pisani E. Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *Eur Urol* 2000;37:23-25.
- ⁴ Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, Rovera F, Montanari E, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol* 1999;162:27-30.
- ⁵ Kavanagh JP. Supersaturation and renal precipitation: the key to stone formation?. *Urol Res* 2006;34:81-85.
- ⁶ Randall A. The etiology of primary renal calculus. *Int Abstr Surg* 1940;71:209.
- ⁷ Williams JC Jr, Matlaga BR, Kim SC, Jackson ME, Sommer AJ, McAteer JA, et al. Calcium oxalate calculi found attached to the renal papilla: Preliminary evidence for early mechanisms in stone formation. *J Endourol* 2006;20:885-90.
- ⁸ Evans AP, Coe FL, Rittling SR, Bledsoe SM, Shao Y, Lingeman JE, et al. Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization. *Kidney Int* 2005;68:145-54.
- ⁹ Khan SR, Shevock PN, Hackett R. Urinary enzymes and CaOx urolithiasis. *J Urol* 1989;142:846-49.
- ¹⁰ Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys, results of human, animal model and tissue culture studies. *Clin Exp Nephrol* 2004;8:75-88.
- ¹¹ Gambaro G, Vezzoli G, Casari G, Rampoldi L, D'Angelo A, Borghi L. Genetics of hypercalciuria and calcium nephrolithiasis: from the rare monogenic to the common polygenic forms. *Am J Kidney Dis*. 2004;44(6):963-86.
- ¹² Parry ES, Lister IS. Sunlight and hypercalciuria. *Lancet*. 1975 May 10;1(7915):1063-5.
- ¹³ Parry ES: Sunlight and hypercalciuria. *Lancet* 1:10631065,1975
- ¹⁴ 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* 1993;328:833-38.
- ¹⁵ Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women nurses' health study II. *Arch Int Med* 2004; 164:885-91.
- ¹⁶ Lemann J Jr. Composition of the diet and calcium kidney stones. *N Engl J Med* 1993;328:880-81.
- ¹⁷ Massey LK, Whiting SJ. Dietary salt, urinary calcium, and kidney stone risk. *Nutr Rev*. 1995;53:131-4.
- ¹⁸ Goldfarb S. Dietary factors in the pathogenesis and prophylaxis of calcium nephrolithiasis. *Kidney Int*. 1988;34:544-555.

-
- ¹⁹ Vezzoli G, Bianchin C, Adamo D, Terranegra A, Soldati L. Renal complications of idiopathic hypercalciuria. In *Florentine Seminars on Mineral Metabolism I Primary Hypercalciuria*, Chapter 6:71-82, Florence 14 dec 2001
- ²⁰ Hess B, Ackermann D, Essig M, Takkinen R, Jaeger P. Renal mass and serum calcitriol in male idiopathic calcium renal stone formers: role of protein intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1916-21.
- ²¹ Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med*. 1997;126:497-504.
- ²² Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women. *Am Med Association* 2004;164:885-891.
- ²³ Taylor EN and Curhan GC. Fructose consumption and the risk of kidney stones. *Kidney International* (2008) 73, 207–212.
- ²⁴ Hatch M, Schepers A, Grumberger I, Godec CJ. A retrospective analysis of the metabolic status of stone formers in New York city metropolitan areas. *NY State J Med* 1991;91:196-200.
- ²⁵ Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int*. 2002;62:2062-2072.
- ²⁶ Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Fatty acid intake and incident nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis*. 2005;45:267-274.
- ²⁷ Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of the intake of vitamins C and B6, and the risk of kidney stones in men. *J Urol* 1996;155:1874-1951.
- ²⁸ Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:840-5.
- ²⁹ 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* 1993;328:833-38.
- ³⁰ Laird NM, Lange C. Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nature Rev Genet* 2006; 7: 385-394.
- ³¹ Morton N. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest* 2005;115:1425–30.
- ³² Ljunghall S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* 1979;51:249-52.
- ³³ Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* 1968;278:1313-18.
- ³⁴ Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, Coppi F, Pisani E. Familial aggregation of renal calcium stone disease. *J Urol* 1988;138:478-81.
- ³⁵ Indridansson 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* 2006;40(3):215-20.

