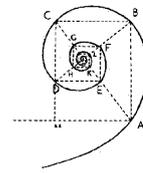




UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVIII
Anno Accademico 2014/2015

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
MED/49

**RUOLO DELLA FILAMINA A NEI TUMORI PARATIROIDEI UMANI
E
IL SUO EFFETTO SULL'ATTIVITA' DEL CALCIUM SENSING
RECEPTOR**

Dottorando : Caterina BRASACCHIO
Matricola N° R10173

TUTORE: Dott.ssa Laura SOLDATI

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

Introduzione: I tumori della paratiroide sono caratterizzati a livello clinico da una ipersecrezione di paratormone (PTH) da parte delle ghiandole paratiroidi le quali diventano meno sensibili alle variazioni extracellulari di calcio. Ciò è dovuto ad una minore sensibilità al calcio da parte del calcium-sensing receptor (CASR), un recettore presente sulla membrana apicale delle paratiroidi coinvolto nell'omeostasi del calcio e quindi in grado di avvertire i cambiamenti della concentrazione degli ioni calcio. In questi tipi di tumori, infatti, il CASR si è visto essere down-regolato, ma ciò non sembra essere dovuto né a mutazioni inattivanti del gene CASR, né ad una ipermetilazione del promotore del gene. Pertanto si è ipotizzato che potesse essere coinvolta in questo pathway un'altra proteina, la Filamina A (FLNA), la quale è nota interagire con il CASR a livello della sua porzione C-terminale nei residui 907-997, partecipando alla stabilizzazione del recettore nella membrana. Proprio a livello di questi residui del CASR è stato individuato un polimorfismo non conservativo, Arg990Gly che causa al recettore un guadagno di funzione, una maggiore sensibilità al calciomimetico, R-568 ed una differente propagazione del segnale rispetto al CASR wild-type.

Scopo: Indagare il ruolo della FLNA nei tessuti tumorali paratiroidi umani (adenomi e carcinomi) e valutare l'interazione tra FLNA e CASR, sia wild-type che polimorfico, in assenza ed in presenza del calciomimetico R-568.

Materiali e Metodi: Le espressioni della FLNA e del CASR sono state valutate con tecniche di immunofluorescenza e immunoistochimica in adenomi e carcinomi umani della paratiroide, e con tecniche di immunofluorescenza in cellule embrionali renali umane in coltura (HEK-293). I livelli di mRNA di CASR e FLNA sono stati misurati con Real-Time PCR in 74 adenomi della paratiroide; gli stessi campioni di adenomi paratiroidi sono stati genotipizzati per lo SNP R990G utilizzando la tecnica Taqman genotyping assay. La FLNA è stata silenziata con uno specifico Short interfering RNA in cellule HEK-293 contemporaneamente trasfettate con il CaSR wild-type o polimorfico. L'attività del recettore è stata valutata misurando l'attività di ERK 1/2 tramite Western blot, sia in assenza che in presenza di R-568.

Risultati: L'immunoistochimica di adenomi e carcinomi della paratiroide ha mostrato una diminuzione dell'espressione della FLNA correlata al grado di malignità tumorale. I livelli di mRNA di FLNA e CASR sono risultati variabili a seconda del tessuto adenomatoso analizzato ma positivamente correlati ($r^2=0.223$ $P<0.0001$). La correlazione tra i livelli di mRNA del CASR e della FLNA e l'allele minore dello SNP R990G non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi (AG e GG) anche se è stato osservato un trend di associazione tra l'allele minore 990G ed un maggiore livello di espressione del gene CASR rispetto alla variante allelica 990R (wild-type). In accordo con questi dati, l'analisi di correlazione genotipo-fenotipo ha mostrato ridotti livelli sierici di PTH in pazienti portatori dell'allele minore. I dati di Western Blot hanno mostrato una diminuzione sia dell'espressione sia dell'attività di entrambe le forme recettoriali (CASR WT e CASR R990G) in assenza di FLNA ($p<0.001$ e $p<0.05$ rispettivamente). La presenza del calciomimetico R-568 sembrerebbe mascherare le differenze in assenza di FLNA, mantenendo il guadagno di funzione del CASR R990G.

Conclusioni: Nei tumori delle paratiroidi sia FLNA che CASR risultano down-regolati e i loro livelli di espressione sono positivamente correlati. In particolare, il trend di associazione tra l'espressione dell'mRNA della FLNA e della CASR con il polimorfismo R990G ci porta ad ipotizzare un ruolo protettivo di questo SNP nei tumori delle paratiroidi, con un meccanismo ancora sconosciuto. Inoltre, questo studio ci ha permesso di dimostrare che la FLNA è necessaria per l'attivazione del pathway di ERK1/2 attivato sia dal CASR Wild-Type che polimorfico, anche se in presenza di R-568 la FLNA non sembra essere fondamentale per l'attivazione del pathway.

ABSTRACT

Introduction: Parathyroid tumors are clinically characterized by parathormone (PTH) hypersecretion from the parathyroid glands which become less sensitive to extracellular variations of calcium. This caused by a decreased sensitivity to calcium by the calcium-sensing receptor (CASR), a receptor expressed on the apical membrane of parathyroid glands involved in the calcium homeostasis and able to sense changes of extracellular calcium ions. In fact, in these kind of tumours the CASR was down-regulated, but this does not seem to be due either to activating mutations of the CASR gene nor to a promoter hypermethylation of the gene. Therefore, our hypothesis was that it could be involved in this pathway another protein, Filamin A (FLNA), which is known to interact with the CASR at its C-terminal portion at level of 907-997 residues taking part in the stabilization of the receptor in the membrane. Just at level of these residues of CASR, it has been identified a non-conservative polymorphism Arg990Gly leading to a gain of function, an increased sensibility to calcimimetic R-568 and a different pathway than CASR wild-type.

Aim: To investigate the role of FLNA in human parathyroid tumour tissues (adenomas and carcinomas) and to evaluate the interaction between FLNA and CASR, both wild-type and polymorphic, in absence or presence of calcimimetic R-568.

Materials and Methods: The expression of FLNA and CASR was evaluated by immunofluorescence and immunohistochemistry in parathyroid adenomas and carcinomas, and by immunofluorescence in HEK-293 cells. CASR and FLNA mRNA levels were measured with Real-Time PCR in 74 parathyroid adenomas; parathyroid adenomas of the same samples were genotyped for the SNP R990G using the technique Taqman genotyping assay. FLNA was silenced with a Short interfering RNA in human embryonic kidney cells (HEK-293) transfected with wild-type or polymorphic CASR. The CASR activity was assessed by measuring the activity of ERK 1/2 by Western blot, both in absence or presence of calcimimetic R-568.

Results: Immunohistochemistry of parathyroid adenomas and carcinomas showed a decrease of FLNA expression related to the degree of tumour malignancy. FLNA and CASR mRNA levels were variable in relation to adenoma tissue analysed, but its were positively correlated ($r^2=0.223$ $P<0.0001$). The correlation between FLNA and CASR mRNA levels and the minor allele 990G did not shown significant differences among two groups (AG and GG), but it was observed a trend between the minor allele 990G and the higher expression of CASR than major allele 990R (wild-type). In agreement with these data, the genotype-phenotype correlation analysis showed serum PTH levels reduced in patients carriers of the minor. Western Blot data showed a decrease of expression and activity in both forms of the receptor (WT CASR and R990G CASR) in the absence of FLNA ($p<0.001$ and $p<0.05$ respectively). The presence of calcimimetic R-568 seems to hide the differences in absence of FLNA, taking the gain of function of the CASR R990G.

Conclusions: In human parathyroid tumours both FLNA and CASR were down-regulated and their mRNA levels were positive correlated. In particular, the trend observed between FLNA and CASR990G mRNA expression level could indicate a

potential protective role of this SNP in parathyroid tumours, with a yet unknown mechanism. Furthermore, this study allowed us to show that FLNA is required for the activation of ERK 1/2 pathway activated both by CASR wild-type and polymorphic, even if in presence of R-568 the FLNA seems not to be necessary for the pathway activation.

INDICE

SOMMARIO

ABSTRACT

LISTA SIMBOLI

1. INTRODUZIONE

<i>1.1 I tumori paratiroidei: definizione, epidemiologia ed eziologia</i>	2
<i>1.2 Tipi di tumore paratiroideo</i>	3
<i>1.2.1 Adenoma della paratiroide</i>	3
<i>1.2.2 Carcinoma paratiroideo</i>	4
<i>1.3 Le paratiroidi: anatomia e fisiologia</i>	5
<i>1.4 Il Calcium sensing Receptor (CASR)</i>	8
<i>1.5 Espressione tissutale del CASR</i>	12
I) <i>Paratiroide</i>	
II) <i>Tiroide</i>	
III) <i>Rene</i>	
IV) <i>Ossa</i>	
V) <i>Apparato gastro-enterico</i>	
VI) <i>Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio</i>	
<i>1.6 Struttura del gene CASR</i>	20
<i>1.7 I polimorfismi del CASR</i>	21

1.8 Fisiopatologia del CASR	23
I) Malattie monogeniche	
II) Malattie complesse	
1.9 Il CASR come target farmacologico: il CASR e i calciomimetici	27
1.10 Pathway di segnalazione del CASR	29
1.11 La Filamina A (FLNA)	38
1.12 La Filamina A nei tumori	40
2. SCOPO DELLA TESI	
2.1 Obiettivo dello studio	42
3. MATERIALI E METODI	
3.1. Tessuti paratiroidei	44
3.2. Colture cellulari di adenoma paratiroideo ed HEK-293	44
3.3. Genotipizzazione	45
3.4. Immunoistochimica (IH) della Filamina A	45
3.5. Immunofluorescenza (IF) di CaSR e FLNA	46
3.6. Quantitative real time PCR	46

3.7. Trasfezione transiente	47
3.8. Silenziamento genico (RNA interference)	48
3.9. Co-trasfezione FLNA siRNA e plasmide CASR	48
3.10. Western Blot	49
3.11. Analisi Statistica	50
4. RISULTATI	
4.1 Espressione della Filamina A in tessuti tumorali paratiroidei	51
4.2 Espressione della Filamina A e del CaSR in cellule tumorali della paratiroide	54
4.3 Espressione dei livelli di mRNA di FLNA e CaSR in tessuti adenomatosi paratiroidei	56
4.4 Correlazione dei livelli di mRNA di FLNA e CaSR in presenza dello SNP R990G del CaSR nei tumori delle paratiroidi	57
4.5 Effetto del silenziamento della Filamina A sull'espressione del Calcium-sensing receptor	59

<i>4.6 Effetto del silenziamento della FLNA sull'attività del Calcium-sensing receptor</i>	63
5. DISCUSSIONE	67
6. CONCLUSIONI	73
7. BIBLIOGRAFIA	74
8. PRODOTTI SCIENTIFICI	99
8.1 PUBBLICAZIONI	
8.2 CONGRESSI NAZIONALI E INTERNAZIONALI	
9. RINGRAZIAMENTI	101

LISTA SIMBOLI

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

1. INTRODUZIONE

1.1 I TUMORI PARATIROIDEI: DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA

I tumori paratiroidi sono definiti come lesioni a carico delle paratiroidi. Queste possono essere benigne (**adenoma**) o maligne (**carcinoma**). Esistono, inoltre, patologie familiari dette Neoplasie Endocrine Multiple (MEN) in cui si riscontra una iperplasia di più di una paratiroide. Le paratiroidi, infine, possono essere interessate da lesioni benigne di tipo cistico, **cisti paratiroidi**⁽¹⁾.

I tumori delle paratiroidi sono spesso associati ad iperparatiroidismo primario (PHPT), un disordine endocrino caratterizzato a livello clinico da ipercalcemia, aumento dei livelli di paratormone (PTH) e disturbi del metabolismo osseo.

Il PHPT è il terzo disordine endocrino più diffuso nel mondo, seguito da diabete e disordini tiroidei, con una prevalenza dello 0,3% nella popolazione generale e del 2% nelle donne in menopausa ⁽²⁾. Il 60% dei pazienti affetti da PHPT sviluppa la forma tumorale benigna ovvero adenoma, il 20% sviluppa iperplasie multiple ghiandolari ed infine solo l'1-5% sviluppa la forma tumorale maligna, il carcinoma.

L'eziologia di questi tipi di neoplasia può essere idiopatica oppure genetica. Mostrano, infatti, una elevata variabilità nel loro background genetico. Geni oncosoppressori sono stati identificati nelle forme familiari di PHPT: mutazioni inattivanti dei geni CASR, GNA11 e AP2S1 sono state associate con le iperplasie paratiroidi nelle forme familiari di ipercalcemia ipocalciurica (HHC1, OMIN145980; HHC2, OMIN145981; HHC3, OMIN600740); mutazioni inattivanti del gene oncosoppressore MEN1 sono state correlate ad iperplasia paratiroidea nella sindrome neoplastica endocrina multipla di tipo I (MEN1, OMIN131100); mutazioni inattivanti del gene CDC73/HRPT2 sono state associate con lo sviluppo di adenoma paratiroideo nell'85% dei pazienti con hyperparathyroidism-jaw tumors

syndrome (HPT-JT) e con lo sviluppo di carcinoma paratiroideo nel 15% dei pazienti aventi tale sindrome (HPT-JT, OMIN145001). Inoltre, mutazioni attivanti dell'oncogene RET sono state correlate con iperplasia paratiroidea nella sindrome neoplastica endocrina multipla di tipo 2A (MEN2A, OMIN171400).

Da un punto di vista clinico i tumori paratiroidei si asportano chirurgicamente. In seguito alla paratirectomia, però, i pazienti sviluppano ipoparatiroidismo, endocrinopatia difficilmente controllabile in quanto potrebbe presentarsi in associazione ad una complessa sindrome autoimmune che comprende un'insufficienza renale, ovarica, del sistema immunitario e delle paratiroidei, insieme ad una candidosi mucocutanea ricorrente, alopecia, vitiligine e anemia perniciosa (³).

1.2 TIPI DI TUMORE PARATIROIDEO

1.2.1 ADENOMA DELLA PARATIROIIDE

Gli adenomi della paratiroide insorgono nelle donne e negli uomini con un rapporto di 3:1 e possono svilupparsi in ogni età, ma sono più frequenti nella quarta decade. L'adenoma è un tumore benigno dovuto ad una proliferazione neoplastica ex novo, che ipersecerne PTH e che determina quindi una sindrome da iperparatiroidismo primitivo. Macroscopicamente l'adenoma paratiroideo può essere grande da alcuni millimetri fino ad alcuni centimetri e raggiungere il peso di alcuni grammi. L'adenoma è circondato da una sottile capsula fibrosa e al taglio è di colorito giallo-brunastro. Nel 75% dei casi è coinvolta una delle paratiroidei inferiori; nel 15% dei casi è coinvolta una delle paratiroidei superiori e nel 10% dei casi circa vi è coinvolgimento di paratiroidei con localizzazione "anomala", esempio, intratiroidea o intramediastinica. All'esame istologico si riconosce la capsula che circonda il tumore; la proliferazione neoplastica può essere costituita da tutte e tre le popolazioni che formano la paratiroide e che sono

le cellule principali, le cellule ossifile e le cellule chiare. Occasionalmente può essere presente infiltrato linfocitario. Le altre paratiroidi sono normali o possono avere aspetto atrofico (sono più piccole del normale). L'atrofia è dovuta ad una ipersecrezione di PTH da parte dell'adenoma che inibisce la funzionalità delle altre paratiroidi che diventano quindi più piccole.

La terapia dell'adenoma è chirurgica e consiste nell'asportazione della ghiandola neoplastica.

Esistono due varianti dell'adenoma delle paratiroidi:

- *Adenoma ossifilo*: proliferazione neoplastica costituita esclusivamente dalle cellule ossifile. Generalmente questi tumori non producono PTH e quindi non determinano iperparatiroidismo.

- *Lipoadenoma*: è una rara forma nella quale la proliferazione neoplastica è composta da cellule della paratiroide commiste a tessuto adiposo maturo. La maggior parte dei casi producono PTH e quindi determinano iperparatiroidismo⁴.

1.2.2 CARCINOMA PARATIROIDEO

Il carcinoma delle paratiroidi è uno dei tumori più rari, che colpisce in egual misura gli uomini e le donne. Può insorgere ad ogni età ma il picco di incidenza è tra i 45 e i 50 anni (^{5,6}). Si presenta tipicamente con grave sindrome da ipersecrezione di PTH, con patologia ossea nel 76% dei casi e con disfunzione renale nel 26% dei casi. Clinicamente si ha un aumento sierico del PTH, la presenza di una lesione palpabile nel collo, talora alterazioni della voce per blocco delle corde vocali da parte del tumore.

Macroscopicamente il tumore si presenta come una neoformazione solida, che può raggiungere alcuni millimetri talora centimetri di diametro maggiore, fortemente adesa alla tiroide e che può infiltrare i tessuti cartilaginei ed ossei circostanti. Istologicamente il carcinoma si presenta

come una proliferazione di cellule atipiche (diverse dalla paratiroide normale) che sono intrappolate in tessuto fibroso; queste cellule maligne inoltre infiltrano la capsula della paratiroide e si estendono ai tessuti circostanti e invadono i vasi ematici e linfatici (⁷).

La terapia di questi tumori è chirurgica (asportazione della paratiroide neoplastica e del lobo tiroideo omolaterale, i tessuti molli limitrofi interessati e i linfonodi), associata a radioterapia. L'eziopatogenesi del carcinoma delle paratiroidi resta ancora in larga parte sconosciuta e sono stati identificati solo pochi fattori che potrebbero essere (⁸) associati alla malattia.

1.3 LE PARATIROIDI: ANATOMIA E FISIOLOGIA

Le paratiroidi sono quattro ghiandole endocrine, divise in due superiori, situate dietro la tiroide, e due inferiori, localizzate fra i rami dell'arteria tiroidea inferiore. Hanno forma di disco, misurano pochi millimetri e pesano circa 35 mg. Sono costituite da tessuto epiteliale ghiandolare, irrorato da numerosi capillari e rivestito da una capsula di tessuto connettivale. Istologicamente le cellule delle paratiroidi vengono distinte in: **principali**, piccole e di forma poliedrica; **chiare**, relativamente grandi e con nucleo intensamente colorabile; **ossifile**, ripiene di granuli acidofili (⁹).

Le ghiandole paratiroidee producono il paratormone (PTH), una proteina di 84 aminoacidi, prodotta a partire da un precursore inattivo di 115 aminoacidi, detto ormone preparatiroideo. A livello del reticolo endoplasmatico rugoso esso subisce un taglio proteolitico ad opera di enzimi che tagliano il precursore generando una 'sequenza leader', la quale sembra avere il ruolo di dirigere l'ormone in via di attivazione attraverso la membrana del reticolo verso la fase successiva, che consiste nel distacco di ulteriori 6 aminoacidi terminali e nella formazione

dell'ormone paratiroideo. Nell'apparato del Golgi questo si trasforma, ad opera di un enzima proteolitico, nella forma attiva che, trasportata nei granuli presenti nelle cellule principali, viene riversata nel torrente ematico insieme ai frammenti aminoacidici precedentemente distaccati nel meccanismo di attivazione.

La funzione principale del PTH è quella di mantenere la concentrazione del calcio extracellulare entro uno stretto intervallo di normalità (1,9-2 mmol/l). Il calcio è un elemento chiave nell'omeostasi dell'organismo: il calcio intracellulare funziona come secondo messaggero e cofattore per molte proteine ed enzimi; il calcio extracellulare è cofattore delle molecole di adesione, regola l'eccitabilità dei neuroni, ed è parte essenziale della fase minerale ossea. In un essere umano il coefficiente di variazione del calcio plasmatico ionizzato è circa del 2%, grazie alla capacità delle paratiroidi di sentire anche minime variazioni di calcio ed attivare il meccanismo che le elimini.

In caso di riduzione di calcio plasmatico (ipocalcemia), si verifica una secrezione di PTH che stimola il riassorbimento tubulare di calcio dal rene, il riassorbimento osseo e la produzione della forma attiva di vitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] che fa aumentare l'assorbimento intestinale di calcio. Al contrario, nel caso in cui si verifichi un aumento di calcio (ipercalcemia), la tiroide secreta calcitonina che fa scendere i livelli di calcio plasmatici, inibendo il riassorbimento osseo ed accelerando l'escrezione di calcio; contemporaneamente la secrezione di PTH viene inibita. Questo feedback è il meccanismo critico dell'omeostasi del calcio nel liquido extracellulare. Qualsiasi tendenza ad una ipocalcemia è quindi contrastata da un aumento nella secrezione del PTH. In particolare, il PTH ha molteplici azioni sull'osso e gli effetti a lungo termine sono rappresentati da un aumento numerico delle cellule ossee, sia osteoblasti che osteoclasti, e da un'augmentata velocità di rimodellamento osseo. Nel rene, invece, il PTH

agisce inibendo il trasporto dei fosfati a livello del tubulo contorto prossimale, aumentando il riassorbimento del calcio a livello del tubulo contorto distale e, infine, stimolando l'attività della 25(OH)D-1 α -idrossilasi renale ⁽¹⁾.