-
- ³⁶ Loredó-Osti 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* 2005;68:966-71.
- ³⁷ Lenko J, Wochna Z, Hubner H. Cytogenetic studies in familial nephrolithiasis. *Pol Med Sci Hist Bull.* 1969 Apr;12(2):71-4.
- ³⁸ Lerolle N, Lantz B, Paillard F, et al: Risk factors for nephrolithiasis in patients with familial idiopathic hypercalciuria. *Am J Med* 113:99-103, 2002
- ³⁹ Goodman HO, Brommage R, Assimos DG, Holmes RP. Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease. *World J Urol* 1997;15:186-94.
- ⁴⁰ Colhoun HM, McKeigue PM, Smith JD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361:865-72.
- ⁴¹ Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nature Rev Genet* 2006;7:812-20.
- ⁴² Prie D, Huart V, Bakouh N et al. Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med* 2002;347:983–91.
- ⁴³ Kutluturk F, Temel B, Uslu B, Aral F, Azezli A, Orhan Y, et al. An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and G227R mutation of Paracellin-1. *Horm Res* 2006;66:175-81.
- ⁴⁴ Scheinman SJ, Cox JPD, Lloyd SE, Pearce SH, Salenger PV, Hoopes RR, et al. Isolated hypercalciuria with mutation in CLCN5: relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int* 2000;57:232-39.
- ⁴⁵ Lapointe JY, Tessier J, Paquette Y, Wallendorff B, Coady MJ, Pichette V, et al. NPT2a gene variation in calcium nephrolithiasis with renal phosphate leak. *Kidney Int* 2006;69:2261-67.
- ⁴⁶ Nishijima S, Sugaya K, Naito A, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis. *J Urol* 2002;167:2188-91.
- ⁴⁷ Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ. Association of the vitamin D receptor gene start codon Fok I polymorphism with calcium oxalate stone disease. *BJU Int* 2001;87:168-71.
- ⁴⁸ Chen HY, Hsu CD, Wu JY, Tsai FJ. No association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms with calcium oxalate stone formation. *Mol Urol* 2001;5:7-10.
- ⁴⁹ Relan V, Khullar M, Singh SK, Sharma SK. Association of vitamin D receptor genotypes with calcium excretion in nephrolithiatic subjects in northern India. *Urol Res* 2004;32: 236-240.
- ⁵⁰ Mossetti G, Rendina D, Manno G, Guadagno V, Strazzullo P, Nunziata V. The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2259-65.
- ⁵¹ Mossetti G, Vuotto P, Rendina D, Numis FG, Viceconti R, Giordano F, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis. *J Intern Med* 2003;253:194–200.
- ⁵² Chen WC, Wu HC, Chen HY, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones. *Urol Res* 2001;29:321-24.

-
- ⁵³ Tsai FJ, Lin CC, Lu HF, Chen HY, Chen WC. Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis. *Urology* 2002;59:458-61.
- ⁵⁴ Tsai FJ, Wu HC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Chen WC. Association of E-cadherin gene 3-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urol Int* 2003;70:278-81.
- ⁵⁵ Chen WC, Chen HY, Wu HC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease. *Urol Res* 2003;31:218-22.
- ⁵⁶ Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Gambaro G, Milanese L, Mosca E, Soldati L; GENIAL network (Genetics and Environment in Nephrolithiasis Italian Alliance). Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Jul;25(7):2245-52. Epub 2010 Jan 12.
- ⁵⁷ Hurwitz S. "Homeostatic control of plasma calcium concentration". *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1996 Feb; 31(1):41-100.
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ 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.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ Hofer AM and Brown EM. "Extracellular calcium sensing and signaling". *Nature Rev Mol Cell Biol*, 4: 530-538, 2003.
- ⁶² 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.
- ⁶³ Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signaling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003;4:530-38.
- ⁶⁴ Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001;81(1):239-97.
- ⁶⁵ Bai M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 2004;35:197-207.
- ⁶⁶ Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. *J Biol Chem* 2002;277(33):30337-50.
- ⁶⁷ Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1b. *J Biol Chem* 2005;280(14):14177-88.
- ⁶⁸ Canaff L, Hendy GN. Human Calcium Sensing Receptor gene: vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem* 2002;277:30337-50.
- ⁶⁹ Bradbury RA, Sunn KL, Crosslet M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, et al. Expression of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. *J Endocrinol* 1998;156:425-430.