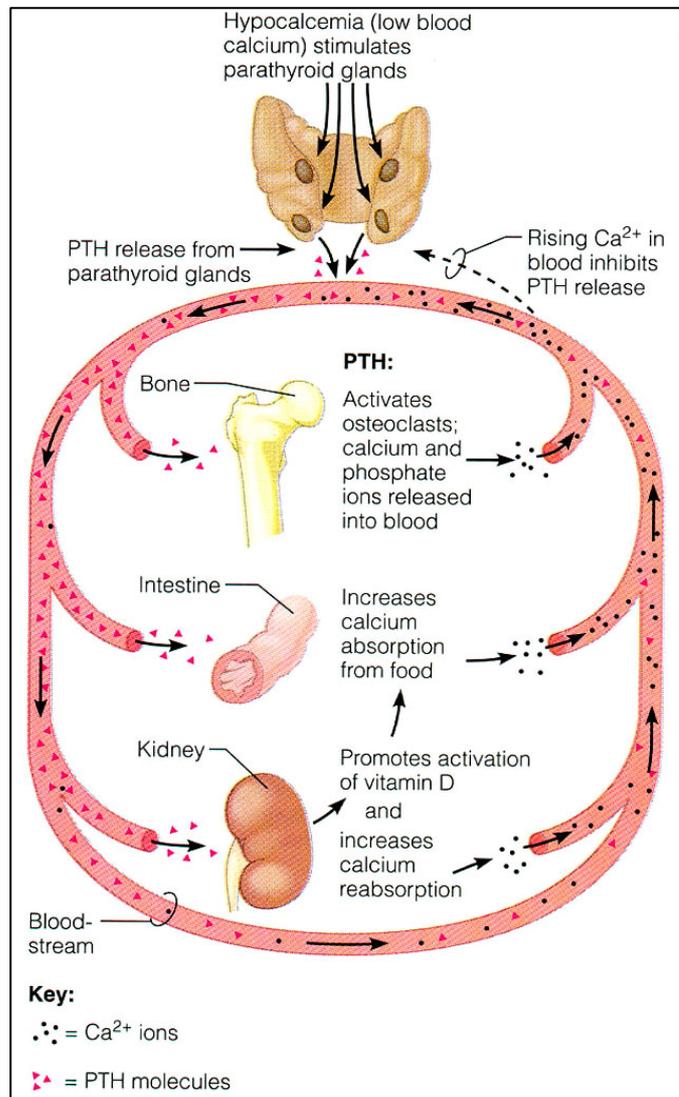


Figura 1: Fisiologia delle ghiandole paratiroidi. PTH=paratormone

1.4 IL CALCIUM-SENSING RECEPTOR (CASR)

Le ghiandole paratiroidi sono sensibili alle variazioni di calcio extracellulare grazie alla presenza sulla membrana plasmatica del Calcium-sensing receptor (CASR), un recettore che avverte tali variazioni e che regola la secrezione di PTH.

Nel 1995 il CASR è stato identificato nelle paratiroidi e nel rene umano (^{10,11}). Studi successivi hanno dimostrato che il recettore ha un'ampia distribuzione tra le specie: lo troviamo in uccelli, rettili, anfibi e mammiferi. Inoltre sembra avere un'origine ancestrale comune: lo si ritrova infatti con un'alta omologia in organismi come i pesci dove il recettore può essere utile non solo nel mantenere l'omeostasi del calcio, ma anche per l'orientamento tra le correnti saline del mare, essendo presente in organi olfattivi, come l'organo vomero-nasale nel pesce palla (¹²). Il CASR fa parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), in particolare della famiglia C, dipendenti dalla fosfolipasi C (PLC) causando un accumulo di inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3) e un rapido rilascio di ioni calcio. Questo incremento in $[Ca^{2+}]_i$ porta all'attivazione della protein chinasi C (PKC) e del pathway delle MAPK (mitogen-activated protein kinase) [¹³]. Il recettore maturo è costituito da 1078 aminoacidi (aa) che formano i 3 domini funzionali: l'ampio dominio N-terminale (612 aa), localizzato nella porzione extracellulare (extracellular domain, ECD), sede del sito di legame per il calcio; il dominio transmembrana (TMD), costituito da 7 eliche idrofobiche (250 aa), che ancora il recettore alla membrana, ed il dominio C-terminale, nel versante citoplasmatico (216 aa), responsabile della trasmissione del segnale (³) (Figura 2). Sulla superficie cellulare la proteina funziona in forma dimerica. I monomeri sono connessi attraverso interazioni covalenti e non covalenti. Le analisi dei western blot del CASR hanno confermato la presenza di una banda di circa 120 kDa che corrisponde al monomero non glicosilato, di una banda di 140 kDa che

corrisponde al monomero glicosilato immaturo ed una banda di 160 kDa che corrisponde alla forma matura dello stato di glicosilazione (¹⁴, ¹⁵). Un'ulteriore banda di circa 250 kDa mostra la forma dimerica del recettore (¹⁶).

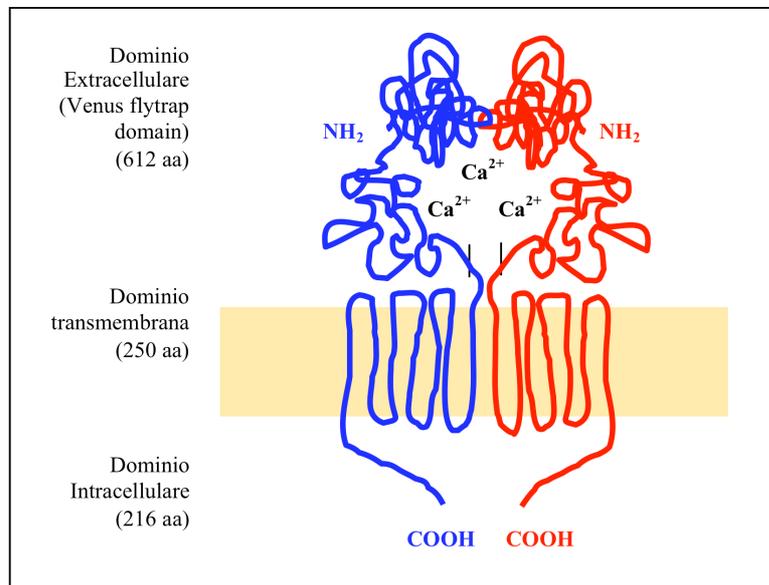


Figura 2. Struttura proteica del CASR: Il recettore funziona come dimerico e ogni elemento del dimerico è costituito da un ECD (sito di legame del calcio), un TMD e un dominio C-terminale.

Il CASR subisce una prima N-glicosilazione nel reticolo endoplasmatico (forma immatura da 140 kDa), viene poi trasportato all'apparato di Golgi dove subisce la glicosilazione definitiva (forma matura da 160 kDa), per poi essere trasportato sulla superficie cellulare. La glicosilazione può influenzare diverse funzioni in una proteina: folding, stabilità, traffico intracellulare, espressione cellulare e secrezione. Per quanto riguarda il CASR, sembra che l'N-glicosilazione sia fondamentale per il traffico intracellulare e per l'esposizione sulla superficie cellulare, così come per la

dimerizzazione (¹⁶). La dimerizzazione è fondamentale per mantenere il recettore nella conformazione inattiva. Il dominio extracellulare in forma dimerica assume una conformazione a due lobi, chiamata Venus Fly Trap Domain (VFTD), cioè dominio ad ali di farfalla, le quali restano aperte quando non c'è il ligando (forma inattiva) e si chiudono dopo il contatto con esso (forma attiva) proprio grazie ai cambiamenti dei legami tra i due dimeri (^{17, 18}). All'interno del VFTD sono state identificate sequenze necessarie per il corretto folding del recettore (residui 48-59, loop I del primo lobo) e sequenze che controllano il passaggio del recettore nella forma attiva dopo il contatto con il ligando (residui 117-137, loop II del primo lobo) (¹⁹).

I residui responsabili del legame con il calcio sono le serine 147 e 170 (²⁰), ma studi di cristallografia hanno mostrato che sono coinvolti anche la treonina 138 e il glutammato 297 (²¹). 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 loops extracellulari da una parte e ai tre loops intracellulari dall'altra. I loops esterni EC-2 e 3 sono siti di legame per gli agonisti (^{22, 23, 24, 25}) mentre i loops interni IC-1, 2 e 3 sono siti di contatto con le proteine G, PKC e PLC, cioè con i primi anelli di contatto della catena di segnalazione del CASR (^{26, 27}). La regione C-terminale inizia al residuo leucina 863 e si estende nel citoplasma per 216 aminoacidi. Questa regione, insieme al peptide segnale, è quella meno conservata nelle specie, ma in realtà i primi 83 residui (fino al 946) sono risultati fondamentali per la trasduzione del segnale: mutagenesi a carico di alcuni di questi residui risultavano in una mancata risposta al calcio esterno (^{28, 29, 30}). La coda citoplasmatica del CASR interagisce direttamente anche con una proteina del citoscheletro, la filamina A, coinvolta nell'attivazione delle MAP chinasi nel pathway del recettore (^{31, 32}) (figura 3).

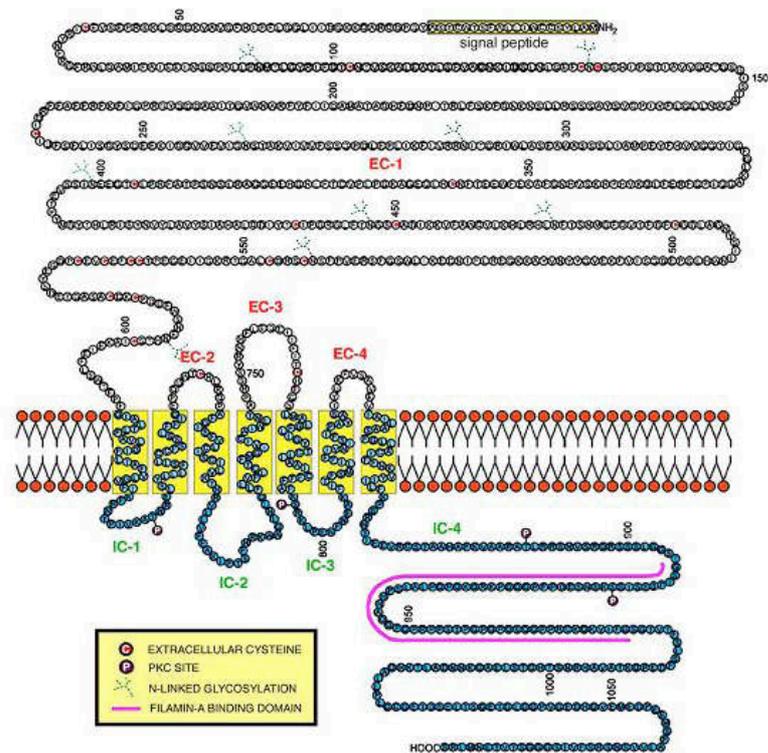


Figura 3. Funzione dei domini proteici del CASR: Possiamo distinguere nel dominio extracellulare N-terminale (EC-1) 20 residui di cisteina ed i siti N-glicosilazione; nel dominio transmembrana caratterizzato da 3 loops extracellulari (EC-2,3,4) e da 3 loops intracellulari (I-1,2,3) sono visibili 2 siti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

1.5 ESPRESSIONE TISSUTALE DEL CASR

l) Paratiroide

La paratiroide è l'organo bersaglio principale dell'azione del CASR ed è il tessuto in cui il CASR è espresso più abbondantemente. Un largo numero di studi ha chiaramente dimostrato il ruolo centrale del CASR nella regolazione della secrezione di paratormone (PTH) ⁽³³⁾. L'aumento del calcio extracellulare viene sentito dal CASR presente sulla membrana plasmatica delle paratiroidi, il recettore stimolato attiva il pathway di segnalazione del IP3 con aumento della $[Ca^{2+}]_i$ ed inibizione della secrezione di PTH (Figura 4). Non è noto se il meccanismo d'inibizione agisca sull'espressione genica bloccando la produzione del PTH o se blocchi la secrezione dell'ormone già formato contenuto nei granuli secretori ⁽³⁴⁾. La diminuzione del livello circolante di PTH porta ad aumento dell'escrezione di calcio, riduzione dell'assorbimento intestinale e minore liberazione di calcio dalle riserve ossee ⁽³⁵⁾. Il CASR modula anche la proliferazione delle cellule paratiroidi, riducendola in presenza di elevato calcio extracellulare, infatti, in casi di mutazioni inattivanti il recettore, spesso si verificano fenomeni di iperplasia ghiandolare ⁽³⁶⁾.

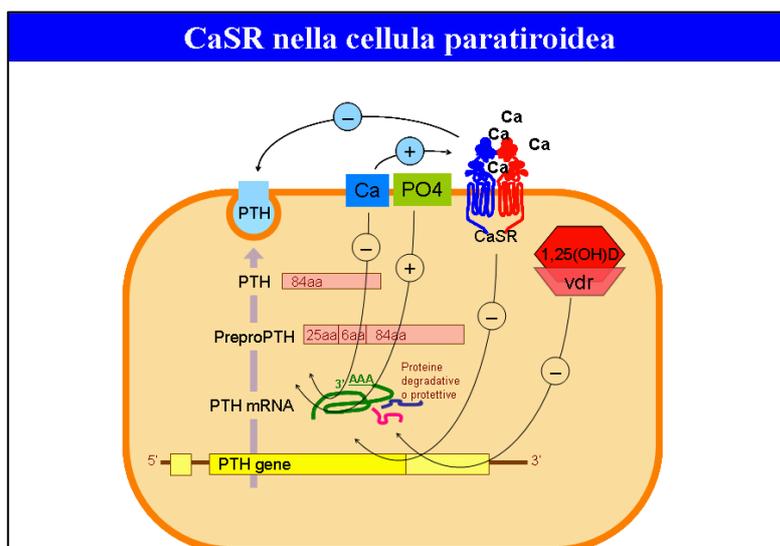


Figura 4. Ruolo del CASR nella secrezione e sintesi del PTH a livello della cellula paratiroidea. Il CASR media l'inibizione della sintesi e secrezione del PTH prodotta dall'incremento della calcemia.

II) Tiroide

Un certo livello di espressione del CASR si trova anche nella tiroide, anche se il ruolo nello stimolare la produzione di calcitonina non sembra così centrale, come per il PTH nelle paratiroidi. La secrezione di calcitonina da parte delle cellule C della tiroide è modulata dalla concentrazione di calcio nel sangue: con un meccanismo opposto a quello del PTH, un incremento dei livelli sopra la norma porta alla liberazione di calcitonina. A livello cellulare si verificano per lo più grossi influssi cellulari attraverso canali voltaggio-dipendenti, ma è stata dimostrata la presenza del CASR su queste cellule (³⁷), anche se non tutti gli antagonisti del CASR attivi nelle paratiroidi agiscono sulla secrezione di calcitonina, per esempio il Mg²⁺ sembra non avere alcun effetto (³⁸). Il modello proposto è che il CASR, attivato dall'aumento di calcio extracellulare, attivi dei canali Na⁺-Ca²⁺ attraverso la via PLC-DAG-PKC. I canali porterebbero all'entrata di Na⁺ e

Ca²⁺, producendo una depolarizzazione cellulare che attiverebbe i canali Ca²⁺ voltaggio dipendenti. L'aumento di [Ca²⁺]_i porterebbe ad incremento della secrezione di calcitonina ⁽³⁹⁾

(Figura 5).

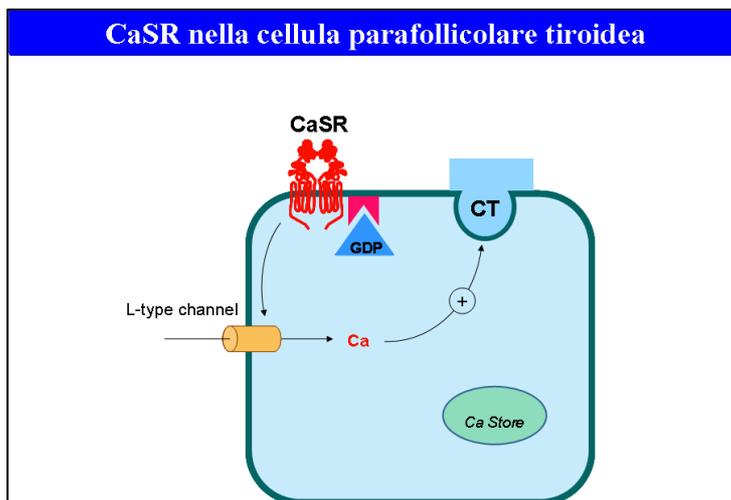


Figura 5. Ruolo del CASR nella secrezione di calcitonina a livello della cellula paratiroidea. La stimolazione del CASR da parte del calcio extracellulare determina l'apertura di un canale L del calcio che è seguita dall'ingresso di ioni, con conseguente secrezione di calcitonina.

III) Rene

Cambiamenti nei valori di Ca²⁺ plasmatici alterano molti aspetti della funzionalità renale ⁽⁴⁰⁾. Studi immunocistochimici con anticorpi anti-CASR hanno dimostrato che il CASR è distribuito lungo tutto il nefrone e la polarizzazione appare specifica nei vari segmenti del tubulo ⁽⁴¹⁾. Il recettore ha una posizione luminale nel tubulo prossimale e nel dotto collettore mentre ha una posizione basolaterale nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e nel tubulo distale. Questa localizzazione suggerisce

che il CASR può rilevare cambiamenti di concentrazione sia nello spazio urinario che nell'interstizio plasmatico, con funzioni diverse che sono state caratterizzate in ogni singolo segmento tubulare.

Nel tubulo prossimale il CASR è localizzato sulla membrana apicale dell'epitelio tubulare dove è coinvolto nel riassorbimento dei fosfati (Pi) mediato dal PTH. Il PTH inibisce il riassorbimento prossimale dei Pi diminuendo, con un meccanismo cAMP-mediato, l'esposizione dei cotrasportatori del Na⁺ e Pi (NPT2) sulla membrana luminale dei tubulociti. La stimolazione del CASR causa una diminuzione dei livelli cellulari di cAMP intracellulari, con un conseguente aumento di esposizione dei cotrasportatori che riassorbono il Pi sulla membrana plasmatica ⁽⁴²⁾. Il CASR può inoltre produrre un effetto antifosfaturico attraverso la riduzione del PTH circolante. Il tubulo prossimale è anche la sede della sintesi di vitamina D [1,25(OH)2D3], indotta dal PTH. In caso di elevazione dei livelli plasmatici del Ca²⁺ il recettore inibisce la sintesi e la secrezione di PTH e di conseguenza anche di vitamina D ⁽⁴³⁾.

L'ansa di Henle è il tratto renale in cui il CASR è espresso più abbondantemente. E' localizzato sulla membrana baso-laterale, dove controlla il riassorbimento dei minerali bivalenti (Ca²⁺, Mg²⁺), che avviene per lo più per via paracellulare grazie al gradiente elettrico dovuto al voltaggio positivo del tubulo. Il cotrasporto Na⁺-K⁺- 2Cl⁻ (NKCC2) riassorbe Na⁺, K⁺ e Cl⁻ dal tubulo, gli ioni Na⁺ e Cl⁻ escono poi attraverso la membrana basolaterale grazie al canale per il Cl⁻ e alla pompa Na⁺- K⁺ ATPasica. Il K⁺ viene riciclato anche grazie ai canali K⁺ (ROMK) posti sulla membrana apicale del tubulocita, permettendone la fuoriuscita. Questo fa sì che sia garantito un eccesso di cariche positive nel lume e quindi che Ca²⁺ e Mg²⁺ passino dal lume tubulare all'interstizio per riassorbimento passivo. Eventuali aumenti nel calcio extracellulare plasmatico attivano il recettore sulla membrana basolaterale che, attraverso la via della PLA2 e

dei metaboliti dell'acido arachidonico (20-HETE), inibisce il canale K^+ (⁴⁴), riducendo la positività del lume e sfavorendo così il riassorbimento di Na^+ e di Ca^{2+} .

Nel tubulo contorto 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 (⁴⁵) ed estruso nell'interstizio dallo scambiatore $Na^+ - Ca^{2+}$ e dalla pompa $Ca^{2+} - ATP$ asica (PMCA). Sulla PMCA agisce il CASR con effetto inibitorio in caso di eccesso di Ca^{2+} interstiziale. Infine *nel dotto collettore* il CASR si trova nella membrana apicale e va ad attivare la pompa idrogenionica con conseguente effetto di acidificazione urinaria (Figura 10d). Inoltre, in questa sede il CASR inibisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana apicale, dove si localizza sotto lo stimolo dell'ormone anti-diuretico vasopressina. La vasopressina favorisce l'espressione dell'acquaporina 2 sulla membrana luminale attraverso il signalling intracellulare del cAMP. In questo modo la vasopressina controlla il riassorbimento di acqua e la concentrazione delle urine.

Il CASR va a bloccare il sistema impedendo la produzione di cAMP, fondamentale nella comunicazione tra la vasopressina e le acquaporine; operando così un effetto diuretico (⁴⁶) (Figura 6).

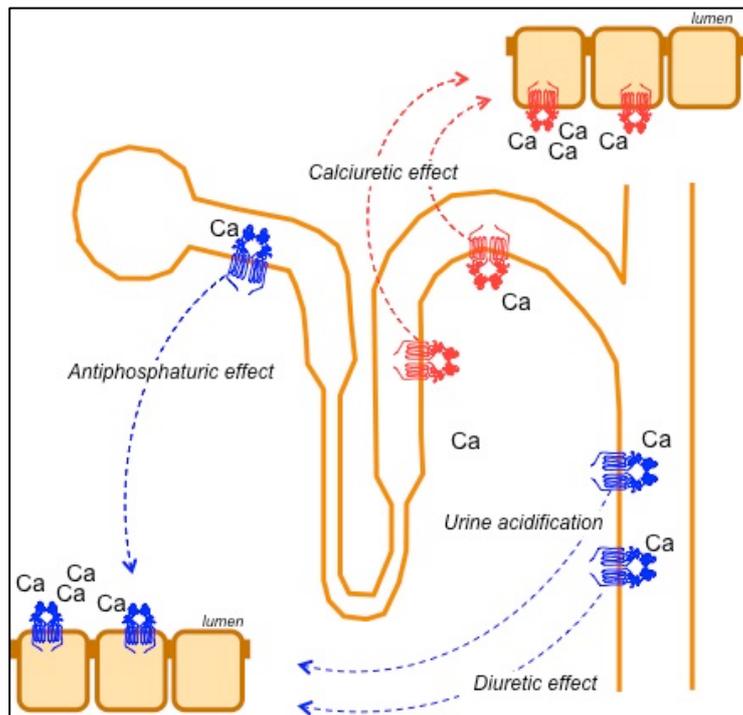


Figura 6. Ruolo del CASR nei diversi tratti del rene: nel tubulo prossimale ha un effetto antifosfaturico; nell'ansa di Henle e nel tubulo contorto distale controlla il riassorbimento del calcio e di altri minerali come il Mg^{+} ; nel dotto collettore attiva la pompa idrogenionica con conseguente effetto di acidificazione delle urine.

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 7). 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⁽⁴⁷⁾. Gli osteoblasti sembrano rispondere alle stimolazioni con calcio esterno aumentando la loro proliferazione e la chemiotassi in un range di

concentrazioni di Ca^{2+} fino a 5 mmol/l, rispondendo così alle esigenze di sintesi ossea. Anche i condrociti sembrano percepire le variazioni di calcio esterno e modificare le loro riserve intracellulari di calcio. La cartilagine non è un tessuto che prende parte all'omeostasi del calcio, ma gioca un ruolo chiave nella formazione di nuovo tessuto osseo, quindi la capacità di sentire la disponibilità di Ca^{2+} è importante per assicurare una corretta crescita e differenziamento della cartilagine in tessuto osseo (⁴⁸). 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 (^{49, 50}).

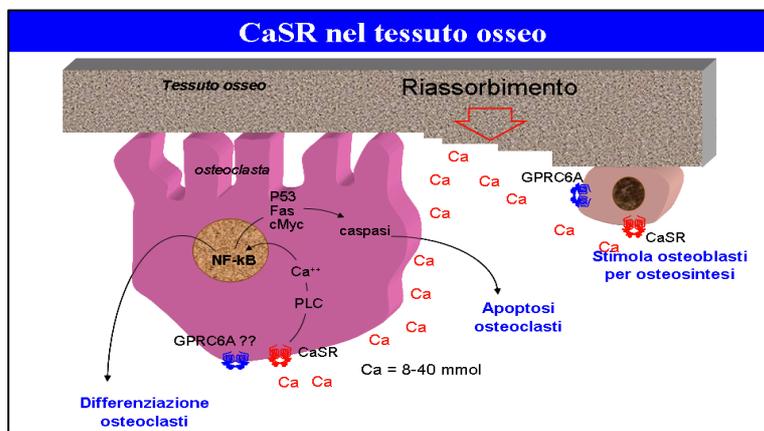


Figura 7. Espressione del CASR a livello del tessuto osseo. L'osteoclasta riceve stimoli in senso apoptotico quando la concentrazione dello ione calcio si eleva e il meccanismo sembra essere mediato dall'attivazione della PLC e la traslocazione nel nucleo di NF-kB. Il recettore del calcio è espresso anche a livello osteoblastico, dove la presenza dello ione e i suoi aumenti di concentrazione sembrerebbero indurre uno stimolo alla proliferazione.

V) Apparato gastro-enterico

Il CASR è espresso nelle cellule che tappezzano la cavità gastrica e la sua attivazione da parte dell'aumento di calcio extracellulare provoca secrezione di gastrina e quindi aumento dell'acidità gastrica. Il duodeno e in parte il colon prossimale sono i siti di maggior riassorbimento di calcio nell'intestino. Questo meccanismo opera attraverso la calbindina, la pompa per il calcio e lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, regolati dalla vitamina D [1,25(OH)₂ D₃]. Il CASR è espresso in entrambi i tessuti e potrebbe partecipare anch'esso alla regolazione dell'assorbimento di calcio, ma le informazioni al riguardo sono ancora scarse (^{51, 52}). La capacità del CASR di essere stimolato anche dagli aminoacidi suggerisce un legame tra il metabolismo del calcio e quello delle proteine; cambiamenti nell'apporto dietetico di proteine hanno degli effetti sull'escrezione di calcio ed è possibile che il primo step di questa regolazione avvenga a livello dell'apparato gastro-intestinale.

Inoltre il CASR sembra avere un ruolo anche nella secrezione dei fluidi nel colon e un effetto antiproliferativo sull'epitelio intestinale (⁵³).

VI) Tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio

Il CASR è espresso anche in numerosi tessuti non coinvolti nell'omeostasi del calcio, tanto che qualche autore inizia a definire il CASR un gene ubiquitario (⁵⁴). Il recettore è presente in numerosi compartimenti del sistema nervoso centrale, nell'ippocampo, nel cervelletto, nei bulbi olfattivi (⁵⁵). È stata evidenziata l'espressione del CASR anche nell'epitelio delle lenti oculari (⁵⁶), in molte cellule del midollo osseo (⁵⁷) e nelle cellule mature del sangue (monociti e piastrine).

1.6 STRUTTURA DEL GENE CASR

Il gene umano del CASR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q21- q24) (^{58, 59}), è costituito da 102 Kb, di cui circa 5 Kb sono codificanti e formano 7 esoni: la regione codificante per il dominio extracellulare si estende dall'esone 2 al 5' dell'esone 7, mentre il resto dell'esone 7 codifica per i domini transmembrana e C-terminale. L'esone 1 e l'estremità 3' dell'esone 7 sono regioni non tradotte (figura 8).

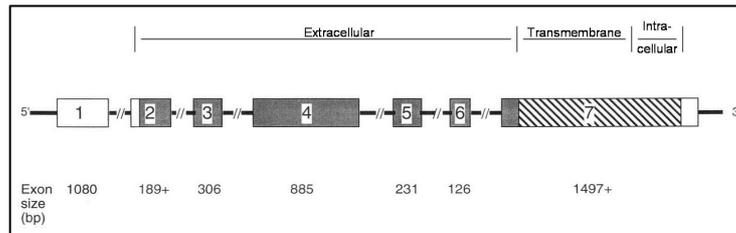


Figura 8. Rappresentazione schematica della struttura del gene del CASR. Il gene umano del CASR si espande per 102 Kb di DNA genomico ed è organizzato in 7 esoni, la cui dimensione è indicata in basso, e da 6 introni. La regione codificante per il dominio ECD si estende dall'esone 2 al 5' dell'esone 7 (regioni indicate in nero), mentre il resto dell'esone 7 codifica per il dominio TMD e C-terminale (regione tratteggiata). L'esone 1 e l'estremità 3' dell'esone 7 sono regioni non tradotte (regioni bianche). La figura è stata modificata da Pearce SHS et al, *J Clin Inv* 1995 (⁶⁰).

La regione regolatrice del gene presenta due promotori: quello più a monte ha una struttura più classica con le TATA e CAAT boxes, quello a valle è ricco di basi CG ma non ha la TATA box. Il motivo della presenza di due diverse regioni regolatrici non è ancora ben chiaro, ma potrebbe essere attribuito ad una trascrizione tessuto specifica o stimolo specifica (⁶¹). Entrambi i promotori contengono regioni regolatrici specifiche: sono presenti elementi responsivi alla vitamina D (VDRE), che inducono la trascrizione del recettore in presenza di 1,25-(OH)₂D₃ e regioni riconosciute da NFκB, attivate dalla citochina IL-1β. Questo spiega come

anche la trascrizione del gene sia finemente regolata nel quadro generale dell'omeostasi del calcio (^{62,63}). Sono note anche delle varianti di splicing a carico del gene del CASR. Una dà origine ad un'inserzione di 30 nucleotidi (quindi 10 aminoacidi) nella regione ECD, che però non sembra avere effetti sull'attività del recettore. Un'altra variante di splicing produce un recettore tronco non funzionante, che potrebbe interferire con l'attività normale del recettore (⁶⁴). Eventi di splicing alternativo dovuti a mutazioni, che causano la perdita di un esone, sono noti in diverse patologie (^{65,66}). Le mutazioni rare e le variazioni polimorfiche note a carico del gene sono molte: si tratta sia di variazioni nelle regioni codificanti che provocano o no cambi aminoacidici, sia di variazioni nelle regioni regolatrici. Le mutazioni danno spesso origine a malattie rare a carattere ereditario, i polimorfismi possono essere invece coinvolti nell'insorgenza di patologie complesse (i polimorfismi più frequenti sono A986S, R990G e Q10011E, a livello della coda citoplasmatica del recettore: l'argomento verrà meglio approfondito successivamente).

1.7 I POLIMORFISMI DEL CASR

A carico del recettore esistono polimorfismi che potrebbero alterare la sua funzione e contribuire all'insorgenza di patologie complesse. I polimorfismi più frequenti si trovano nel dominio C-terminale del recettore e inducono un cambio aminoacidico non conservativo: Ala986Ser, Gln1011Glu e Arg990Gly. Questi SNPs sono stati identificati per la prima volta da Heath in soggetti affetti da ipercalcemia ipocalciurica familiare (⁶⁷) 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% (⁶⁸) e sembra avere

un'azione inattivante sul recettore, infatti è stata trovata associata ad un aumento della calcemia (^{69,70}). È presente in numerosi casi di PHPT (^{71,72}) e ci sono dati sull'associazione con la massa minerale ossea (⁷³).

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 noto, è stata riscontrata una associazione con livelli elevati di calcemia, seppur nei limiti di norma. Potrebbe perciò provocare l'inattivazione della funzione recettoriale.

Un'associazione con l'ipertensione è stata descritta in soggetti di origine afroamericana (⁷⁴). Infine, il polimorfismo Arg990Gly porta alla sostituzione di un'arginina con una glicina dovuta al cambio del codone 990 da AGG a GGG (c.2968A>G). La frequenza di questo polimorfismo nella popolazione caucasica è del 8-10%. Questo SNP mostra un effetto attivante sulla funzione del recettore con il conseguente aumento dell'escrezione di calcio. Negli studi condotti su una popolazione sana i livelli di calcio plasmatico sono risultati inferiori nei soggetti portatori della variante 990Gly, pur avendo valori normali di PTH (⁷⁰). Pazienti caucasici con PHPT mostrano valori di PTH inferiori in associazione con l'allele 990Gly (⁷⁵) e in particolare, in uno studio condotto su una popolazione italiana con PHPT, il polimorfismo 990Gly aumenta il rischio di sviluppare nefrolitiasi calcica. In uno studio su una popolazione giapponese, dove la frequenza del polimorfismo è invertita (l'allele minore risulta essere 990Arg), nei soggetti con PHPT l'allele 990Gly era associato ad un livello di PTH inferiore rispetto al 990Arg (⁷⁶) e lo stesso risultato è stato ottenuto nei nipponici con HPT secondario (⁷⁷). Questi dati confermano l'azione attivante del polimorfismo sull'attività del recettore. Inoltre studi di popolazione mostrano un'associazione del gene CASR con il fenotipo ipercalcicurico ed evidenziano l'associazione tra l'escrezione di calcio e il polimorfismo

Arg990Gly⁽⁷⁸⁾. In particolare è stato condotto uno studio caso-controllo su 231 soggetti con nefrolitiasi di calcio, suddivisi in 134 ipercalciurici e 97 normocalciurici confrontati con 101 soggetti sani normocalciurici. La frequenza dell'allele 990Gly è risultata significativamente aumentata nei soggetti calcolotici ipercalciurici sia confrontata con i soggetti sani di controllo che con i soggetti calcolotici normocalciurici (9.7% vs 1% and 2.1%). Il rischio relativo di essere ipercalciurico risultava significativamente più alto nei soggetti portatori della variante allelica 990Gly (OR (odd ratio) 13, 95% CI (confidence interval) 1.7-99.4)⁽⁷⁸⁾. Tuttavia l'associazione tra lo SNP R990G e l'ipercalciuria risulta essere indipendente dalla calcolosi. Infatti in un secondo studio condotto su un gruppo di 243 donne non calcolotiche, suddivise in ipercalciuriche e normocalciuriche, la frequenza dell'allele 990Gly è risultata predominante nei soggetti ipercalciurici rispetto a quelli normocalciurici⁽⁷⁹⁾.

1.8 FISIOPATOLOGIA DEL CASR

1) Malattie monogeniche

Appena identificato il gene del CASR, sono state scoperte varie mutazioni che causano patologie con disfunzioni più o meno gravi del sistema di omeostasi del calcio. La maggior parte delle mutazioni sono state trovate nel ECD, e quindi causano difetti nel legame del ligando, altre nel TMD e nel dominio C-terminale, che portano ad errori nella segnalazione intracellulare. Le mutazioni possono essere inattivanti il recettore, dove si ha una perdita di funzione, o attivanti, dove si verifica un'ipersensibilizzazione agli stimoli^(65, 80, 81, 82, 83). Le patologie più frequenti associate a queste mutazioni sono tre: due in cui il recettore viene inattivato completamente o parzialmente, l'ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) e l'iperparatiroidismo severo neonatale (NSHPT), e una in

cui è stata rilevata un'iperattivazione del recettore, l'ipocalcemia autosomica dominante (ADH).

La FHH è un disordine a carattere autosomico dominante, presente in eterozigosi e dovuta alla perdita di funzione del recettore. La patologia è caratterizzata da un'ipercalcemia asintomatica, con una lieve ipermagnesemia, livelli normali o quasi di PTH e una scarsa escrezione di calcio.

La NSHPT è una patologia più grave che si presenta nei primi mesi di vita; è dovuta a mutazioni inattivanti presenti in omozigosi, può incorrere nella progenie di soggetti con FHH. I sintomi sono più rilevanti: ipercalcemia grave, iperparatiroidismo, iperplasia paratiroidea, demineralizzazione ossea con fratture multiple, ipocalciuria, con livelli di PTH anche 10 volte superiori alla norma. I soggetti non trattati chirurgicamente con paratiroidectomia hanno problemi di sviluppo neurale e vanno incontro alla morte.

L'ADH è una malattia autosomica dominante, causata da mutazioni del gene CASR che aumentano il livello di sensibilizzazione del recettore: minori concentrazioni di calcio bastano ad attivarlo. Si tratta di una patologia che può manifestarsi con diversi gradi di gravità e che a causa dei bassi livelli di calcemia può provocare convulsioni, nefrocalcinosi e difetti della crescita. I livelli di PTH sono bassi, nelle forme più gravi il PTH è indosabile, e l'ipercalciuria è notevole, tanto che quest'ultima è stata proposta come criterio di differenza con le altre forme di ipoparatiroidismo (^{54, 84, 85}). Di recente sono state scoperte forme di ipoparatiroidismo acquisito dovute ad anticorpi autoimmuni verso il CASR (^{86, 87}). Anticorpi reattivi verso il CASR sono stati però trovati anche in pazienti con iperparatiroidismo con un fenotipo simile al FHH (⁸⁸). Questo argomento necessita perciò di ulteriori indagini sia perché il meccanismo di legame e riconoscimento anticorpo-recettore rimane da chiarire, sia perché non si

conosce la reale frequenza degli anticorpi anti-CASR nelle malattie autoimmuni o al di fuori di esse.

II) Malattie complesse

Le patologie per cui più si indaga sul ruolo del CASR sono le disfunzioni delle paratiroidi: iperparatiroidismo primario e secondario. L'iperparatiroidismo primario (PHPT) è un disordine endocrino caratterizzato da un aumentato numero delle cellule paratiroidee e da ipersecrezione di PTH, dovuto o ad un adenoma delle paratiroidi o ad un'iperplasia della stessa. L'aumento di PTH circolante modifica il turnover osseo riducendo la densità ossea, aumenta la produzione di $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ a livello renale e quindi l'assorbimento intestinale. Molti pazienti iperparatiroidici sono a rischio di nefrolitiasi. Normalmente, l'aumento di concentrazione del Ca^{2+} nel fluido extracellulare causa una riduzione della secrezione del PTH con un setpoint (calcemia ionica che produce la concentrazione emi-massimale 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 negativa^(89,90). È stata però osservata una ridotta espressione della proteina nelle cellule paratiroidee 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 paratiroidee⁽⁹¹⁾.

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 signaling operata dalla Gq , Gi sulla MAPK (mitogen-activated protein kinase) (⁹²).

L'iperparatiroidismo secondario (SHPT) si sviluppa nel corso di insufficienza renale cronica, a seguito di fenomeni tipici di questa condizione quali la ritenzione di fosfato con conseguente iperfosforemia, la riduzione della sintesi di

1,25-(OH)₂D₃ e la conseguente ipocalcemia per ridotto assorbimento intestinale di calcio.

Molti studi hanno riscontrato bassi livelli d'espressione del recettore nelle paratiroidi iperplastiche dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica.

Questo fenomeno poteva essere verificato fin dalle prime fasi di riduzione del filtrato glomerulare a conferma del ruolo di controllo del recettore sulla proliferazione cellulare paratiroidea (⁵⁴).

Il ruolo del CASR nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare è alla base del coinvolgimento del CASR in alcuni tumori. Inoltre il CASR entra in gioco nella manifestazione delle ipercalcemie paraneoplastiche. Queste insorgono a causa della derepressione del gene del PTH-related peptide (proteina con effetti simile a quella del PTH, ma normalmente espressa solo nella vita fetale) nelle cellule neoplastiche, più frequentemente renali o polmonari. Il CASR sembra regolare la secrezione del PTH-related peptide in funzione della calcemia da parte delle cellule neoplastiche (^{93, 94}).

Altre patologie in cui si indaga il coinvolgimento del CASR sono la calcolosi renale (o nefrolitiasi) e l'ipercalciuria primaria. La forma più frequente di nefrolitiasi (80% dei casi circa) è la nefrolitiasi idiopatica di calcio (ICN), caratterizzata dalla formazione ricorrente di calcoli, a livello renale, composti da cristalli inorganici (ossalati, carbonati e fosfati di calcio)

amalgamati con proteine. La ICN è una patologia tipica delle società con standard socioeconomici elevati e colpisce circa il 10% della popolazione (^{95, 96}). Predominano i pazienti maschi, le donne sono circa il 30%, ma dopo la sesta decade di vita la differenza si annulla. La patogenesi della ICN è associata a specifiche alterazioni metaboliche, come ipercalciuria, iperuricusuria, ipocitraturia e iperossaluria. L'ipercalciuria primaria risulta fortemente correlata alla nefrolitiasi di calcio (40-50%), all'ipertensione (35%) e all'osteoporosi (20%) (^{97, 98, 99, 100, 101}). È un'alterazione del metabolismo del calcio definita come l'elevata escrezione urinaria di calcio in presenza di valori normali di calcio a livello plasmatico. Si presenta con i tratti tipici di una malattia complessa a carattere ereditario, influenzata anche da determinanti ambientali, principalmente dietetici. È stata definita come una malattia a trasmissione autosomica dominante, ma in realtà, nella maggior parte dei casi, si ha una trasmissione ereditaria di tipo poligenico.

1.9 IL CASR COME TARGET FARMACOLOGICO: IL CASR E I CALCIOMIMETICI

Il ruolo centrale del CASR nell'omeostasi del calcio lo rende un target per terapie farmacologiche mirate alla cura di patologie legate al metabolismo del calcio. I farmaci che sono stati sviluppati derivano dalle fenilalchilamine, agonisti di tipo II del recettore, che si legano al TMD e funzionano in presenza di calcio esterno. I calciomimetici attivano il recettore, diminuendo la EC50 (concentrazione di ligando a cui si raggiunge la metà della risposta massima) per il calcio e determinando una maggior liberazione di calcio intracellulare. Sono state sintetizzate diverse molecole con queste caratteristiche: i calciomimetici di prima generazione, R-568 e R-467, sono

stati poi sostituiti da quelli di seconda generazione, più tollerabili per l'uomo, come AMG 073, noto anche come CinacalcetTM (^{102, 103}) (figura 9).

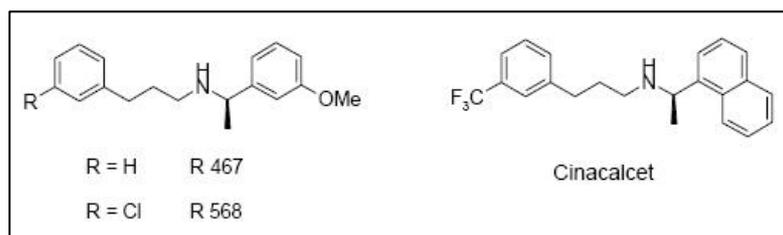


Figura 9. Struttura dei calcimimetici di prima generazione R-568 (oggetto di studio in questo lavoro) e R-467, e del calcimimetico di seconda generazione Cinacalcet. Figura da Nemeth EF, Cell Calcium, 2004 (¹⁶⁴).

Attualmente in sperimentazione si trova anche il calcimimetico di ultimissima generazione AMG 641, già testato su ratti uremici (¹⁰⁴) e attualmente usato nel nostro laboratorio per test in vitro su cellule HEK-293 trasfettate con il gene del CASR, che sembra essere ancora più efficace dei precedenti calcimimetici sintetizzati. L'utilizzo di questi composti sopprime la secrezione di PTH in modo dose-dipendente e quindi abbassa il livello di calcio circolante. La loro efficacia è stata dimostrata in trials clinici su PHPT e SHPT; questi trials sono stati completati e il farmaco è stato approvato per l'utilizzo su soggetti uremici con SHPT e su soggetti con cancro della paratiroide (^{54, 105}).

I calciolitici, al contrario, si comportano come modificatori allosterici che, aumentando la EC50 per il calcio, funzionano come inibitori del recettore. Un esempio è dato dal calciolitico 2143, capace di stimolare la produzione di PTH.