-
- ⁷⁰ 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* 2001;18:411-21.
- ⁷¹ Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratocyte differentiation. *J Biol Chem* 1998;273:23344-52.
- ⁷² Goldsmith PK, Fan GF, Ray K, Shiloach J, McPhie P, Rogers KV, et al. Expression, purification and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium sensing receptor. *J Biol Chem* 1999;274(16):11303-09.
- ⁷³ Fan GF, Goldsmith PK, Collins R, Dunn CK, Krapcho KJ, Rogers KV, et al. *N*-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface. *Endocrinology* 1997;138:1916-22.
- ⁷⁴ 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. Implications for function of monomeric Ca²⁺ receptor. *J Biol Chem* 1999;274:27642-50.
- ⁷⁵ 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* 2004;279(14):14147-56.
- ⁷⁶ O'Hara PJ, Sheppard PO, Thorgersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 1993;11:41-52.
- ⁷⁷ Conklin BR, Bourne HR. Marriage of the flytrap and the serpent. *Nature* 1994;367:22.
- ⁷⁸ Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PT, Spiegel AM. Human Ca²⁺ receptor extracellular domain. *J Biol Chem* 2001;276(34):32145-51.
- ⁷⁹ Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM. Identification of the sites of *N*-glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem* 1998;273:34558-67.
- ⁸⁰ Hammerland LG, Krapcho KJ, Garret JE, Alasti N, Hung BC, Simin RT, et al. Domain determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors. *Mol Pharmacol* 1999;55:642-48.
- ⁸¹ Brauner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard P, O'Hara P, Krosggaard-Larsen P. The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. *J Biol Chem* 1999;274:18382-86.
- ⁸² Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor. *J Biol Chem* 1996;271:19537-45.
- ⁸³ Fan GF, Ray K, Zhao XM, Goldsmith PK, Spiegel AM. Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. *FEBS Lett* 1998;436:353-6.
- ⁸⁴ Ray K, Adipetro KA, Chen C, Northup JK. Elucidation of the role of peptide linker in the Calcium-Sensing receptor activation process. *J Biol Chem* 2007;282:5310-7.

-
- ⁸⁵ Ray K, Northup J. Evidence for distinct cation and calcimimetic compound (NPS 568) recognition domains in the transmembrane regions of the human Ca^{2+} receptor. *J Biol Chem* 2002;277:18908-13.
- ⁸⁶ Hu J, Reyes-Cruz G, Chen W, Jacobson KA, Spiegel AM. Identification of acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} receptor critical for response to Ca^{2+} and a positive allosteric modulator. *J Biol Chem* 2002;277:46622-31.
- ⁸⁷ 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* 2004;279(8):7254-63.
- ⁸⁸ Hu J, McLarnon SJ, Mora S, Jiang J, Thomas C, Jacobson KA, et al. A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} -receptor critical for response to Ca^{2+} . *J Biol Chem* 2005;280(6):5113-20.
- ⁸⁹ Chang W, Chen TH, Pratt S, Shoback D. Amino acids in the second and third intracellular loop of the parathyroid Ca^{2+} -sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 2000;275:19955-63.
- ⁹⁰ Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 1998;80:231-64.
- ⁹¹ 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* 1998;273:23605-10.
- ⁹² Bai M, Janjic N, Trivedi S, Quinn S, Cole DEC, Brown EM, et al. 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* 1997;99:1917-25.
- ⁹³ 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* 1997;272:31355-61.
- ⁹⁴ Bai M, Trivedi S, Lane CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown EM. Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca^{2+} store release. *J Biol Chem* 1998;273(33):21267-75.
- ⁹⁵ Jiang YF, Zhang Z, Kifor O, Lane CR, Quinn SJ, Bai M. Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with CaR cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 2002;277:50543-49.
- ⁹⁶ Ward DT. Calcium receptor-mediated intracellular signaling. *Cell Calcium* 2004;35:217-28.
- ⁹⁷ Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem* 2001;276:34871-79.
- ⁹⁸ Hjalms G, MacLeod RJ, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. Filamin-A binds carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2001;276:34880-87.
- ⁹⁹ Bruce JIE, Yang X, Ferguson CJ, Elliott AC, Steward MC, Case RM, et al. Molecular and functional identification of a Ca^{2+} (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *J Biol Chem* 1999;274:20561-68.