Studi fatti su culture cellulari e animali hanno confermato l'effetto di questo farmaco sul PTH. Inoltre in ratti osteoporotici si è visto un recupero di trabecole ossee dopo il trattamento con questo calciolitico. Questo effetto

antiosteoporotico sarebbe forse mediato dall'attivazione della secrezione pulsatile del PTH da parte del calciolitico. La secrezione pulsatile del PTH ha infatti dimostrato un effetto anabolico sull'osso, mentre effetto catabolico avrebbe invece la secrezione continua del PTH come avviene nell'iperparatiroidismo (^{106,107}). Questi dati fanno pensare ad un possibile utilizzo dei farmaci calciolitici nell'osteoporosi (¹⁰⁸). In questi ultimi anni stanno iniziando anche studi di farmaco-genomica il cui scopo è verificare se l'azione dei calciomimetici e dei calciolitici possa essere diversa in base al profilo genico dei soggetti, e quindi se la risposta al trattamento possa essere prevedibile in base al genotipo del CASR del soggetto trattato (¹⁰⁹).

1.10 PATHWAY DI SEGNALAZIONE DEL CASR

L'aumento della concentrazione di Ca²⁺ extracellulare, o l'esposizione ad altri agonisti del CASR, si traduce nell'attivazione di un complesso network di segnalazione intracellulare (non completamente definito in ogni dettaglio) (figura 10) che ha come effetto immediato l'innalzamento dei livelli di calcio intracellulare, dovuto sia a rilascio di calcio dagli stores intracellulari (¹¹⁰), sia all'ingresso di calcio extracellulare attraverso canali ionici non selettivi (¹¹¹). Il CASR, essendo un GPCR attiva pathway attraverso le G-protein eterotrimeriche e in particolare attraverso le Gq/11, Gi e G12/13 (¹²), ma data l'ampia gamma di G-protein esistenti nel genoma umano, gli studi di interazione CASR-G-protein sono ancora in corso. Il CASR utilizza le diverse G-protein per attivare pathway differenti. I primi fattori attivati sono le fosfolipasi C, A2 e D (PLC, PLA2, PLD), enzimi responsabili dell'idrolisi dei fosfolipidi di membrana. La PLC, attivata attraverso le Gq/11, idrolizza il fosfatidilinositolo-bi-fosfato (PIP2) in inositolo tri-fosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) (¹¹²). L'IP3 si lega ai suoi recettori sul reticolo

endoplasmatico e porta all'apertura dei canali di calcio con conseguente liberazione del Ca^{2+} contenuto negli stores intracellulari.

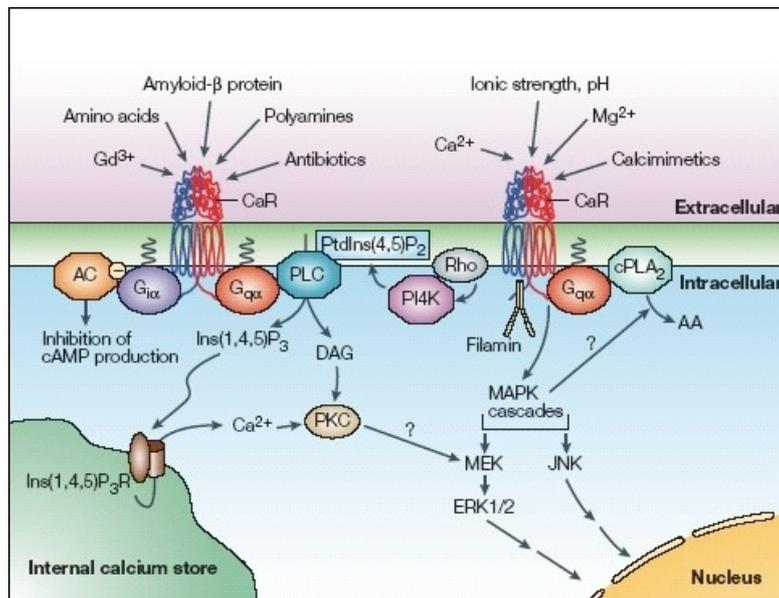


Figura 10. Rappresentazione schematica della trasduzione del segnale del CASR.
 Figura da Hofer AM, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003 (12).

È stato dimostrato che buona parte del Ca^{2+} rilasciato nel citosol viene poi estruso dalla cellula attraverso le calcio-ATPasi della membrana plasmatica (PMCA) (¹¹³, ¹¹⁴). Lo svuotamento degli stores intracellulari provoca la successiva apertura di store-operated calcium channels (SOCs), canali della membrana plasmatica, selettivi per il calcio, attraverso cui il calcio rientra nella cellula e, grazie ad un'altra pompa ATPasica, la pompa SERCA presente sulla membrana del reticolo endoplasmatico, viene di nuovo immagazzinato negli stores intracellulari. È stato ipotizzato che l'attivazione di questo pathway di afflusso ed efflusso del calcio permetta, attraverso il CASR, la comunicazione con altre cellule (¹¹⁵, ¹¹⁶) e che quindi il calcio abbia una putativa funzione di terzo messaggero. Il

rilascio di calcio da parte di cellule stimolate, infatti, determina un aumento della concentrazione di calcio a livello extracellulare sufficiente ad attivare, sempre attraverso il CASR, le cellule adiacenti (¹¹⁵) o a riattivare la stessa cellula stimolata (¹¹⁷). Sono però necessarie ulteriori investigazioni per dimostrare che il calcio abbia effettivamente questo ruolo (Figura 11).

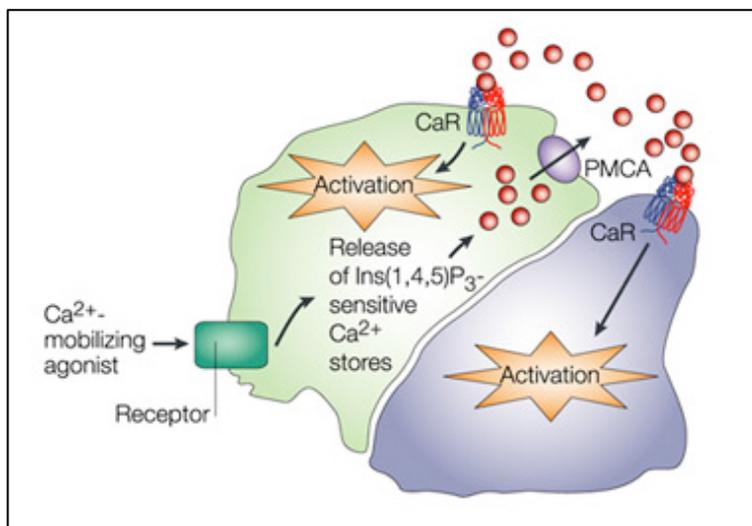


Figura 11. Il calcio come potenziale terzo messaggero. Questo modello mostra come il calcio (cerchi rossi) possa potenzialmente funzionare come terzo messaggero nella stimolazione del CASR di cellule adiacenti o della stessa cellula, funzione mediata dall'esportazione di calcio attraverso la calcio-ATPasi PMCA. Figura da Hofer AM, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003 (¹²).

L'aumento di calcio intracellulare, insieme alla produzione di DAG, porta all'attivazione della protein chinasi C (PKC) (12). Il PIP₂ viene riformato ad opera della fosfatidil-inositolo 4-chinasi (PI4K) che risulta essere più attiva dopo la stimolazione del CASR e che sembra interagire con il CASR attraverso le G12/13 Rho-dipendenti (¹¹⁸). Sempre attraverso le subunità stimolatorie q- α delle proteine G viene attivata la fosfolipasi A₂ (PLA₂) che porta alla liberazione, dai fosfolipidi di membrana, di acido arachidonico

(AA) e dei suoi metaboliti: prostaglandine (PGs) nella via delle ciclossigenasi (COX) e idroperossidi (HPETEs) nella via delle lipossigenasi (LOX) (¹¹⁹, ¹²⁰). Infine, viene attivata anche la fosfolipasi D (PLD), che produce acido fosfatidico (PA), anch'essa attraverso le G12/13 Rho-dipendenti.

Il CASR interagisce anche con proteine G inibitorie (Gi α), attraverso le quali inibisce l'adenilato ciclasi (AC) e determina quindi una riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) (¹²¹). A questo livello della segnalazione sembra essere coinvolta la PKA, la cui attivazione è cAMP dipendente, ma il cui ruolo nel pathway del CASR risulta poco chiaro.

Il CASR è inoltre correlato alla cascata d'attivazione delle mitogen-activated protein kinasi (MAPKs). La famiglia delle MAPKs include ERK1 e ERK2 (extracellular signal-regulated kinase), p38 e JNK (stress-activated cJun N-kinases) (Figura 10). Tale cascata viene innescata dall'attivazione della proteina G a basso peso molecolare Ras (p21) (¹²², ¹²³) e attraverso fosforilazioni a catena porta all'attivazione di ERK, p38 e JNK. Le MAPKs sono serina/treonina chinasi attivate mediante duplice fosforilazione su tirosina e su residui adiacenti di serina o treonina e sono coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari (¹²⁴). È stato dimostrato che la stimolazione del CASR mediante incremento della [Ca²⁺]_o determina aumento dell'attività di JNK, e che ciò è mediato da proteine G della classe Gi α (¹²⁵).

L'attivazione di p38 e JNK sembra essere legata al meccanismo di secrezione del paratormone (PTH) (¹²⁶). Per quanto riguarda ERK, è stato dimostrato che la stimolazione del CASR con Ca²⁺ extracellulare determina aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2, quindi il CASR ne promuove l'attivazione. L'attivazione di ERK è molto complessa, coinvolge Ras, Gi α , Gq/11a, la via PLC-IP3 e PKC (¹²⁰).

Sembra inoltre che per l'attivazione della cascata delle MAPKs sia fondamentale l'interazione del CASR con la proteina del citoscheletro filamina-A. Il CASR risulta localizzato prevalentemente a livello delle caveole della membrana plasmatica (microdomini della membrana a forma di fiasca, ricchi di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale), dove la principale proteina presente è la caveolina-1. È stato dimostrato che la filamina-A interagisce direttamente sia con il CASR (regione compresa tra gli aa 907-997 al C-terminale del CASR, regione compresa tra gli aa 1566-1875 nella filamina-A) ⁽³¹⁾ che con la caveolina-1 ⁽¹²⁷⁾, oltre che con varie componenti della cascata delle MAPKs; inoltre il CASR è incapace di attivare ERK in assenza di filamina-A ⁽¹²⁸⁾. Sembra quindi che la filamina-A sia in grado di mediare l'interazione del CASR con le MAPK e influenzare l'attivazione della via di segnalazione del recettore, anche se l'attivazione della PLC non sembra essere influenzata dalla filamina-A ⁽³¹⁾.

Un fenomeno successivo all'attivazione del recettore è la comparsa di oscillazioni di calcio. Studi sull'attivazione del CASR, condotti a livello di singola cellula, hanno mostrato che piccoli incrementi della concentrazione di calcio extracellulare (0.5 mM) sono in grado di indurre oscillazioni della concentrazione di calcio intracellulare, ovvero continue variazioni della $[Ca^{2+}]_i$, che si presentano come una sequenza di picchi che si ripetono ogni 40-50 secondi e si mantengono per 30-40 minuti ⁽¹²⁹⁾. Il pattern oscillatorio e la frequenza di oscillazione del calcio intracellulare svolgono un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, nella regolazione della protein chinasi calcio e calmodulina dipendente PKII ⁽¹³⁰⁾ e di PKC ⁽¹³¹⁾, nel metabolismo mitocondriale ⁽¹³²⁾ e nell'attività trascrizionale ^(133, 134, 135, 136); ci sono inoltre ipotesi che suggeriscono che questo sia un meccanismo mediante il quale il recettore sopporta l'esposizione prolungata ad elevate concentrazioni di calcio, prevenendo quindi la sua desensitizzazione. Molti modelli sono stati proposti per spiegare il meccanismo di generazione delle

oscillazioni, ma tuttora non è ancora stato definito con certezza il meccanismo mediante il quale il calcio extracellulare evoca l'oscillazione dei livelli di quello intracellulare. Sembra ormai certo che il ciclo di calcio dentro e fuori dagli stores intracellulari, mediato da PLCIP3, e l'integrità degli stessi stores intracellulari, siano fondamentali per le oscillazioni. A sostegno di tale ipotesi c'è il fatto che le oscillazioni di calcio sono state osservate non solo per il CASR ma anche per altri GPCR che attivano il pathway PLC-IP3, ma soprattutto il fatto che il trattamento con taspigargina, un inibitore che causa il completo e irreversibile svuotamento degli stores intracellulari, arresta il fenomeno oscillatorio (¹²⁹). Anche PKC sembra essere coinvolta nel fenomeno oscillatorio, ma sull'argomento ci sono due teorie nettamente contrapposte. Evidenze sperimentali hanno mostrato che il trattamento con inibitori di PKC (GF I e Ro 31-8220) blocca le oscillazioni, mentre l'esposizione ad attivatori di PKC (PDBu) riduce la frequenza di oscillazione (¹³⁷). La teoria più accreditata sostiene che l'azione di PKC consista in un meccanismo a feed back negativo sul CASR, mediante fosforilazione in corrispondenza della Thr888, e che ciò sia fondamentale per indurre l'oscillazione del calcio intracellulare; a supporto di tale ipotesi è il fatto che la mutazione della Thr888 causa il blocco delle oscillazioni (¹³⁷). Allo stesso tempo però sono state proposte teorie che invece escludono il coinvolgimento di PKC nelle oscillazioni di calcio, poiché il trattamento con inibitori della stessa PKC non ha prodotto nessun effetto sulle oscillazioni, ma solo una riduzione dei valori massimi dei picchi in alcuni esperimenti, senza influenzare la frequenza oscillatoria (¹²⁹). Ulteriori indagini saranno necessarie per stabilire quale sia l'esatto ruolo di PKC nell'induzione e nel mantenimento delle oscillazioni di calcio intracellulare. Attivatori allosterici del CASR, quali i calciomimetici e gli aminoacidi, sono in grado di potenziare la risposta oscillatoria derivante dall'attivazione del recettore (¹³⁸, ¹³⁹). Gli aminoacidi inducono però

oscillazioni che hanno frequenza minore rispetto a quelle indotte dal calcio e sono sensibili ad agenti farmacologici diversi (¹³⁹); inoltre gli aminoacidi non sono in grado di indurre aumento dei livelli di IP3 e DAG. Sembra infatti che le oscillazioni indotte dagli aminoacidi siano indipendenti dalla via PLC-IP3 e coinvolgano invece un pathway in cui sono richiesti Rho, il C-terminale del recettore, la filamina-A e una riorganizzazione del citoscheletro di actina (¹⁴⁰). L'attivazione del recettore, dipendente dall'agonista, è generalmente seguita dall'inizio di un meccanismo regolativo che porta all'attenuazione del segnale e che viene definito desensitizzazione funzionale. Si tratta di un meccanismo non completamente chiarito che coinvolge chinasi dipendenti da secondi messaggeri (PKC e PKA), G-protein coupled receptor kinases (GRKs) e β -arrestine. Evidenze sperimentali hanno mostrato che sia PKC che PKA hanno un ruolo inibitorio sul signaling del CASR, infatti l'uso di inibitori di queste chinasi determina incrementi dei livelli di IP3 accumulati; sembra però che PKA abbia un ruolo minoritario rispetto a PKC (¹⁴¹). PKC viene attivata dall'aumento di calcio intracellulare, mediato dalla via PLC-IP3, e dalla produzione di DAG, e si pensa che agisca a feed-back negativo sul CASR mediante fosforilazione. Il CASR umano contiene cinque potenziali siti di fosforilazione per PKC: due si trovano nei loops intracellulari (Thr646 e Ser794) e tre sono invece del dominio intracellulare (Thr888, Ser895 e Ser915) (1). Si è osservato che l'attivazione della PKC (in seguito a trattamento con attivatori o ad aumento della $[Ca^{2+}]_o$) determina aumento dei livelli di fosforilazione del CASR, soprattutto in corrispondenza della Thr888 (¹⁴²) che sembra essere indispensabile per quest'azione della PKC; infatti è proprio attraverso la fosforilazione della Thr888 che PKC blocca l'interazione del C-terminale del CASR con le proteine G responsabili della mobilitazione del calcio contenuto negli stores intracellulari (¹⁴³); inoltre mutazioni a livello della Thr888 sono in grado di bloccare l'effetto inibitorio

di PKC (¹⁴⁴). Sembra che nel dominio intracellulare siano inoltre presenti due potenziali siti di fosforilazione per PKA (Ser899 e Ser900), con funzione regolativa; è stato ipotizzato che il modesto effetto inibitorio prodotto da PKA rispetto alla forte inibizione prodotta da PKC dipenda proprio dalla presenza di un numero minore di siti di fosforilazione per questa chinasi, ma non è ancora stato dimostrato (¹⁴¹).

Le G-protein coupled receptor kinases (GRKs) sono una famiglia di serina/treonina chinasi che riconoscono e fosforilano in modo specifico recettori attivati da agonisti e accoppiati a G-proteine. La famiglia delle GRKs è composta da 7 diverse chinasi (GRK1-7): GRK 2,3,5,6 sono ampiamente espresse nei tessuti di mammifero, GRKs 1 e 7 si trovano a livello delle cellule del sistema visivo, mentre GRK 4 è espressa nel cervello, nel testicolo e nel rene (^{145, 146, 147}). GRK 2 e 3 sono citosoliche, mentre tutte le altre sono associate alla membrana (¹⁴⁸). L'azione delle GRKs consiste nella fosforilazione di clusters di residui di serine e treonine presenti nel C-terminale e/o nel terzo loop intracellulare di GPCR attivati da ligando: tale fosforilazione permette il reclutamento delle β -arrestine, che mediano il distacco del recettore dalla proteina G interagente e indirizzano il recettore stesso all'endocitosi, un processo che ne permette la defosforilazione, resensitizzazione e il riciclo sulla membrana plasmatica (^{149, 150}). La famiglia delle arrestine è costituita da 4 membri (arrestine 1-4): le arrestine 1 e 2 si trovano a livello delle cellule del sistema visivo, mentre le arrestine 3 e 4, meglio conosciute come β -arrestina 1 e β -arrestina 2, sono ubiquitariamente espresse (¹⁵¹). GRKs e β -arrestine sono coinvolte nella regolazione di molti recettori accoppiati a proteine G. L'idea che anche il CASR sia soggetto a tale regolazione nasce da osservazioni sperimentali che hanno dimostrato l'espressione di GRKs e β -arrestine in paratiroidi umane e corteccia renale, tessuti in cui il CASR è fortemente espresso, ma che soprattutto hanno evidenziato come l'over-espressione

di tali molecole fosse in grado di ridurre l'attività del CASR (¹⁵²). Sembra che GRK 2, 3 e 4 siano quelle maggiormente coinvolte nella desensitizzazione del CASR; in particolare per GRK2 è stato ipotizzato un meccanismo inibitorio indipendente sia dalla fosforilazione del recettore che dall'associazione delle β -arrestine, che si basa invece sull'interazione diretta di GRK2 con le G-proteine (prevalentemente con le Gq) che riduce così l'interazione del CASR con quest'ultime (¹⁵³). È stato dimostrato che il C-terminale del CASR interagisce sia con la β -arrestina 1 che con la β -arrestina 2; inoltre si è osservato che la stimolazione con calcio determina traslocazione delle β -arrestine a livello del CASR (¹⁵²). Evidenze sperimentali mostrano che il CASR è continuamente endocitato e riciclato sulla membrana plasmatica e ci sono meccanismi che invece ne promuovono la degradazione; poiché i livelli proteici del CASR rimangono pressoché costanti, deve esserci un equilibrio tra sintesi e degradazione del recettore (¹⁵⁴).

1.11 LA FILAMINA A (FLNA)

La Filamina A (FLNA), conosciuta come actin-binding protein, è una proteina di 280 KDa identificata per la prima volta nel 1975 da Stossel & Hartwig (¹⁵⁵). I primi studi hanno dimostrato l'importanza di questa proteina nella gelificazione citoplasmatica, nella contrazione e nel movimento cellulare (¹⁵⁵).

Studi successivi hanno individuato altri due geni, Filamina B (FlnB) e Filamina C (FlnC), come parte della famiglia delle filamine. Le Filamine sono definite molecole scaffold in quanto sono in grado di facilitare le interazioni proteina-proteina ed influenzare la localizzazione cellulare delle proteine. In seguito, studi hanno rivelato la struttura proteica della filamina ed indentificato più di 90 filamin-binding proteins coinvolte nel signaling cellulare, nella migrazione cellulare e nei processi di adesione, fosforilazione, proteolisi, regolazione di canali ionici, regolazione della trascrizione, attivazione di recettori, sviluppo muscolare ed in altre funzioni cellulari. In particolare, la FLNA è formata da 2647 amminoacidi con diversi domini: nella parte N-terminale è presente il dominio ABD (actin-binding protein domain) seguito da 24 domini immunoglobulin (Ig)-like ripetuti a forma di beta-foglietto (¹⁵⁶)(Figura 12). I domini ABD contengono a loro volta due domini omologhi per la calpaina (CH), con due siti di legame per l'actina nel dominio CH1 e uno nel dominio CH2 (¹⁵⁷). Tra i domini 15-16 e 23-24 sono presenti due siti di taglio (H1 e H2) per la calpaina, che taglia la FLNA in 3 frammenti (170 KDa, 110 KDa, 90 KDa). La FLNA è quindi facilmente soggetta a proteolisi ed è possibile trovarla in due forme: quella full-length di 280 KDa localizzata nel citoplasma; quella di lunghezza ridotta di 90 KDa localizzata nel nucleo (^{158, 159, 160, 161}). Nel citoplasma la FLNA sembra essere coinvolta nel processo di migrazione cellulare contribuendo così alla formazione di metastasi tumorali (¹⁶²); nel nucleo, invece, sembra essere necessaria nei processi di inibizione della trascrizione genica e

della suscettibilità durante gli interventi terapeutici (^{159,160}). Mutazioni a carico della famiglia delle filamine sono state trovate in associazione a diverse malattie come displasia ossea, malformazioni cardiovascolari e difetti del tubo neurale (¹⁶³).

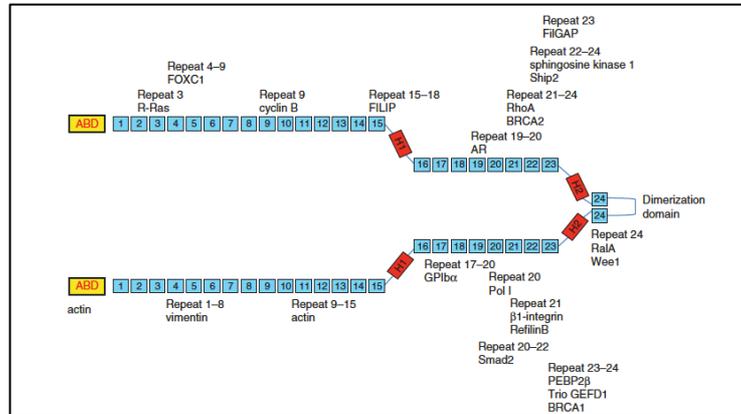


Figura 12. Struttura della Filamina A: nella parte N-terminale vi sono i domini ABD (actin-binding protein) seguiti da 24 domini Ig-like ripetuti che hanno una conformazione a beta-foglietto. Tra i domini 15-16 e 23-24 sono presenti due siti di taglio (H1 e H2) per la calpaina, che taglia la FLNA in 3 frammenti (170 KDa, 110 KDa, 90 KDa). Nella figura sono riportate alcune dei 90 protein-binding partners che partecipano alla regolazione del riarrangiamento citoscheletrico mediato dall'actina. *Endocrine-Related Cancer* (2013) 20, R341–R356.

1.12 FILAMINA A NEI TUMORI

La FLNA è una proteina coinvolta in diversi tipi di tumori. E' stata, infatti, trovata over-espressa in tumori quali tumore prostatico (161), polmonare (164), cancro al seno (165, 166), emangioma (167), cancro al colon (168, 169), melanoma (170), neuroblastoma (171), carcinoma cellulare squamoso (172), colangiocarcinoma epatico (173) ed altri ancora. Questo suo coinvolgimento sembrerebbe essere dovuto alla peculiarità di essere una proteina scaffold e quindi in grado di legare molte altre proteine diverse dall'actina. Nel caso del tumore al seno la FLNA, da un lato, regola il disassemblamento dell'adesione focale e inibisce la migrazione cellulare (174), ma se interagisce con la ciclina D1 promuove la migrazione cellulare (175). Analogamente, nel cancro prostatico, il legame FLNA-ciclina D1 favorisce la localizzazione nucleare del recettore degli androgeni (AR), che si pensa essere il promotore della progressione di questa forma tumorale (176). Al contrario, studi presenti in letteratura dimostrano che se la FLNA subisce un taglio proteolitico, generando così dei frammenti che si localizzano nel nucleo, può agire da inibitore della crescita tumorale e delle metastasi. Pertanto il suo ruolo nella progressione tumorale è contrastante e sembra dipendere dalla sua localizzazione nel citoplasma oppure nel nucleo. Inoltre, vi sono studi condotti sul cancro colonrettale in cui si è vista una down-regolazione della FLNA (177). Per quanto riguarda l'espressione della FLNA nei tumori alle paratiroidi, non sono presenti in letteratura studi che ne abbiano indagato il ruolo.

2. SCOPO DELLA TESI

2.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare il ruolo della Filamina A nei tumori alle paratiroidi e di valutare l'interazione tra questa proteina e il Calcium-sensing receptor (CASR).

In particolare, è stata valutata: 1) l'espressione della FLNA in campioni tissutali di adenoma e carcinoma paratiroideo confrontandola con tessuti sani di paratiroide prelevati a soggetti normocalcurici; 2) l'effetto del silenziamento genico della FLNA sull'espressione del CASR, sia wild-type (990R) che in presenza della variante allelica 990G; 3) l'effetto di questo silenziamento sul signalling del CASR 990R e 990G misurando i livelli di fosforilazione di ERK, come indicatore dell'attività del recettore, 4) anche in presenza del calciomimetico R568 in cellule HEK-293 transientemente trasfettate con il plasmide CASR.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Tessuti paratiroidi

Campioni di tumore paratiroideo [biopsie delle paratiroidi normali (n = 4), adenomi sporadici benigni delle paratiroidi (n = 10), carcinoma delle paratiroidi (n = 7)] sono stati fissati in formalina al 10% con trattamento convenzionale e inclusi in paraffina. Gli adenomi e carcinomi paratiroidi erano stati asportati chirurgicamente da pazienti con diagnosi clinica e ormonale di iperparatiroidismo primitivo; i campioni sono stati raccolti presso le U.O. di Endocrinologia dell'IRCCS Policlinico San Donato di San Donato M.se (MI), della Fondazione Cà Granda Policlinico Ospedale Maggiore di Milano e dell'IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (FG). Inoltre, sono stati prelevati campioni tissutali, non fissati in formalina e paraffina, da 3 adenomi paratiroidi dai quali sono state isolate le cellule messe in coltura per gli esperimenti di immunofluorescenza.

Il consenso informato è stato letto e firmato da tutti i pazienti inclusi nello studio.

3.2 Colture cellulari di adenoma paratiroideo e cellule HEK-293

Campioni di adenoma paratiroideo sono stati tagliati in frammenti di 1 mm³, lavati in PBS e parzialmente digeriti con collagenase di tipo I (Worthington, Lakewood NJ USA) 2 mg/ml. Dopo la digestione, i frammenti tissutali sono stati filtrati con l'aiuto di un cell strainer (100 µm Nylon, BD Falcon). Sia la linea cellulare di adenoma paratiroideo, sia le cellule Human Embryonic Kidney 293 (HEK-293) (Cell Bank, IST, Genoa, Italy), sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, UK), supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10% e 1% penicillina/streptomicina, in condizioni standard (5% CO₂, 37° C).

3.3 Genotipizzazione

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

3.4 Immunoistochimica (IH) della Filamina A

Sezioni di 4 µm di spessore sono stati tagliati e colorati con ematossilina ed eosina per la valutazione istopatologica ed esaminati al microscopio ottico. Studi immunoistochimici sono stati effettuati su sezioni di tessuto di 4 µm di spessore, fissati in formalina e inclusi in paraffina, utilizzando un Novolynk Polymer Detection System (Novocastra Laboratories Ld, Newcastle, Gran Bretagna) con un anticorpo per la Filamina A umana (Abnova Corporation, Taiwan). Le sezioni sono state deparaffinate in Bioclear (Bio Optica, Milano, Italia) per 20 minuti e poi lavati due volte in etanolo. L'attività perossidasi endogena è stata bloccata con 3% di perossido di idrogeno in acqua distillata per 10 min. La colorazione è stata eseguita con 3,3' diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. Per la colorazione della Filamina A l'anticorpo primario è stato applicato ad una diluizione di 1:200 in BSA 0,5% e sodio azide e incubato 30 minuti a

temperatura ambiente. I vetrini in assenza dell'anticorpo primario sono stati inclusi come controlli negativi.

3.5 Immunofluorescenza (IF) di CASR e FLNA

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

3.6 Quantitative real time PCR

L'RNA totale è stato estratto da cellule HEK-293 trasfettate con il gene CASR WT o polimorfico e silenziate per la Filamina A, utilizzando il PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). L'espressione dell'mRNA del CASR e della Filamina A è stata determinata con quantitative real time PCR su cDNA retrotrascritto da RNA totale con il Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). La real-time PCR è stata condotta amplificando 100 ng di cDNA con SYBR Premix Ex Taq utilizzando 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Le condizioni d'amplificazione sono state: 94°C per 5', seguita da 40 cicli a 94°C per 30", 57°C per il gene CASR, 60° C per il GAPDH (gene housekeeping) e 63

cicli per FLNA per 1', e 55°C per 30". I dati di fluorescenza sono stati registrati a 57-60-63°C. Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA del CASR sono: 5'ATGCCAAGAAGGGAGAAAGACTCTT 3' (CASR Forward) e 5' 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). Le sequenze dei primers utilizzati per il gene FLNA sono: 5' CAGTGCTATGGGCCTGGTAT 3' (FLNA Forward) e 5' CCACTTTGTACATGCCATCG 3' (FLNA Reverse). L'analisi della melting curve sui prodotti d'amplificazione è stata condotta alla fine di ogni reazione di PCR allo scopo di escludere la presenza di prodotti aspecifici di PCR. I dati sono stati analizzati con il 7500 Fast System SDS Software. La quantificazione relativa del gene è stata normalizzata per il gene housekeeping GAPDH e i dati sono stati riportati come rapporto mRNA CASR/mRNA GAPDH e mRNA FLNA/mRNA GAPDH.

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

3.7 Trasfezione transiente

La trasfezione è stata effettuata in cellule HEK-293 seminate e fatte crescere in MW6. In ogni well sono state seminate 100.000 cellule in DMEM 10%. Le cellule sono state trasfettate ad una confluenza del 70-90%, con il DNA plasmidico contenente l'allele 990Arg (WT) o l'allele 990Gly del gene CASR. Sono stati utilizzati 10 µl di Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) e 4µg di DNA plasmidico diluiti in terreno

OPTIMEM I (Invitrogen). 24h dopo la trasfezione il mezzo completo è stato sostituito con il mezzo di starvation (DMEM senza siero e con l'1% penicillina/streptomina). L'espressione e l'attività genica sono state analizzate 72h dopo la trasfezione.

3.8 Silenziamento genico (RNA interference)

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

3.9 Co-trasfezione FLNA siRNA e plasmide CASR

La co-trasfezione è stata effettuata in ciascun pozzetto della piastra MW6 con 12 µl di Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), 4µg di plasmide CASR e 500 pmol di FLNA siRNA. L'espressione e l'attività genica sono state valutate dopo 72h dalla trasfezione.

3.10 Western Blot

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

enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). La quantificazione delle bande ottenute è stata effettuata mediante misurazione dell'area delle bande con il software Image J sulle immagini densitometriche ottenute dalle lastre.

3.11 Analisi Statistica

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

4. RISULTATI

4.1 Espressione della Filamina A in tessuti tumorali paratiroidi

La valutazione dell'espressione della Filamina A è stata eseguita mediante immunohistochimica su ghiandole paratiroidi normali (n=4), adenomi (n=10) e carcinomi (n=7) delle paratiroidi, per valutare l'espressione di questa proteina in diversi gradi di malignità tumorale (Figura 13). I tessuti paratiroidi sani hanno mostrato circa 10-50% di cellule positive alla colorazione per la FLNA e in tutti i campioni testati, nessuno era totalmente negativo. L'espressione della FLNA negli adenomi è risultata molto variabile. I 2/3 (n=7) dei tessuti adenomatosi analizzati erano negativi o mostravano una percentuale di cellule positive per la FLNA minore del 10%, mentre meno di 1/3 (n=3) dei campioni adenomatosi mostravano più del 50% di cellule positive. Pertanto, la positività delle cellule negli adenomi è risultata ridotta, in maniera variabile, rispetto al tessuto sano. I carcinomi delle paratiroidi hanno mostrato un'ulteriore diminuzione dell'espressione della FLNA: meno di 1/3 (n=2) dei campioni erano decisamente negativi e 5 campioni hanno mostrato meno del 10% di cellule positive. Questi dati suggeriscono che l'espressione di FLNA diminuisce con la progressione della malignità tumorale (Figura 14).

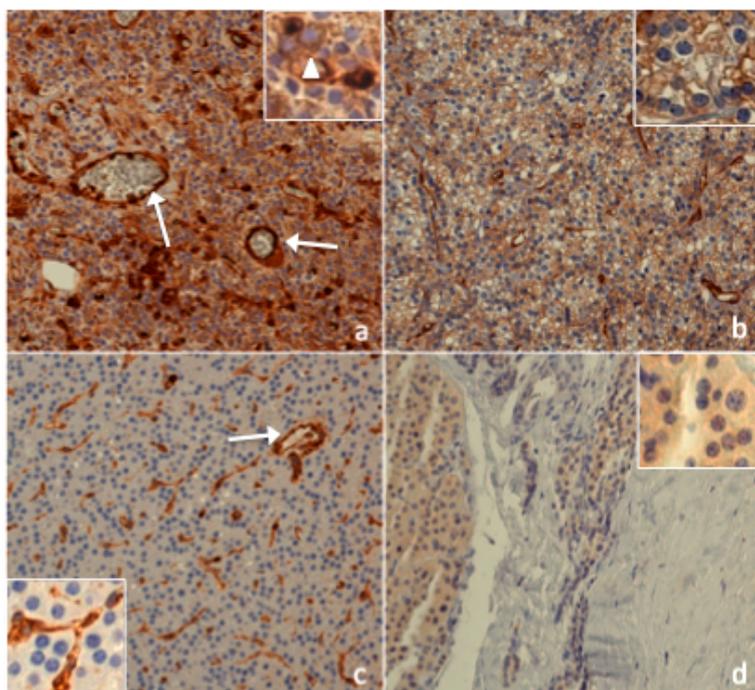


Figura 13. **Immunoistochimica dell'espressione di FLNA in tessuti paratiroidei umani:** immagine esemplificativa di un tessuto paratiroideo sano (**a**), adenoma (**b-c**), carcinoma (**d**). I tessuti sono stati colorati con specifico anticorpo anti-FLNA. Le cellule endoteliali che rivestono i vasi sono state considerate come controllo interno positivo (freccie in **a** e **c**). In **a** è possibile osservare una intensa positività alla FLNA sia a livello citoplasmatico che a livello della membrana (punta di freccia nell'inserito in alto). In **b-c** le cellule che esprimono la FLNA a livello della membrana sono variabilmente ridotte rispetto al tessuto sano, in particolare tale riduzione si osserva meglio nell'immagine **c**. In **d** il carcinoma presenta una netta diminuzione delle cellule positive alla FLNA.

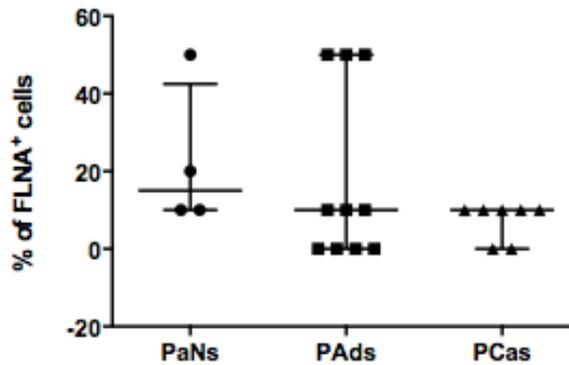


Figura 14. Percentuale di cellule positive per la FLNA dopo analisi di immunistochemica su campioni tissutali di ghiandole paratiroidee sane (PaNs), adenoma (PAds) e carcinoma (PCas) paratiroideo: nel grafico sono mostrati i ranges delle mediane e degli interquartili.

4.2 Espressione della Filamina A e del CASR in cellule tumorali della paratiroide

Esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti in cellule in coltura, ottenute da ghiandole paratiroidee adenomatose, allo scopo di valutare l'espressione delle proteine FLNA e CASR. Le cellule adenomatose apparivano in coltura come piccole cellule arrotondate, ma erano presenti anche cellule fibroblasti-like (grandi e allungate). L'espressione della FLNA è risultata nettamente inferiore in cellule di adenoma della paratiroide rispetto a cellule HEK-293, scelte come cellule che esprimono normali livelli di FLNA, ma non esprimono naturalmente il CASR, a differenza delle cellule paratiroidee (Figura 15). Le cellule adenomatose hanno mostrato una diversa espressione di FLNA e CASR, come mostrato nelle immagini di immunofluorescenza in figura 16. L'espressione della FLNA era molto scarsa (Figura 16b), mentre il CASR era espresso principalmente nel citoplasma e non nella membrana (Figura 16c). Solo poche cellule hanno mostrato una co-localizzazione tra FLNA e CASR a livello della membrana

(Figura 16d). Questi dati indicano una ridotta espressione della FLNA nelle cellule paratiroidi adenomatose.

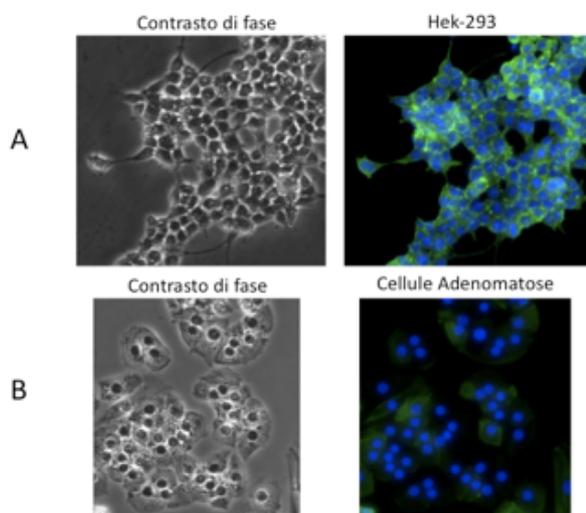


Figura 15. Immunofluorescenza della FLNA: Confronto di espressione tra cellule HEK-293 e cellule adenomatose. I pannelli in A mostrano cellule HEK-293 in contrasto di fase e dopo marcatura per la FLNA; i pannelli in B mostrano cellule di adenoma della paratiroide in contrasto di fase ed dopo marcatura per FLNA. L'immunocolorazione della FLNA è mostrata in verde, mentre i nuclei sono colorati in blu.

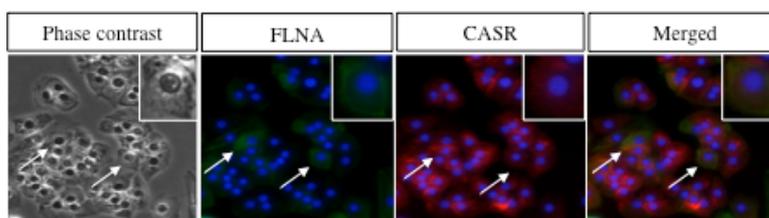


Figura 16. Immunofluorescenza di FLNA e CASR in cellule tumorali paratiroidi umane: I pannelli mostrano un gruppo di cellule paratiroidi che dimostrano immunocolorazione per la FLNA in verde, immunocolorazione per il CASR in rosso, e l'immagine risultante dalla fusione di FLNA e CASR in giallo. Nei riquadri in alto a destra è mostrato un ingrandimento cellulare.

4.3 Espressione dei livelli di mRNA di FLNA e CASR in tessuti adenomatosi paratiroidi

I livelli di espressione di mRNA di *FLNA* e *CASR* sono stati quantificati mediante analisi di Real-Time PCR in 74 campioni tissutali di adenoma paratiroideo sporadico rimossi chirurgicamente da pazienti con diagnosi clinica ed ormonale di PHPT. I livelli di mRNA di *FLNA* e *CASR*, normalizzati sui livelli di mRNA del gene housekeeping *GAPDH*, sono risultati variabili a secondo del tessuto adenomatoso analizzato ma positivamente correlati ($r^2=0.223$ $P<0.0001$) (Figure 17).

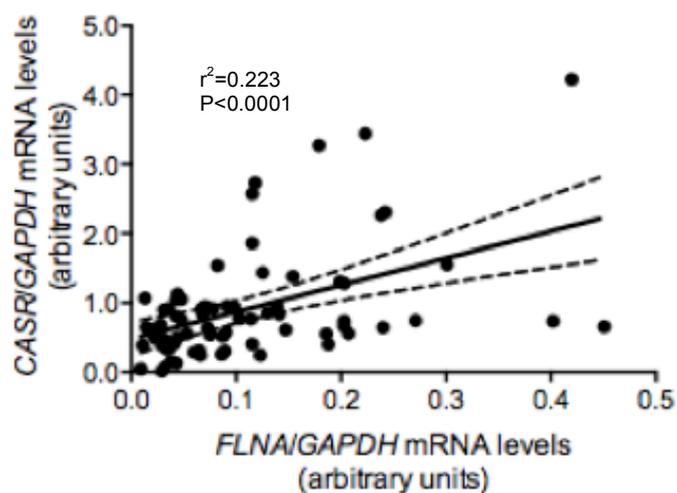


Figura 17. Livelli di espressione di mRNA di FLNA e CASR: I livelli di mRNA di FLNA e CASR sono stati normalizzati sui livelli di mRNA del gene housekeeping GAPDH. I livelli di mRNA di FLNA e CASR mostrano una significativa correlazione positiva.

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

Gli stessi campioni tissutali (n=74) di adenoma delle paratiroidi, su cui sono stati misurati i livelli di mRNA di FLNA e CASR, sono stati genotipizzati per il polimorfismo R990G del CASR al fine di correlare l'espressione delle due proteine con il genotipo. Dai risultati è emerso che 68 campioni tumorali erano portatori della variante allelica maggiore 990R mentre solo 6 presentavano la variante allelica minore 990G del gene CASR. Non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi (AG e GG) nella mediana dei livelli di espressione del gene FLNA (Figura 18A). E' stato, però, osservato un trend di associazione tra l'allele minore 990G ed un maggiore livello di espressione del gene CASR rispetto alla variante allelica 990R (Figura 18B).