-
- ¹⁰⁰ Gama L, Breitwieser GE. A carboxyl-terminal domain controls the cooperativity for extracellular Ca²⁺ activation of the human calcium sensing receptor. *J Biol Chem* 1998;273(45):29712-18.
- ¹⁰¹ 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 Miner Res* 1997;12:715-25.
- ¹⁰² Huang C, Handlogten ME, Miller RT. Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by extracellular calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2002;277:20293-20300.
- ¹⁰³ Crespo P, Xu N, Simonds W, Gutkind J. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1994;369:418-20.
- ¹⁰⁴ 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 -gamma activation of p21 Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12706-10.
- ¹⁰⁵ MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Brown EM. PTHrP stimulated by the calcium-sensing receptor requires MAP kinase activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E435-E42.
- ¹⁰⁶ Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:538-41.
- ¹⁰⁷ Bosel J, John M, Freichel M, Blind E. Signaling of the human calcium-sensing receptor expressed in HEK293-cells is modulated by protein kinases A and C. *Exp Clin Endoc Diabet* 2003;111:21-26.
- ¹⁰⁸ Usachev YM, DeMarco SJ, Campbell C, Strehler EE, Thayer SA. Bradykinin and ATP accelerate Ca²⁺ efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4. *Neuron* 2002;33:113-22.
- ¹⁰⁹ Young SH, Rozengurt E. Amino acids and Ca²⁺ stimulate different patterns of Ca²⁺ oscillations through the Ca²⁺-sensing receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1414-C22.
- ¹¹⁰ Young SH, Wu SV, Rozengurt E. Ca²⁺-stimulated Ca²⁺ oscillations produced by the Ca²⁺-sensing receptor require negative feedback by protein kinase C. *J Biol Chem* 2002;277(49):46871-76.
- ¹¹¹ Breitwieser GE, Gama L. Calcium-sensing receptor activation induces intracellular calcium oscillations. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1412-C21.
- ¹¹² 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* 2002;277:49691-99.
- ¹¹³ Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E. Amino acid-stimulated Ca²⁺ oscillations produced by the Ca²⁺-sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G₁₂, Rho, Filamin-A, and the Actin activation. *J Biol Chem* 2005;280:22875-82.
- ¹¹⁴ Kifor O, Diaz R, Butters RR, Kifor I, Brown EM. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem* 1998;273:21708-13.

-
- ¹¹⁵ 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* 2000;11:325-337.
- ¹¹⁶ Zatz M, Starling A. Mechanisms of disease: calpains and disease. *N Eng J Med* 2005;352(23):2413-23.
- ¹¹⁷ Kifor O, Kifor I, Moore FD, Butters RR, Brown EM. m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradation of the CaR. *J Biol Chem* 2003;278(33):31167-76.
- ¹¹⁸ Quinn SJ, Ye CP, Diaz P, Kifor O, Bai M, Vassilev P, et al. The Ca²⁺-sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol* 1997;273:C1315-23.
- ¹¹⁹ Breitwieser GE, Miedlich SU, Zhang M. Calcium sensing receptors as integrators of multiple metabolic signals. *Cell Calcium* 2004;35:209-16.
- ¹²⁰ Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42(1):35-70.
- ¹²¹ Hebert SC. Therapeutic use of calcimimetics. *Annu Rev Med* 2006;57:349-64.
- ¹²² Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. Calcium-dependent activation of Ca²⁺ sensing receptor by aromatic amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4814-19.
- ¹²³ Conigrave AD, Franks AH, Brown EM, Quinn SJ. L-amino acid sensing by the calcium-sensing receptor: a general mechanism for coupling protein and calcium metabolism? *Eur J Clin Nutr* 2002;56:1072-80.
- ¹²⁴ Quinn SJ, Bai M, Brown EM. pH sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004;279(36):37241-49.
- ¹²⁵ Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BCP, Van Wagenen BC, DelMar EG. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:4040-45.
- ¹²⁶ Nemeth EF, DelMar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conlin RL, et al. Calcilytic compounds: potent and selective Ca receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. *J Pharm Exp Ther* 2001;299:323-31.
- ¹²⁷ Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F367-76.
- ¹²⁸ Riccardi D, Gamba G. The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease. *Arch Med Res* 1999;30:436-48.
- ¹²⁹ 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* 1998;83:2765-72.
- ¹³⁰ Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, et al. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 1995;136:5202-11.
- ¹³¹ 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. *Endocrinology* 1996;137:3842-48.