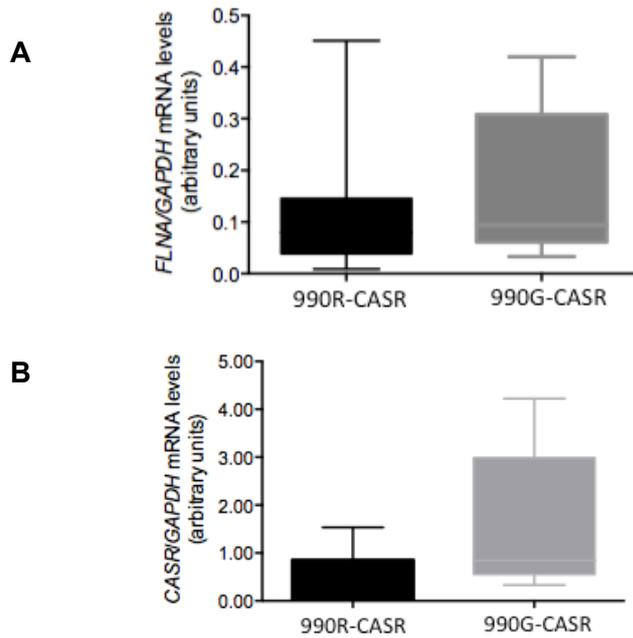


Figura 18. Espressione di mRNA di FLNA e CASR in tessuti di adenoma paratiroideo: **A)** livello di espressione dell'mRNA di FLNA in relazione alle due varianti alleliche del gene CASR. Le differenze di espressione delle mediane riportate in grafico non sono risultate significative; **B)** livello di espressione dell'mRNA del CASR in relazione alla presenza della variante allelica maggiore 990R o minore 990G. Si osserva un trend di associazione tra la presenza della variante 990G ed una maggiore espressione del CASR. Sia i livelli di espressione di FLNA che di CASR sono stati normalizzati sui livelli di espressione del gene housekeeping GAPDH.

Inoltre, le analisi di correlazione genotipo-fenotipo hanno mostrato che i livelli sierici di PTH erano inferiori nei pazienti aventi l'allele di rischio 990G rispetto a quelli portatori dell'allele 990R (p=0.003) (Tabella 1).

Genotyping	990R/990R n=68	990R/990G n=6	P
Serum alb-corr calcium (mg/dl)	11.6±0.1	11.3±0.4	ns
Serum intact PTH (pg/ml)	328.1±44.0	171.0±24.9	0.003
Serum phosphate (mg/dl)	2.3±0.1	2.2±0.3	ns
Mean Qty FLNA	0.106±0.011	0.164±0.061	ns
Mean Qty CASR	0.851±0.083	1.575±0.619	ns

Tabella 1. Correlazione genotipo 990R/990R o 990R/990G con parametri biochimici ed espressione genica di FLNA e CASR: la tabella mostra una significativa differenza tra i valori di PTH nei pazienti portatori del genotipo 990R/990G e quelli portatori di 990R/990R. alb-corr =albumin-corrected calcium; iPTH =intact parathormone, Qty =relative quantity; FLNA =filamin A; CASR =calcium sensing receptor.

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

Per testare l'effetto del silenziamento della FLNA sulla via di segnalazione attivata dal CASR, le cellule HEK-293 sono state co-trasfettate con il siRNA della FLNA e il plasmide contenente il gene CASR WT (R990R) o polimorfico (R990G). Dopo 72h, è stata valutata l'espressione del CASR e della FLNA mediante Western blot sia su estratti proteici totali sia su estratti proteici di membrana. Cellule co-trasfettate con il siRNA controllo negativo e il plasmide contenente il gene CASR sono state utilizzate come controllo (siRNA Ctr-). La percentuale media di silenziamento della FLNA, ottenuta da tre diversi esperimenti, era del 70-80% (figura 19 A e B).

Il silenziamento della FLNA influenza l'espressione proteica del CASR: i livelli di espressione del CASR WT e R990G risultavano diminuiti in

maniera significativa in assenza di FLNA (Figura 20 A e B). Inoltre è stata riscontrata una maggiore espressione del CASR R990G rispetto al CASR WT in presenza di FLNA, confermando il guadagno di funzione del recettore polimorfico. L'espressione del recettore in cellule co-trasfettate con il siRNA controllo negativo e il plasmide contenente il gene CASR (siRNA Ctr-) è risultata paragonabile all'espressione proteica ottenuta da cellule trasfettate con il solo plasmide del gene CASR (Figura 20).

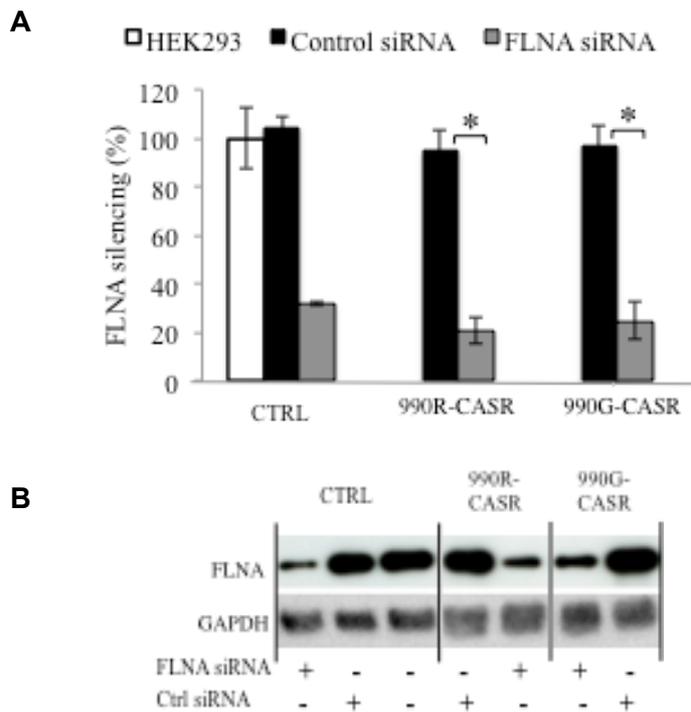


Figura 19. Silenziamento FLNA: Il western blot (A-B) è stato eseguito su estratti proteici totali. Come controllo negativo è stato utilizzato un siRNA scramble co-trasfettato con il gene CASR. I livelli di espressione della Filamina A sono stati normalizzati sui livelli di GAPDH. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte * $P < 0.001$.

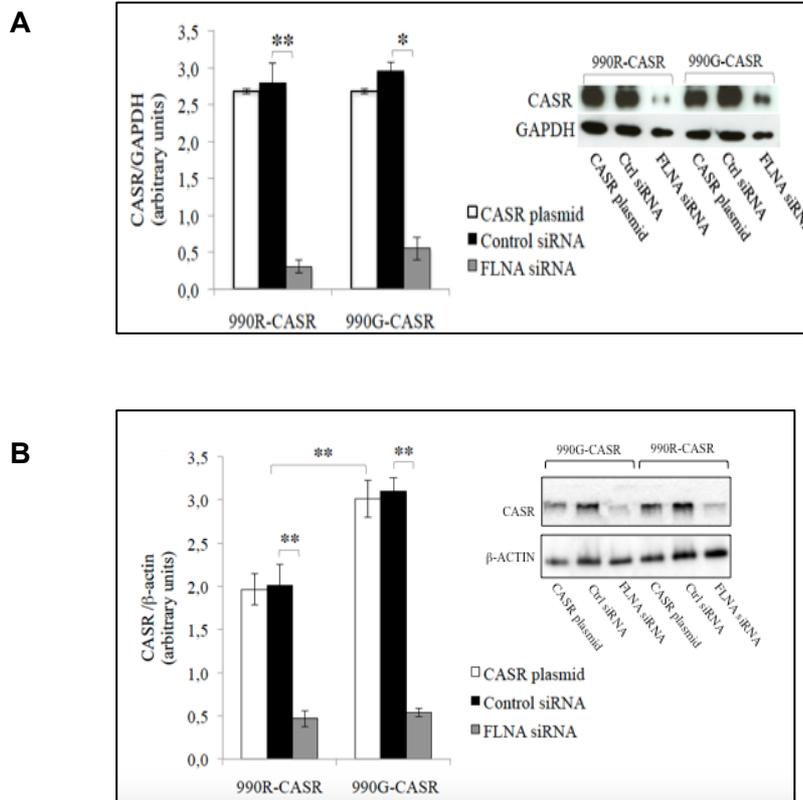


Figura 20. Espressione proteica del CASR: l'analisi di Western blot è stata eseguita su estratti proteici totali (A) e su proteine di membrana (B). Un siRNA scramble co-trasfettato con il CASR è stato utilizzato come controllo negativo (siRNA Ctr-). Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. * $p < 0.001$; ** $p < 0.05$.

Questi dati sono stati confermati mediante analisi di immunofluorescenza in cellule HEK-293 silenziate per la FLNA e trasfettate con il recettore WT o polimorfico. Le immagini hanno mostrato, come atteso, una diminuzione dell'espressione della Filamina A dopo silenziamento e una concomitante diminuzione dell'espressione del CASR WT e polimorfico rispetto alle cellule esprimenti la Filamina A. Tuttavia le cellule silenziate per la FLNA

hanno mostrato una maggiore riduzione della proteina CASR WT rispetto a quella CASR R990G, in accordo con i risultati di western blot con estratti proteici totali (figura 21).

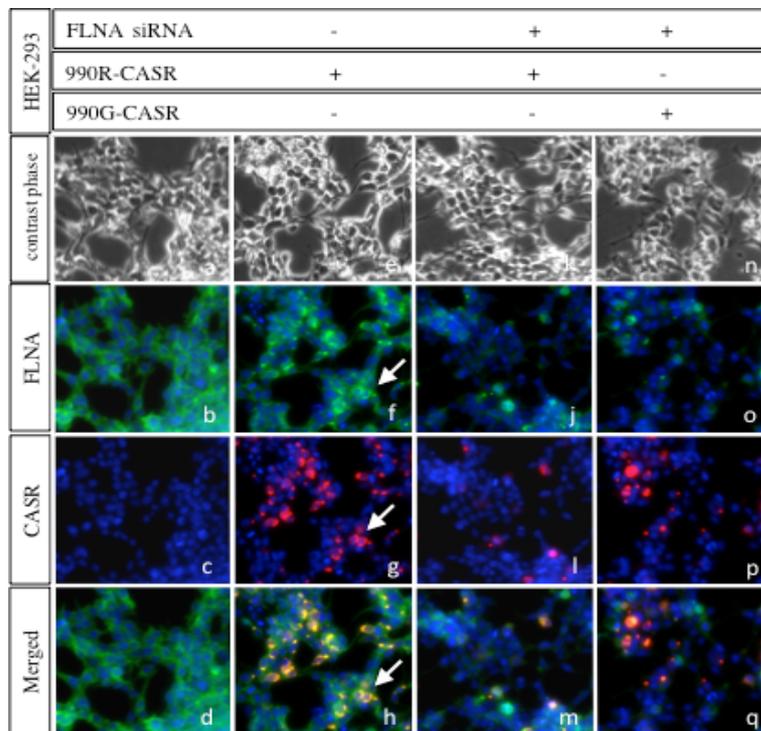


Figura 21. Immagini di immunofluorescenza di FLNA e CASR in cellule HEK-293: I pannelli mostrano le cellule HEK-293 non trasfettate (a,b,c,d), cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide WT-CASR (e,f,g,h), cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide WT CASR e silenziate per FLNA (i,j,k,m) e cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide CASR polimorfico e silenziate per FLNA (n,o,p,q). L'immunocolorazione per la FLNA viene visualizzata in verde, per il CASR in rosso mentre la co-localizzazione delle due proteine è visualizzata in giallo.

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

Per testare le eventuali alterazioni del pathway del CASR nelle cellule silenziate per la FLNA, abbiamo valutato l'attività di ERK 1/2. A questo scopo sono stati misurati i livelli di fosforilazione di ERK (p-ERK) attraverso Western Blot in cellule WT-CASR e R990G-CASR, dopo stimolazione con CaCl_2 (0.5, 1, 3 e 5 mM) e con calciomimetico R-568 (0, 0.01 e 0.1 μM).

In seguito a silenziamento genico della FLNA, nelle cellule HEK-293 trasfettate transientemente con il plasmide CASR-WT non è stata osservata una significativa alterazione dei livelli di fosforilazione di ERK a concentrazioni di CaCl_2 0.5 e 1mM, mentre a 3 e 5mM di CaCl_2 si è vista una riduzione significativa dei livelli di p-ERK rispetto alle cellule trasfettate con il control siRNA (0.75 ± 0.06 vs 0.92 ± 0.08 ; $P=0.006$ a 3mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$; 0.71 ± 0.24 vs 1.21 ± 0.38 ; $P=0.02$ a 5mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$)(Figura 22A).

Nelle cellule HEK-293 trasfettate con il plasmide CASR-990G e FLNA siRNA, invece, è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di p-ERK a concentrazioni di 5mM CaCl_2 rispetto a quelle CASR-990G trasfettate con il control siRNA (1.33 ± 0.43 vs 2.54 ± 0.74 ; $P=0.04$) (Figura 22A).

Un risultato diverso è stato ottenuto stimolando le cellule con il calciomimetico R-568: a concentrazioni di 0.5, 1, 3 e 5 mM CaCl_2 in presenza di R568 0,01 μM l'espressione di entrambi i tipi recettoriali non risultava diminuito in maniera significativa in assenza di FLNA (figura 22B). Tuttavia, il CASR polimorfico conservava il suo guadagno di funzione in presenza di FLNA rispetto al CASR wild- type con una differenza statisticamente significativa quando stimolato con CaCl_2 5 mM e R-568 0,01 μM (1.25 ± 0.16 vs 1.91 ± 0.03 ; $P=0.02$) (figura 23 B).

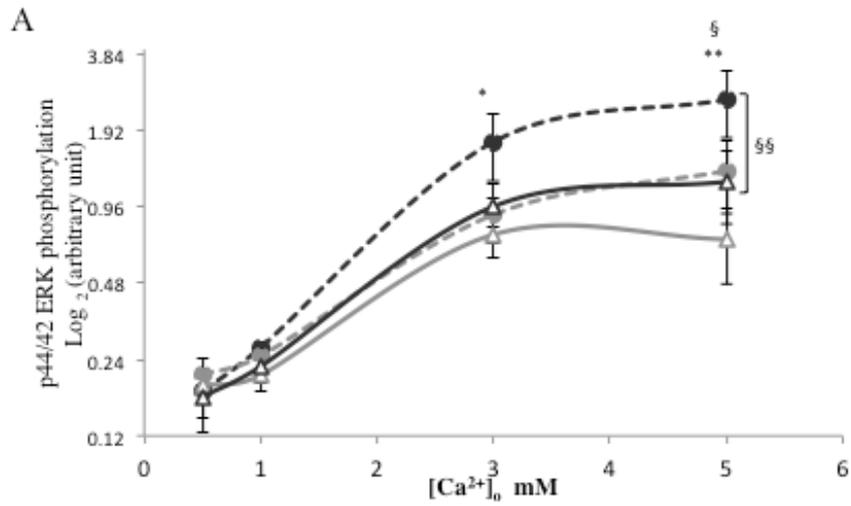


Figura 22 A. Effetto dell'incremento di $[Ca^{2+}]_o$ sui livelli di fosforilazione di ERK p44/42 in cellule HEK-293 cells transfettate con CASR-WT e FLNA siRNA: (A) Curva dose-risposta dei livelli di fosforilazione di p44/42 ERK indotta dall'attivazione di CASR-WT e CASR-990G dopo stimolazione con $[Ca^{2+}]_o$ da 0.5 a 1, 3 e 5mM. *, $P=0.006$ and **, $P=0.02$ tra FLNA siRNA+CASR-WT e Ctrl siRNA+CASR-WT a 3 e 5mM $[Ca^{2+}]_o$, rispettivamente; §, $P=0.04$ tra FLNA siRNA+CASR-990G e Ctrl siRNA+CASR-990G. I dati sono espressi come media±deviazione standard di esperimenti in triplicato.

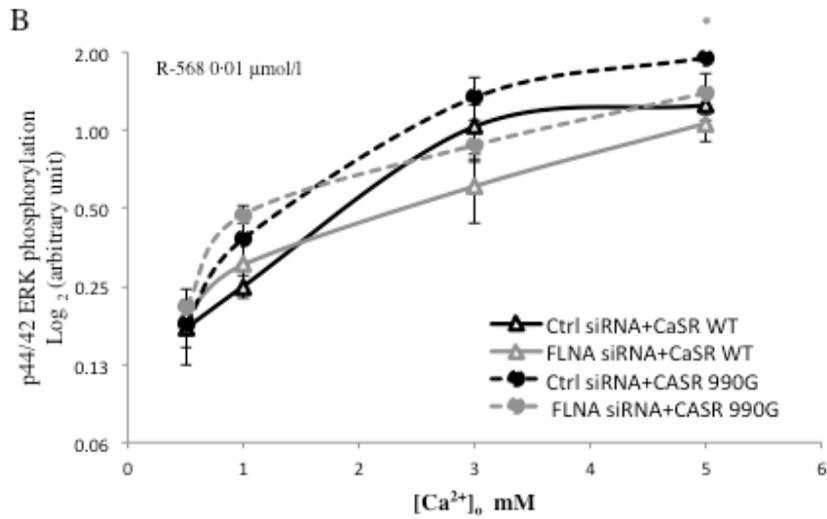


Figura 22 B. Effetto dell'incremento di $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sui livelli di fosforilazione di ERK p44/42 in cellule HEK-293 trasfettate con CASR-990G e FLNA siRNA: Curva dose-risposta calcolata in presenza di R-568 a 0.01 $\mu\text{mol/l}$. Il silenziamento di FLNA non ha mostrato differenze significative tra Ctrl siRNA+CaSR-WT e FLNA siRNA+CaSR-WT; mentre si osserva in presenza di FLNA una differenza statisticamente significativa a CaCl_2 5 mM tra Ctrl siRNA+CaSR-990G e FLNA siRNA+CaSR-990G (*, $P=0.02$). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard di esperimenti in triplicato.

5. DISCUSSIONE

5. Discussione

La Filamina A è una proteina scaffold coinvolta principalmente nella gelificazione citoplasmatica, nella contrazione e nel movimento cellulare (155). Essa partecipa nelle interazioni proteina-proteina influenzando così la localizzazione cellulare delle proteine. E' inoltre coinvolta in diversi tipi di tumori nei quali è stata trovata overespressa (^{164, 165, 166}) o poco espressa (¹⁷⁷) a seconda del tipo di tumore considerato. Non ci sono attualmente dati in letteratura riguardanti la sua espressione nei tumori delle paratiroidi. Tuttavia, studi presenti in letteratura hanno individuato una down-regolazione in una delle 90 filamin-binding proteins coinvolte nella regolazione dell'attivazione di recettori come il Calcium sensing receptor (CASR). Il CASR è un recettore sensibile alle variazioni della concentrazione di calcio extracellulare ($[Ca^{2+}]_o$), espresso nei tessuti coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del calcio quali le paratiroidi e coinvolto nella regolazione del metabolismo del calcio. Tale recettore avverte i cambiamenti extracellulari della concentrazione di calcio ed attiva differenti pathways intracellulari per normalizzare i livelli di calcio nel sangue (⁴⁶). In particolare, l'attivazione del CASR, attraverso specifiche G proteins (Gq), induce la mobilizzazione del calcio dagli stores del reticolo endoplasmico attraverso l'aumento dell'IP3 e attiva la PKC, quest'ultima sembra essere coinvolta nel pattern di oscillazioni intracellulari di calcio (¹²⁹). L'attivazione del recettore è in grado di attivare anche la cascata delle MAPK attraverso la fosforilazione delle chinasi p44/42 regolate da segnali extracellulari (ERK). Per l'attivazione della via delle MAPK indotta dal CASR è necessaria, appunto, l'interazione del recettore con la Filamina A, che interagisce con la porzione citoplasmatica carbossi-terminale del CASR a livello dei residui 907-997 (^{31,32}). Tale interazione stabilizza il CASR in membrana ed attenua la sua degradazione, facilitando il signaling delle MAPKs (¹⁷⁸). E' stato inoltre dimostrato che la Filamina A è coinvolta

nell'inibizione da parte del CASR della secrezione di PTH delle cellule paratiroidee umane (³²). Proprio nella regione di legame con la FLNA cade lo SNP non conservativo Arg990Gly (R990G) del gene CASR. E' stato dimostrato che tale polimorfismo, localizzato nell'esone 7 del gene, è associato ad ipercalciuria idiopatica e causa un guadagno di funzione del recettore, rendendolo più sensibile alle variazioni della $[Ca^{2+}]_o$ (⁷⁹). Inoltre è stato dimostrato che il recettore polimorfico mostra un aumento della sensibilità ai calciomimetici (R-568) ed un pattern di oscillazioni intracellulari di calcio differenti rispetto al recettore wild-type (WT), in particolare in presenza di inibitori di PKC (¹⁷⁹).

Dati presenti in letteratura mostrano che l'attività di ERK 1/2 mediata dal CASR si riduce in adenomi della paratiroide rispetto a cellule isolate da tessuto normale della paratiroide (¹⁸⁰) confermando che il CASR risulta down regolato nei tumori della paratiroide.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di investigare l'espressione della FLNA nei tumori delle paratiroidi, l'interazione tra FLNA e CASR e l'effetto di questa interazione sul signaling delle MAPKs, identificando un'eventuale differenza d'interazione con la FLNA e quindi di attivazione del pathway in presenza del polimorfismo R990G del gene CASR. A tale scopo è stato studiato il rapporto tra FLNA e CASR in tessuti di adenoma e carcinoma della paratiroide. I dati di immunistochemica e immunofluorescenza mostrano che la Filamina A è down regolata nei tumori della paratiroide. In particolare, l'espressione della FLNA diminuisce all'aumentare del grado di malignità tumorale. Inoltre i dati di correlazione dei livelli di mRNA della FLNA e del CASR con il genotipo del polimorfismo R990G hanno mostrato un aumento non significativo sia dell'espressione della FLNA che del CASR in presenza del genotipo eterozigote (AG) rispetto al genotipo omozigote per l'allele più frequente (AA), tuttavia è stata osservata una correlazione positiva tra i livelli di mRNA di FLNA e

CASR in questi tipi di tumore. Inoltre, l'analisi di correlazione genotipo-fenotipo ha evidenziato una diminuzione significativa dei livelli sierici di PTH in pazienti portatori dell'allele minore rispetto a quelli aventi l'allele maggiore. Questi dati sono in linea con dati già presenti in letteratura in cui si osserva che i pazienti affetti da iperparatiroidismo primario portatori dell'allele di rischio dello SNP R990G mostrano livelli sierici di PTH più bassi rispetto ai pazienti portatori del genotipo più frequente (⁷⁵).

I risultati della correlazione tra i livelli di mRNA della FLNA e del CASR con il genotipo in adenomi paratiroidei ci permettono di ipotizzare la presenza di microRNA che potrebbero inibire l'espressione del CASR o della Filamina A. In particolare, dati presenti in letteratura dimostrano che i livelli di espressione di 2 microRNA (miRNA), miR-503 e miR-296, risultano alterati nei tumori delle paratiroidi rispetto alle paratiroidi normali (¹⁸⁰). Algoritmi computerizzati (TargetScan e Miranda) identificano la Filamina A come potenziale gene target dei miR-296-5p e miR-503, che sono stati trovati down-regolati e over-espressi, rispettivamente nei tumori paratiroidei rispetto al tessuto normale paratiroideo. Potremmo, quindi, ipotizzare un ruolo del CASR nella regolazione dell'espressione dei 2 miRNA, che possano dimostrare la correlazione positiva dei livelli di mRNA della FLNA e del CASR. Quest'ipotesi è supportata da risultati recentemente pubblicati che hanno dimostrato che il CASR è in grado di inibire 2 miRNA, miR-9 e miR374, proteggendo la Claudina-14 dall'inibizione da parte dei 2 microRNA.

Sulla base di queste conoscenze, è stato anche indagato l'effetto del silenziamento della FLNA sull'espressione proteica del CASR, riscontrando sia una diminuzione dell'espressione proteica totale che di membrana del CASR-WT e CASR-R990G in assenza di FLNA; ciò conferma l'importanza della FLNA non solo nel proteggere il recettore dalla degradazione, ma anche nella stabilizzazione in membrana. Tuttavia in presenza di FLNA,

l'espressione del recettore polimorfico risultava aumentata rispetto al WT, risultato che potrebbe spiegare il guadagno di funzione del CASR R990G come conseguenza di una maggiore stabilità in membrana. Questi dati ottenuti con analisi di western blot sono stati confermati con esperimenti di immunofluorescenza su cellule HEK-293, che in condizioni normali esprimono la FLNA ma non il CASR, trasfettate con CASR WT o CASR-R990G e silenziate per la Filamina A. Infatti le immagini ottenute mostrano una riduzione dei livelli proteici del recettore wild type e polimorfico, anche se in misura minore per quest'ultimo.

Oltre a misurare i livelli di espressione del CASR è stata valutata l'attività del recettore in assenza di FLNA, misurando i livelli di fosforilazione di Erk 1/2 indotti dal CASR e ottenendo risultati concordanti: l'attività di p-Erk dopo stimolazione esterna con 3 e 5 mM di CaCl₂ risultava diminuita nelle cellule trasfettate sia con CASR WT che polimorfico in assenza di FLNA. I dati ottenuti confermano l'importante ruolo della Filamina A nell'attivazione di ERK 1/2 indotta dal CASR e la sua capacità di proteggere il recettore dalla degradazione, particolarmente in presenza del polimorfismo R990G. Possiamo quindi ipotizzare che l'aumentata attività del recettore polimorfico possa essere dovuta al legame più forte con la Filamina A, che potrebbe proteggerlo maggiormente dalla degradazione rispetto al CASR WT. La sostituzione di un aminoacido basico come l'arginina con uno neutro come la glicina nella struttura primaria della proteina, determina una ridistribuzione delle cariche elettriche nel dominio C-terminale del CASR, in una zona vicina a quella implicata nel legame con le G-proteine (3° loop intracellulare) e con la Filamina-A (aa 907-997) (³¹). Inoltre, la glicina, avendo una catena laterale di dimensione inferiore, permette una maggiore libertà di movimento ed un angolo di rotazione dell' α -elica più stretto nella struttura secondaria della proteina (¹⁸¹). È probabile quindi che questa sostituzione aminoacidica provochi un cambiamento conformazionale del

dominio C-terminale della proteina, rafforzando il legame con la Filamina-A, la quale potrebbe stabilizzare la proteina in membrana proteggendola dalla normale degradazione.

E' noto in letteratura che il recettore polimorfico mostra un aumento della sensibilità ai calciomimetici (¹⁷⁹), per cui è stato valutato se l'assenza di FLNA possa influire sulla risposta dei due tipi recettoriali all'R-568. Il calciomimetico R-568 è un modulatore allosterico positivo del CASR ad azione stereoselettiva, infatti solo la forma R è attiva. La sua azione consiste nell'aumentare l'affinità del recettore verso il calcio extracellulare (riduce la EC₅₀ per il calcio) e non è in grado di attivare il CASR in assenza di calcio (¹⁰²). La stimolazione con calciomimetico R-568 0.01 µM e 5mM CaCl₂ confermava la differenza di attivazione tra recettore WT e polimorfico in presenza di FLNA: il CASR-R990G conservava il suo guadagno di funzione, confermando un dato già precedentemente pubblicato (¹⁷⁹). Maggiori concentrazioni di calciomimetico probabilmente saturano il recettore, annullando la risposta.

In letteratura è stato dimostrato che il calciomimetico R-568 è in grado di aumentare l'espressione dell' mRNA del CASR. Questo potrebbe spiegare la mancata diminuzione dell'attività di p-ERK anche silenziando la FLNA (¹⁸²). Saranno comunque necessari ulteriori studi per valutare l'effetto di R-568 nelle varie condizioni sperimentali. Inoltre molto interessanti sono i dati mostrati da Rothe *et al.* (¹⁰⁹) in uno studio clinico su pazienti con 2°HPT, che sono risultati più sensibili al trattamento farmacologico con calciomimetici se portatori della variante allelica 990Gly. Sembra quindi che la presenza del polimorfismo Arg990Gly al C-terminale del CASR, oltre che determinare un aumento della sensibilità verso il calcio extracellulare, sia in grado di aumentare la sensibilità del recettore anche ad agenti farmacologici come i calciomimetici. Esiste quindi la possibilità di attuare un trattamento farmacologico specifico in base al genotipo dei pazienti.

6. CONCLUSIONI

6. CONCLUSIONI

Nei tumori delle paratiroidi sia la FLNA che il CASR risultano down-regolati ed i loro livelli di espressione sono positivamente correlati. In particolare, il trend di associazione che è stato osservato tra l'espressione dell'mRNA della FLNA e del CASR con il polimorfismo R990G ci farebbe ipotizzare un ruolo protettivo di questo SNP nei tumori delle paratiroidi, con un meccanismo ancora sconosciuto.

Inoltre, questo studio ci ha permesso di dimostrare che la FLNA è necessaria per l'attivazione del pathway di ERK1/2 attivato sia dal CASR Wild-Type che polimorfico, perciò possiamo affermare che il guadagno di funzione del CASR R990G potrebbe essere dovuto all'interazione più stabile con la FLNA indotta dal polimorfismo non conservativo nella regione di legame. Infine, la presenza del calciomimetico R-568 sostituisce la FLNA mascherando così l'effetto della sua down-regolazione.

Sviluppi Futuri

Sarà necessario studiare il ruolo dei miR-503 e miR-296 sulla modulazione dell'espressione genica della FLNA e l'eventuale coinvolgimento del CASR nell'asse miRNA-FLNA, al fine di verificare l'ipotesi che un aumento dell'espressione della Filamina A in cellule tumorali paratiroidee possa aumentare l'espressione del CASR, inibire la sua degradazione e la concentrazione di calcio extracellulare, tutti processi fondamentali per inibire la produzione di paratormone nei tumori.

7. BIBLIOGRAFIA

¹ Kasper, Braunwald, Fauci, hauser, Longo and Jameson. Harrison "Principi si Medicina Interna", 16° edizione Volume II.

² Brown EM. "Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and others ions as extracellular (first) messengers". *Physiol Rev*, 71:371-411, 1991.

³ 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.

⁴ Schulte KM1, Talat N. Diagnosis and management of parathyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Oct;8(10):612-22. doi: 10.1038/nrendo.2012.102. Epub 2012 Jul 3.

⁵Rodgers SE, Terrier ND. Parathyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:16-22.

⁶ Marcocci C, Cetani F, Rubin MR, Silverberg SJ, Pinchera A, Bilezikian JP. Parathyroid carcinoma. Review. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (12): 1869-80.

⁷ Schulte KM, Gill AJ, Barczynski M, Karakas E, Miyauchi A, Knoefel WT, Lomabrdi CP, Talat N, Diaz-Cano S, Grant CS. Classification of Parathyroid Cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 (8): 2620-8.

⁸ Okamoto T, Iihara M, Obara T, Tsukada T. Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis and treatment. *World J Surg* 2009; 33: 2343-54.

⁹ F. Martini, *Fondamenti di anatomia e fisiologia*, Napoli, EdiSES, 1994.

-
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Aida K, Koishi S, Tawata M, Onaya T. "Molecular cloning of a putative Ca²⁺ -sensing receptor cDNA from human kidney". *Bioch Bioph Res Commun*, 214 (2): 524-529, 1995.
- ¹² Hofer AM, Brown EM. "Extracellular calcium sensing and signaling". *Nature Rev Mol Cell Biol*, 4:530-538, 2003.
- ¹³ Corbetta, S.; Lania, A.; Filopanti, M.; Vicentini, L.; Ballarè, E.; Spada, A. Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **2002**, 87, 2201-2205.
- ¹⁴ Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor". *J Biol Chem*, 271: 19537-19545, 1996.
- ¹⁵ Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM. "Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction". *J Biol Chem*, 273: 34558-34567, 1998.
- ¹⁶ Fan GF, Goldsmith PK, Collins R, Dunn CK, Krapcho KJ, Rogers KV, Spiegel AM. "N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface". *Endocrin*, 138: 1916-1922, 1997.
- ¹⁷ O'Hara PJ, Sheppard PO, Thorgersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER. "The ligand-binding domain in

metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins". *Neuron*, 11: 41-52, 1993.

¹⁸ Conklyn BR, Bourne HR. "The marriage of flytrap and the serpent". *Nature*, 367: 22, 1994.

¹⁹ Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PT, Spiegel AM. "Human Ca²⁺ receptor extracellular domain". *J Biol Chem*, 276 (34): 32145-32151, 2001.

²⁰ Brauner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard P, O'Hara P, Krogsgaard-Larsen P. "The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain" *J Biol Chem*, 274: 18382-18386, 1999.

²¹ Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺ o -sensing receptor". *J Biol Chem*, 271: 19537-19545, 199.

²² Ray K, Northup J. "Evidence for distinct cation and calcimimetic compound (NPS 568) recognition domains in the transmembrane regions of the hhuman Ca²⁺ receptor". *J Biol Chem*, 277: 18908-18913, 2002.

²³ Hu J, Reyes-cruz G, Chen W, Jacobson KA, Spiegel AM. "Identification of the acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺ receptor critical for response to Ca²⁺ and positive allosteric modulator". *J Biol Chem*, 277: 46622-46631, 2002.

²⁴ Miedlich S, Gama L, Seuwen K, Wolf RM, Breitwieser GE. "Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site". *J Biol Chem*, 279 (8): 7254-7263, 2004.

-
- ²⁵ Hu J, McLarnon SJ, Mora S, Jiang J, Thomas C, Jacobson KA, Spiegel AM. "A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺-receptor critical for response to Ca²⁺". J Biol Chem, 280 (6): 5113-5120, 2005.
- ²⁶ Chang W, Chen TH, Pratt S, Shoback D. "Amino acids in the second and third intracellular loop of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C". J Biol Chem, 275: 19955-19963, 2000.
- ²⁷ Wess J. "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity". Pharmacol Ther, 80: 231-264, 1998.
- ²⁸ Bai M, Trivedi S, Brown EM. "Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK-293 cells". J Biol Chem, 273: 23605-23610, 1998.
- ²⁹ Bai M, Janjic N, Trivedi S, Quinn S, Cole DEC, Brown EM, Hendy GN. "Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". J Clin Invest, 99: 1917-1925, 1997.
- ³⁰ Ray K, Fan GF, Goldsmith PK, Spiegel AM. "The carboxyl terminus of the human calcium receptor. Requirement for cell-surface expression and signal transduction". J Biol Chem, 272: 31355-31361, 1997.
- ³¹ Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. "Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein". J Biol Chem, 276: 34871-34879, 2001.
- ³² Hjalms G, MacLeod RJ, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. "Filamin-A binds carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interactions that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase". J Biol Chem, 276: 34880-34887, 2001.

³³ Brown EM. "Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and others ions as extracellular (first) messengers". *Physiol Rev*, 71:371-411, 1991.

³⁴ Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. "Mechanisms of secondary hyperparathyroidism". *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F367-F376, 2002.

³⁵ Riccardi D, Gamba G. "The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease". *Arch Med Res*, 30: 436-448, 1999.

³⁶ Goodman WG, Veldhuis JD, Berlin TR, Van Herle AJ, Juppner H, Salusky IB. "Calcium-sensing by parathyroid glands in secondary hyperparathyroidism". *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2765-2772, 1998.

³⁷ Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, Gagel RF, Brown EM. "Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an an extracellular calcium receptor gene". *Endocrinol*, 136: 5202-5211, 1995.

³⁸ Freichel M, Zink-lorenz A, Holloschi A, Hafner M, Flockerzi V, Raue F. "Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion". *Endocrinol*, 137: 3842-3848, 1996.

³⁹ McGehee DS, Aldersberg M, Liu KP, Hsuing S, Heath MJ, Tamir H. "Mechanism of extracellular Ca²⁺ receptor-stimulated hormone release from sheep thyroid parafollicular cells". *J Physiol*, 502: 31-44, 1997.

⁴⁰ Ward DT, Riccardi D. "Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor". *Eur J Physiol*, 445: 169-176, 2002.

-
- ⁴¹ 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.
- ⁴² 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.
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 15-26.
- ⁴⁶ Ward DT, Riccardi D. Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Eur J Physiol* 2002;445:169-76.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt S, et al. Expression and signal trasduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 1999;140(12):5883-93.
- ⁴⁹ Pi M, Quarles LD. Osteoblast calcium-sensing receptor has characteristics of ANF/7TM receptors. *J Cell Biochem* 2005;95:1081-92.

-
- ⁵⁰ 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.
- ⁵¹ Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. "Ca²⁺-sensing receptors in intestinal epithelium". *Am J Physiol Cell Physiol*, 273: 1168-1175, 1997.
- ⁵² Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, Hebert SC, Soybel DI, Brown EM. "Identification and localization of extracellular Ca²⁺-sensing receptor in rat intestine". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274: G122-G130, 1998.
- ⁵³ Kirchhoff P, Geibel JP. "Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology". *World J Gastroenterol*, 12 (20): 3229-3236, 2006.
- ⁵⁴ Tfelt-Hansen J, Brown EM. "The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review". *Crit Rev Clin Lab Sci*, 42 (1): 35-70, 2005.
- ⁵⁵ Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. "Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals". *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 3161-3165, 1995.
- ⁵⁶ Chattopadhyay N, Ye C, Singh DP, Kifor O, Vassilev PM, Shinohara T, Chylack LT, Brown EM. "Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens epithelium cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 233: 801-805, 1997.
- ⁵⁷ House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Leboff MS, Glowacki J, Brown EM. "Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells". *J Bone Miner Res*, 12 (12): 1959-1970, 1997.
- ⁵⁸ Chou YH, Brown EM, Levi T, Crowe G, Atkinson AB, Arnqvist HJ, Toss G, Fuleihan GE, Seidman CE. "The gene responsible for familial hypocalciuric

hypercalcemia maps to chromosome 3q in four unrelated families". *Nat Genet* 1:295-300, 1992.

⁵⁹ Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Riviere M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN. "Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescent in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16". *Mamm Genome* 6: 798-801, 1995.

⁶⁰ Pearce SHS, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, Heath DA, Hughes IA, Paterson CR, Whyte MP, Thakker RV. "Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism". *J Clin Invest*, 96: 2683-2692, 1995.

⁶¹ Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obara T, Matsumoto T, Fujita T. "Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CASR) and changes of CASR expression in parathyroid adenomas". *J Biol Chem*, 275 (11): 7553-7557, 2000.

⁶² Canaff L, Hendy GN. " Human calcium-sensing receptor gene". *J Biol Chem*, 277 (33): 30337-30350, 2002.

⁶³ Canaff L, Hendy GN. " Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1b". *J Biol Chem*, 280 (14): 14177-14188, 2005.

⁶⁴ Bradbury RA, Sunn KL, Crosslet M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, Conigrave AD. "Expression of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta". *J Endocrinol*, 156: 425-430, 1998.

⁶⁵ D'Souza-Li L, Canaff L, Janicic N, Cole DEC, Hendy GN. "An acceptor splice site mutation in calcium-sensing receptor (CASR) gene in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". *Hum Mut*, 18: 411-421, 2001.

-
- ⁶⁶ Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD. "The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratocyte differentiation". *J Biol Chem*, 273: 23344-23352, 1998.
- ⁶⁷ Heath H III, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NRM, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garrett JE, Leppert MF. "Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains". *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (4): 1312-1317, 1996.
- ⁶⁸ Rubin LA, Peltekova V, Janicic N, Liew CC, Hwang D, Evrovski J, Hendy GN, Cole DEC. "Calcium sensing receptor gene: analysis of polymorphism frequency". *Scand J Clin Invest*, 57 (suppl 227): 122-125, 1997.
- ⁶⁹ Cole DEC, Vieth R, Trang HM, Wong BYL, Hendy GN, Rubin LA. "Association between total serum calcium and A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene". *Mol Genet Metab*, 72: 168-174, 2001.
- ⁷⁰ Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S, Muscarella LA, Battista C, D'Agruma L, Bertoldo F, Florio C, Minisola S, Hendy GN, Cole DEC. "Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor". *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (11): 5634-5638, 2004.
- ⁷¹ Miedlich S, Lamesch P, Mueller A, Paschke R. "Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism". *Eur J Endocrinol*, 145: 421-427, 2001.
- ⁷² 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.

⁷³ Lorentzon M, Lorentzon R, Lerner UH, Nordstrom P. "Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentrations and bone mineral density in healthy adolescent girls". *Eur J Endocrinol*, 144: 257-261, 2001.

⁷⁴ Pratt JH, Ambrosius WT, Wagner MA, Maharry K. "Molecular variations in the calcium-sensing receptor in relation to sodium balance and presence of hypertension in blacks and whites". *Am J Hypertens*, 13: 654-658, 2000.

⁷⁵ Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, Saeli P, Vezzoli G, Arcidiacono T, Loli P, Syren ML, Coviello D, Soldati L, Beck-Peccoz P, Spada A. "The R990G polymorphism of calcium sensing receptor gene (CASR) is associated with nephrolithiasis in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT)". *Eur J Endocrinol*, 155: 685-690, 2006.

⁷⁶ Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Yano S, Kanzawa M, Kobayashi A, Chihara K. "Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism", *Clin Endocrin*, 55: 373-379, 2001.

⁷⁷ Yano S, Sugimoto T, Kanzawa M, Tsukamoto T, Hattori T, Hattori S, Chihara K. "Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients". *Nephron*, 85: 317-323, 2000.

⁷⁸ Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Soldati L, Bianchin C, Franceschelli F, Malentacchi C, Porfiro B, Adamo D, Terranegra A, Falchetti A, Cusi D, Bianchi G, Brandi ML. "Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients". *J Am Soc Nephrol*, 13: 2517-2523, 2002.

⁷⁹ Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, Coviello D, Syren ML, Paloschi V, Giannini S, Mignogna G, Rubinacci A, Ferraretto A, Cusi D, Bianchi G, Soldati L. "R990G polymorphism of calcium-sensing-receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria". *Kidney Int*, 71: 1155-1162, 2007.

-
- ⁸⁰ Pollak MR, Brown EM, Chou YHW, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. "Mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism". *Cell*, 75: 1297-1303, 1993.
- ⁸¹ Pearce SHS, Bai M, Quinn SJ, Kifor O, Brown EM, Thakker RV. "Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells". *J Clin Invest*, 98 (8): 1860-1866, 1996.
- ⁸² Bai M, Quinn SJ, Trivedi S, Kifor O, Pearce SHS, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in human Ca^{2+} -sensing receptor". *J Biol Chem*, 271 (32): 19537-19545, 1996.
- ⁸³ Heath H III, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NRM, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garrett JE, Leppert MF. "Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains". *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (4): 1312-1317, 1996.
- ⁸⁴ Pollak MR, Seidman CE, Brown EM. "Three inherited disorders of calcium sensing". *Medicine*, 75 (3): 115-123, 1996.
- ⁸⁵ Thakker RV. "Disorders of the calcium-sensing receptor". *Biochim Biophys Acta*, 1448: 166-170, 1998.
- ⁸⁶ Li Y, Song YH, Rais N, Connor E, Schatz D, Muir A, Maclaren N. "Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism". *J Clin Invest*, 97: 910-914, 1996.
- ⁸⁷ Kifor O, McElduff A, LeBoff MS, FD Jr, Butters R, Gao P, Cantor TL, Kifor I, Brown EM. "Activating autoantibodies to the calcium-sensing receptor in two patients with autoimmune hypoparathyroidism". *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 548-556, 2004.