-
- ¹³² 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* 1997;502:31-44.
- ¹³³ 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.
- ¹³⁴ 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.
- ¹³⁵ 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.
- ¹³⁶ 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.
- ¹³⁷ 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.
- ¹³⁸ 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.
- ¹³⁹ Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 15-26.
- ¹⁴⁰ Ward DT, Riccardi D. Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Eur J Physiol* 2002;445:169-76.
- ¹⁴¹ 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.
- ¹⁴² 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.
- ¹⁴³ Pi M, Quarles LD. Osteoblast calcium-sensing receptor has characteristics of ANF/7TM receptors. *J Cell Biochem* 2005;95:1081-92.
- ¹⁴⁴ 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.
- ¹⁴⁵ 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* 1995;92:3161-65.
- ¹⁴⁶ Ye C, Rogers K, Bai M, Quinn SJ, Brown EM, Vassilev PM. Agonists of the Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) activate nonselective cation channels in HEK293 cells stably transfected with the human CaR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:572-79.

-
- ¹⁴⁷ Chattopadhyay N, Ye C, Singh DP, Kifor O, Vassilev PM, Shinohara T, et al. Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens epithelium cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:801-05.
- ¹⁴⁸ House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Leboff MS, et al. Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. *J Bone Miner Res* 1997;12(12):1959-70.
- ¹⁴⁹ Yamaguchi T, Olozak I, Chattopadhyay N, Butters RR, Kifor O, Scadden DT, et al. Expression of extracellular calcium Ca^{2+} -sensing receptor in human peripheral blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:501-06.
- ¹⁵⁰ Kirchoff P, Geibel JP. Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology. *World J Gastroenterol* 2006;12(20):3229-36.
- ¹⁵¹ Pollak MR, Brown EM, Chou YHW, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, et al. Mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 1993;75:1297-1303.
- ¹⁵² 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* 1996;98(8):1860-66.
- ¹⁵³ Bai M, Quinn SJ, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in human Ca^{2+} -sensing receptor. *J Biol Chem* 1996;271(32):19537-45.
- ¹⁵⁴ Heath H III, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, et al. Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(4):1312-17.
- ¹⁵⁵ Kristiansen JH, Rodbro P, Christiansen C, Johansen J, Jensen JT. Familial hypocalciuric hypercalcemia III: Bone mineral metabolism. *Clin Endocrinol* 1987; 26:713-6.
- ¹⁵⁶ Pearce SHS, Wooding C, Davies M, Tollefsen SE, Whyte MP, Thakker RV. Calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia with recurrent pancreatitis. *Clin Endocrinol* 1996; 45:675-80.
- ¹⁵⁷ Cole DEC, Forsythe CR, Dooley JM, Grantmyre EB, Salisbury SR. Primary neonatal hyperparathyroidism: a devastating neurodevelopmental disorder if left untreated. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1990; 10:205-14.
- ¹⁵⁸ Pollak MR, Seidman CE, Brown EM. Three inherited disorders of calcium sensing. *Medicine (Baltimore)* 1996;75(3):115-23.
- ¹⁵⁹ Thakker RV. Disorders of the calcium-sensing receptor. *Biochim Biophys Acta* 1998;1448:166-70.
- ¹⁶⁰ 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 caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 60-72.
- ¹⁶¹ Brown EM. Anti-parathyroid and anti-calcium-sensing receptor antibodies in autoimmune hyperparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009; 38: 437-445.

-
- ¹⁶² Hosokawa Y, Pollak MR, Brown ER, Arnold A. Mutational analysis of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(11):3107-10.
- ¹⁶³ 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.
- ¹⁶⁴ Miedlich S, Krohn K, Paschke R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):539-54.
- ¹⁶⁵ 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.
- ¹⁶⁶ Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of b-catenin/TCF activation. *Cancer Res* 2003;63:67-71.
- ¹⁶⁷ 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* 2000;24:127-36.
- ¹⁶⁸ 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* 2003;13:551-59.
- ¹⁶⁹ Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. Ca²⁺-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(6):E1267-74.
- ¹⁷⁰ Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Butters RR, Brown EM. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 2000;141:4357-64.
- ¹⁷¹ Guise TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 2000;88:2893-98.
- ¹⁷² Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, et al Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 1996;98(7):1544-9.
- ¹⁷³ Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, et al. Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res*. 1991;51(11):3059-61.
- ¹⁷⁴ Guise TA The vicious cycle of bone metastases. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002 Dec;2(6):570-2.
- ¹⁷⁵ 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*. 2006;290:761-70.
- ¹⁷⁶ Rubin LA, Peltekova V, Janicic N, Liew CC, Hwang D, Evrovski J, et al. Calcium sensing receptor gene: analysis of polymorphism frequency. *Scand J Clin Invest* 1997;57 (suppl 227):122-25.

-
- ¹⁷⁷ 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* 2001;72:168-74.
- ¹⁷⁸ Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S, Muscarella LA, Battista C, D'Agruma L, et al. Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5634-38.
- ¹⁷⁹ Vezzoli G, Terranegra A, Arcidicono T, Biasion R, Coviello D, Syren ML, et al. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney Int* 2007;71:1155-62.
- ¹⁸⁰ Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, Saelli P, Vezzoli G, Arcidiacono T, et al. The A990G polymorphism of calcium sensing receptor gene (CaSR) is associated with nephrolithiasis in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT). *Eur J Endocrinol* 2006;155:685-90.
- ¹⁸¹ Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Yano S, Kanzawa M, Kobayashi A, et al. Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrin* 2001;55: 373-79.
- ¹⁸² Yano S, Sugimoto T, Kanzawa M, Tsukamoto T, Hattori T, Hattori S, et al. Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients. *Nephron* 2000;85:317-23.
- ¹⁸³ 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* 2000;13:654-58.
- ¹⁸⁴ Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Goureau Y, Sarfait E et al. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1997;51:328-36.
- ¹⁸⁵ Chakravarti B, Dwivedi SKD, Mithal A, Chattopadhyay N. Calcium-sensing receptor in cancer: good cop or bad cop? *Endocrine* 2008;35:271-84.
- ¹⁸⁶ Bushinsky DA, Monk RD. Electrolyte quintet: Calcium. *Lancet* 1998;352(9124):306-11.
- ¹⁸⁷ Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest* 2003;111:602-605.
- ¹⁸⁸ Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Gambaro G, Milanesi L, Mosca E, Soldati L and on behalf of GENIAL network (genetic and Environment in Nephrolithiasis Italian Alliance). Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:2245-2252.
- ¹⁸⁹ Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaart S, van der Kemp AW, Nowik M, Timmermans K, Doucet A, Wagner CA, Bindels RJ, Hoenderop JG. The calcium sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20: 1705-1713.
- ¹⁹⁰ Kawata T, Nagano N, Obi M, Miyata S, Koyama C, Kobayashi N, Wakita S, Wada M. Cinacalcet suppresses calcification of the aorta and heart in uremic rats. *Kidney Int.* 2008 Nov;74(10):1270-7.
- ¹⁹¹ Raggi P, Chertow GM, Torres PU, Csiky B, Naso A, Nossuli K, Moustafa M, Goodman WG, Lopez N, Downey G, Dehmel B, Floege J. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011, 26: 1327–1339.

¹⁹² Block GA, Zaun D, Smits G, Persky M, Brillhart S, Nieman K, Liu J, St Peter WL. Cinacalcet hydrochloride treatment significantly improves all-cause and cardiovascular survival in a large cohort of hemodialysis patients. *Kidney Int* 2010; 78: 578–589.

¹⁹³ 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.

Ringraziamenti

Proprio qui, nell'ultima pagina, nel posto più difficile da raggiungere lo devo confessare: da solo non ce l'avrei fatta. Questo lavoro è il frutto di aiuti scientifici e sociali intensi, ripetuti e costanti. Una "maratona" durata 3 anni in cui ogni sostegno, in ogni sua forma, ha reso il cammino più agevole e facile.

Ringrazio la Prof.ssa Soldati, o semplicemente Laura, per la disponibilità e la comprensione ma soprattutto per aver provato ad insegnarmi l'inglese e.....l'italiano.

Ringrazio Annalisa dispensatrice di ammonimenti per ogni situazione: alimentare, comportamentale o lavorativa ma che ha contribuito ad un miglioramento a 360°.

Ringrazio ogni singolo elemento del gruppo Vezzoli-Soldati per i contributi al lavoro ed alla persona.

Ringrazio Mario e Rino (famiglia carugatese) per l'assistenza domestica e morale. Il legame indissolubile con le origini.

Infine, ringrazio la mia famiglia per la costante presenza che mi da sempre forza e coraggio. Nonni, zii e genitori sono per me modello a cui aspirare. Ringrazio anche Raffaella (mia sorella) per evitare polemiche e per quieto vivere!