-
- ⁸⁸ Kifor O, Moore FD Jr, Delaney M, Garber J, Hendy GN, Butters R, Gao P, Cantor TL, Kifor I, Brown EM, Wysolmerski J. "A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor". *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 60-72, 2003.
- ⁸⁹ 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.
- ⁹⁰ 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.
- ⁹¹ Miedlich S, Krohn K, Paschke R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):539-54.
- ⁹² 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.
- ⁹³ Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. "Extracellular calcium-sensing receptor (CaR) expression and its potential role in parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) secretion in the H-500 rat Leydig cell model of humoral hypercalcemia of malignancy". *Biochem Biophys Res Commun*, 269: 427-432, 2000.
- ⁹⁴ Chattopadhyay N. "Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290: 761-770, 2006.
- ⁹⁵ Yoshida O, Terai A, Ohkawa T, Okada Y. "National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995". *Kidney Int*, 56: 1899-1904, 1999.

-
- ⁹⁶ Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM Jr, Curhan GC. "Time trend in reported prevalence of kidney stones in the United States". *Kidney Int*, 63: 1817-1823, 2003.
- ⁹⁷ Robertson WG and Morgan DB. "The distribution of urinary calcium excretion in normal persons and stone-formers". *Clin Chim Acta*, 37: 503-508, 1972.
- ⁹⁸ Levy FL, Adams-Huet B, Pak CY. "Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol". *Am J Med*, 98: 50-59, 1995.
- ⁹⁹ Pak CY. "Kidney stones". *Lancet*, 351: 1797-1801, 1998.
- ¹⁰⁰ Quereda C, Orte L, Sabater J, Navarro-Antolin J, Villafruela J, Ortuno J. "Urinary calcium excretion in treated and untreated essential hypertension". *J Am Soc Nephrol*, 7: 1058-1065, 1996.
- ¹⁰¹ Giannini S, Nobile M, Delle Carbonare L, Lodetti MG, Selle S, Vittadello G, Minicucci N, Crepaldi G. "Hypercalciuria is a common and important finding in postmenopausal women with osteoporosis". *Eur J Endocrinol*, 149: 209-213, 2003.
- ¹⁰² Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BCP, Van Wagenen BC, DelMar EG, Balandrin MF. "Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor". *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4040-4045, 1998.
- ¹⁰³ Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, Colloton M, Karbon W, Scherrer J, Shatzen E, Rishton G, Scully S, Qi M, Harris R, Lacey D, Martin D. "Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl". *Pharmacol Exp Ther*, 308: 627-635, 2004.
- ¹⁰⁴ Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, Rodriguez M. "The effect of calcitriol, paracalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats". *Kidney Int*, 73: 300-307, 2008.

¹⁰⁵ Hebert SC. "Therapeutic use of calcimimetics". *Annu Rev Med*, 57: 349-364, 2006.

¹⁰⁶ Nemeth EF, DeMar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conlin RL, Gowen M, Gleason JG, Bhatnagar PK, Fox J. "Calcilytic compounds: potent and selective Ca receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone". *J Pharm Exp Ther*, 299: 323-331, 2001.

¹⁰⁷ Nemeth EF. "The search for calcium receptor antagonists (calcilytics)". *J Mol Endocrinol*, 29: 15-21, 2002

¹⁰⁸ Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, et al "Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats". *J Clin Invest*, 105: 1595-1604, 2000.

¹⁰⁹ Rothe HM, Shapiro WB, Sun WY, Chou SY. "Calcium-sensing receptor gene polymorphism Arg990Gly and its possible effect on response to cinacalcet HCl." *Pharmacogen and Genomics*, 15: 29-34, 2005.

¹¹⁰ 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.

¹¹¹ Ye C, Rogers K, Bai M, Quinn SJ, Brown EM, Vassilev PM. "Agonists of the Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activate nonselective cation channels in HEK293 cells stably transfected with the human CaR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 572-579, 1996.

¹¹² Kifor O, Diaz R, Butters R, Brown EM. "The Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A₂, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells". *J Bone Min Res*, 12 (5): 715-725, 1997.

-
- ¹¹³ Hofer AM, Landolfi B, Debellis L, Pozzan T, Curci S. "Free [Ca²⁺] dynamics measured in agonist-sensitive stores of single living intact cells: a new look at the refilling process". *EMBO J*, 17: 1986-1995, 1998.
- ¹¹⁴ Belan P, Gerasimenko O, Petersen OH, Tepikin AV. "Distribution of Ca²⁺ extrusion sites on the mouse pancreatic acinar cell surface". *Cell Calcium*, 22: 5-10, 1997.
- ¹¹⁵ Hofer AM, Curci S, Doble MA, Brown EM, Soybel DI. "Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor". *Nature Cell Biol*, 2: 392-398, 2000.
- ¹¹⁶ Thoma AP. "Sharing calcium opens new avenues of signalling". *Nature Cell Biol*, 2: E126-E127, 2000.
- ¹¹⁷ De Luisi A, Hofer AM. "Evidence that Ca²⁺ cycling by the plasma membrane Ca²⁺-ATPase increases the 'excitability' of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor". *J Cell Sci*, 116: 1527-1538, 2003.
- ¹¹⁸ Huang C, Handlogten ME, Miller RT. "Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by extracellular calcium-sensing receptor". *J Biol Chem*, 277: 20293-20300, 2002.
- ¹¹⁹ Handlogten ME, Huang C, Shiraishi N, Awata H, Miller RT. "The Ca²⁺-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a G_qα-dependent ERK-independent pathway". *J Biol Chem*, 276: 13941-13948, 2001.
- ¹²⁰ Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. "Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells". *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F291-F302, 2001.
- ¹²¹ De Jesus Ferreira MC, Héliès-Toussaint C, Imbert-Teboul M, Bailly C, Verbavatz JM, Bellanger AC, Chabardès D. "Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable

adenylyl cyclase and of a Ca^{2+} -sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca^{2+} ". *J Biol Chem*, 273 (24): 15192-15202, 1998.

¹²² Crespo P, Xu N, Simonds W, Gutkind J. "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits". *Nature*, 369: 418-420, 1994.

¹²³ Koch W, Hawes B, Allen L, Lefwowitz R. "Direct evidence that G_i -coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G-beta and G-gamma activation of p21 Ras". *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12706-12710, 1994.

¹²⁴ Gutkin JS. "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascade". *J Biol Chem* 273: 1839-1842, 1998.

¹²⁵ Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. "The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 538-541, 2000.

¹²⁶ MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Brown EM. "PTHrP stimulated by the calcium sensing receptor requires MAP kinase activation". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: E435-E442, 2003.

¹²⁷ Stahlhut M, van Deurs B. "Identification of Filamin as a novel ligand for Caveolin-1 : evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton". *Mol Biol Cell*, 11: 325-337, 2000.

¹²⁸ Huang C, Wu Z, Hujer KM, Miller RT. "Silencing of filamin A gene expression inhibits Ca^{2+} -sensing receptor signaling". *FEBS Lett*, 580 (7): 1795-800, 2006.

-
- ¹²⁹ Breitwieser GE, Gama L. "Calcium-sensing receptor activations induces intracellular calcium oscillations". *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1412-C1421, 2001.
- ¹³⁰ Soderling TR, Chang B, Brickey D. "Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II". *J Biol Chem*, 276: 3719-3722.
- ¹³¹ Oancea E, Meyer T. "Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals". *Cell*, 95: 307-318.
- ¹³² Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. "Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria". *Cell*, 82 (3): 415-424.
- ¹³³ Li WH, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY. "Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression". *Nature*, 392: 936-941, 1998.
- ¹³⁴ Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression". *Nature*, 392: 933-936, 1998.
- ¹³⁵ Hu Q, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. "[Ca²⁺]_i oscillation frequency regulates agonist-stimulated NF-kappaB transcriptional activity". *J Biol Chem*, 274: 33995-33998.
- ¹³⁶ Uhlén P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A, Richter-Dahlfors A. "Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells". *Nature*, 405: 694-697.
- ¹³⁷ 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*, 277 (49): 46871-46876, 2002.

-
- ¹³⁸ Miedlich S, Gama L, Breitwieser GE. "Calcium sensing receptor activation by a calcimimetic suggests a link between cooperativity and intracellular calcium oscillations". *J Biol Chem*, 277 (51): 49691-49699, 2002.
- ¹³⁹ Young SH, Rozengurt E. "Amino acids and Ca^{2+} stimulate different patterns of Ca^{2+} oscillations through the Ca^{2+} -sensing receptor". *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: C1414-C1422, 2002.
- ¹⁴⁰ Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E. "Amino acid-stimulated Ca^{2+} oscillations produced by the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G_{12} , Rho, Filamin-A, and the actin cytoskeleton". *J Biol Chem*, 280 (24): 22875-22882, 2005.
- ¹⁴¹ Bosel J, John M, Freichel M, Blind E. "Signaling of the human calcium-sensing receptor expressed in HEK-293-cells is modulated by protein kinases A and C". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 111: 21-26, 2003.
- ¹⁴² Davies SJ, Ozawa A, McCormick WD, Dvorak MM, Ward DT. "Protein kinase c-mediated phosphorylation of the calcium sensing receptor is stimulated by receptor activation and attenuated by calyculin-sensitive phosphatase activity". *J Biol Chem*, 282 (20): 15048-15056, 2007.
- ¹⁴³ Jiang YF, Zhang Z, Kifor O, Lance 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*, 277: 50543-50549, 2002.
- ¹⁴⁴ Bai M, Trivedi S, Lance CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown ER. "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*, 273 (33): 21267-21275, 1998.

-
- ¹⁴⁵ Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. "G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells". *J Biol Chem*, 272: 10188-10195, 1997.
- ¹⁴⁶ Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM. "Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and different tissue distribution of two splice variants". *Endocrinology*, 139: 2784-2795, 1998.
- ¹⁴⁷ Sallese S, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knopfel T, De Blasi A. "The G protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1". *FASEB J*, 14: 2569-2580, 2000.
- ¹⁴⁸ Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. "G protein-coupled receptor kinases". *Annu Rev Biochem*, 67: 653-692.
- ¹⁴⁹ Kohout TA, Lefkowitz RJ. "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization". *Mol Pharmacol*, 63: 9-18, 2003.
- ¹⁵⁰ Reiter E, Lefkowitz RJ. "GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling". *Trends Endocrinol Metab*, 17: 159-165, 2006.
- ¹⁵¹ Shenoy SK, Lefkowitz RJ. "Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling". *J Biochem*, 375: 503-515, 2003.
- ¹⁵² Pi M, Oakley RH, Gesty-Palmer D, Cruickshank RD, Spurney RF, Luttrell LM, Quarles LD. " β -arrestin- and G protein receptor kinase- mediated calcium-sensing receptor desensitization". *Mol Endocrinol*, 19 (4): 1078-1087, 2005.
- ¹⁵³ Lorenz S, Frenzel R, Paschke R, Breitwieser GE, Miedlich SU. "Functional desensitization of the extracellular calcium-sensing receptor is regulated via

distinct mechanisms: role of G protein-coupled receptor kinases, protein kinase C and β -arrestins". *Endocrinol*, 148 (5): 2398-2404, 2007.

¹⁵⁴ Reyes-Ibarra AP, Garcia-Regalado A, Ramirez-rangel I, Esparza-Silva AL, Valadez-Sanchez M, Vazquez-Prado J, Reyes-Cruz G. "Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via Rab 11^o-dependent and AMSH-sensitive mechanism". *Mol Endocrinol*, 21 (6): 1394-1407, 2007.

¹⁵⁵ Stossel TP & Hartwig JH 1975 Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg-2C-adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *Journal of Biological Chemistry* 250 5706–5712.

¹⁵⁶ Ruskamo S, Gilbert R, Hofmann G, Jiang P, Campbell ID, Ylanne J & Pentikainen U 2012 The C-terminal rod 2 fragment of filamin A forms a compact structure that can be extended. *Biochemical Journal* 446 261–269. (doi:10.1042/BJ20120361)

¹⁵⁷ Ruskamo S & Ylanne J 2009 Structure of the human filamin A actin-binding domain. *Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography* 65 1217–1221. (doi:10.1107/S09074444909037330)

¹⁵⁸ Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE & Robson CN 2000 Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular Endocrinology* 14 1618–1626. (doi:10.1210/me.14.10.1618)

¹⁵⁹ Loy CJ, Sim KS & Yong EL 2003 Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *PNAS* 100 4562–4567. (doi:10.1073/pnas.0736237100)

¹⁶⁰ Wang Y, Kreisberg JI, Bedolla RG, Mikhailova M, deVere White RW & Ghosh PM 2007 A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells. *Oncogene* 26 6061–6070. (doi:10.1038/sj.onc.1210435)

¹⁶¹ Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, Prihoda TJ, Siddiqui J, Chinnaiyan AM, Mehra R et al. 2009 Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clinical Cancer Research* 15 788–796. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1402)

¹⁶² Yue J, Huhn S & Shen Z 2013 Complex roles of filamin-A mediated cytoskeleton network in cancer progression. *Cell & Bioscience* 3 7 (doi:10.1186/2045-3701-3-7)

¹⁶³ Nakamura F, Stossel TP & Hartwig JH 2011 The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration* 5 160–169. (doi:10.4161/cam.5.2.14401)

¹⁶⁴ Uramoto H, Akyurek LM & Hanagiri T 2010 A positive relationship between filamin and VEGF in patients with lung cancer. *Anticancer Research* 30 3939–3944.

¹⁶⁵ Alper O, Stetler-Stevenson WG, Harris LN, Leitner WW, Ozdemirli M, Hartmann D, Raffeld M, Abu-Asab M, Byers S, Zhuang Z et al. 2009 Novel anti-filamin-A antibody detects a secreted variant of filamin-A in plasma from patients with breast carcinoma and high-grade astrocytoma. *Cancer Science* 100 1748–1756. (doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01244.x)

¹⁶⁶ Tian H-M, Liu X-H, Han W, Zhao L-L, Yuan B & Yuan C-J 2013 Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer. *Oncology Letters* 6 681–686. (doi:10.3892/ol.2013.1454).

¹⁶⁷ Hosaka M, Murase N, Orito T & Mori M 1985 Immunohistochemical evaluation of factor VIII related antigen, filament proteins and lectin binding in haemangiomas. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 407 237–247. (doi:10.1007/BF00710649)

¹⁶⁸ Porter RM, Holme TC, Newman EL, Hopwood D, Wilkinson JM & Cuschieri A 1993 Monoclonal antibodies to cytoskeletal proteins: an immunohistochemical investigation of human colon cancer. *Journal of Pathology* 170 435–440. (doi:10.1002/path.1711700406)

¹⁶⁹ Larriba MJ, Martin-Villar E, Garcia JM, Pereira F, Pena C, de Herreros AG, Bonilla F & Munoz A 2009 Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis* 30 1459–1468. (doi:10.1093/carcin/bgp140)

¹⁷⁰ Flanagan LA, Chou J, Falet H, Neujahr R, Hartwig JH & Stossel TP 2001 Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *Journal of Cell Biology* 155 511–517. (doi:10.1083/jcb.200105148)

¹⁷¹ Bachmann AS, Howard JP & Vogel CW 2006 Actin-binding protein filamin A is displayed on the surface of human neuroblastoma cells. *Cancer Science* 97 1359–1365. (doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00327.x)

¹⁷² Kamochi N, Nakashima M, Aoki S, Uchihashi K, Sugihara H, Toda S & Kudo S 2008 Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of

squamous cell carcinoma under cancer–stromal cell interaction. *Cancer Science* 99 2417–2427. (doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00978.x).

¹⁷³ Guedj N, Zhan Q, Perigny M, Rautou PE, Degos F, Belghiti J, Farges O, Bedossa P & Paradis V 2009 Comparative protein expression profiles of hilar and peripheral hepatic cholangiocarcinomas. *Journal of Hepatology* 51 93–101. (doi:10.1016/j.jhep.2009.03.017)

¹⁷⁴ Xu Y, Bismar TA, Su J, Xu B, Kristiansen G, Varga Z, Teng L, Ingber DE, Mammoto A, Kumar R et al. 2010 Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *Journal of Experimental Medicine* 207 2421–2437. (doi:10.1084/jem.20100433)

¹⁷⁵ Zhong Z, Yeow WS, Zou C, Wassell R, Wang C, Pestell RG, Quong JN & Quong AA 2010 Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Research* 70 2105–2114. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1108)

¹⁷⁶ Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE & Robson CN 2000 Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular Endocrinology* 14 1618–1626. (doi:10.1210/me.14.10.1618)

¹⁷⁷ Zi-Qiang Tian, Jian-Wei Shi, Xiao-Ran Wang, Zhong Li, Gui-Ying Wang. New cancer suppressor gene for colorectal adenocarcinoma: Filamin A. *World J Gastroenterol* 2015 February 21; 21(7): 2199-2205.

¹⁷⁸ Zang M and Breitwieser GE 2005. High affinity interaction with Filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *Journal of Biological Chemistry* 280 11140-11146.

¹⁷⁹ Terranegra A, Ferraretto A, Dogliotti E, Scarpellini M, Corbetta S, Barbieri AM, Spada A, Arcidiacono T, Rainone F, Aloia A, Cusi D, Vezzoli G and Soldati L 2010. Calcimimetic R-568 effects on activity of R990G polymorphism of calcium-sensing receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 45, 245–256.

¹⁸⁰ S Corbetta, V Vaira, V Guarnieri, A Scillitani, C Eller-Vainicher, S Ferrero, L Vicentini, I Chiodini, M Bisceglia, P Beck-Peccoz, S Bosari and A Spada. Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Feb 18;17(1):135-46.

¹⁸¹ Smith LJ, Bolin KA, Schwalbe H, MacArthur MW, Thornton JM, Dobson CM. "Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations". *J Mol Biol*, 255: 494-506, 1996.

¹⁸² F.J. Mendoza, I. Lopez, R. Canalejo, Y. Almaden, D. Martin, E. Aguilera-Tejero, M. Rodriguez, Direct upregulation of parathyroid calcium-sensing receptor and vitamin D receptor by calcimimetics in uremic rats, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296 (2009) F605–F613.

8. PRODOTTI SCIENTIFICI

8.1 PUBBLICAZIONI

1. Vezzoli G, Dogliotti E, Terranegra A, Arcidiacono T, Macrina L, Tavecchia M, Pivari F, Mingione A, **Brasacchio C**, Nouvenne A, Meschi T, Cusi D, Spotti D, Montanari E, Soldati L. Dietary style and acid load in an Italian population of calcium kidney stone formers. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (2015), doi: 10.1016/j.numecd.2015.03.005.
2. Vezzoli G, Scillitani A, Corbetta S, Terranegra A, Dogliotti E, Guarnieri V, Arcidiacono T, Macrina L, Mingione A, **Brasacchio C**, Eller-Vainicher C, Cusi D, Spada A, Cole DE, GN, Spotti D, Soldati L. Risk of nephrolithiasis in primary hyperparathyroidism is associated with two polymorphisms of the calcium-sensing receptor gene. *J Nephrol*. 2014
3. Soldati L, Bertoli S, Terranegra A, **Brasacchio C**, Mingione A, Dogliotti E, Raspini B, Leone A, Frau F, Vignati L, Spadafranca A, Vezzoli G, Cusi D, Battezzati A. Relevance of Mediterranean diet and glucose metabolism for nephrolithiasis in obese subjects. *J Transl Med*. 2014 Feb 6;12:34
4. Vezzoli G, Terranegra A, Aloia A, Arcidiacono T, Milanese L, Mosca E, Mingione A, Spotti D, Cusi D, Hou J, Hendy GN, Soldati L; GENIAL network (Genetics and Environment in Nephrolithiasis Italian Alliance), Paloschi V, Dogliotti E, **Brasacchio C**, Dell'Antonio G, Montorsi F, Bertini R, Bellinzoni P, Guazzoni G, Borghi L, Guerra A, Allegri F, Ticinesi A, Meschi T, Nouvenne A, Lupo A, Fabris A, Gambaro G, Strazzullo P, Rendina D, De Filippo G, Brandi ML, Croppi E, Cianferotti L, Trinchieri A, Caudarella R, Cupisti A, Anglani F, Del Prete D. Decreased transcriptional activity of calcium-sensing receptor gene promoter 1 is associated with calcium nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Sep;98(9):3839-47
5. Dogliotti E, Vezzoli G, Nouvenne A, Meschi T, Terranegra A, Mingione A, **Brasacchio C**, Raspini B, Cusi D, Soldati L. Nutrition in calcium nephrolithiasis. *J Transl Med*. 2013 May 1;11:109.

8.2 CONGRESSI NAZIONALI E INTERNAZIONALI

1. INDC 2015: 15TH INTERNATIONAL NUTRITION and DIAGNOSTICS CONFERENCE. October 5-8, 2015.

Titolo Presentazione Orale: "Athena Study: Antioxidants And Cardiovascular Risk".

Vincitrice del premio: "The Best Young Scientist".

2. NuGOweek 2015. Barcellona (Spagna). **Titolo Poster:"High Intake of Diet Antioxidants Reduces Cardiovascular Risk".** Authors: A.Terranegra, C.Brasacchio, C. Conti, L. Soldati, E. Dogliotti, M. Lazzaroni, A.Mingione, F.Pivari, M. Cozzolino, D. Cusi

3. NUGOweek 2015, Barcellona (Spagna) **Titolo Poster: "Calcium and phosphate intake may influence bone remodeling in hemodialysis patients".** Authors: Terranegra A, **Brasacchio C**, Mingione A, Pivari F, Arcidiacono T, Macrina L, Cozzolino M, Vezzoli G, Soldati L.

4. **CROI 2015:** INTERNATIONAL CONFERENCE ON HIV TREATMENT. Seattle 2015. **Titolo Poster: "Bone Metabolism and Tenofovir: Evidence of Direct Effect on Calcium-Sensing Receptor".** Authors: Paolo Bonfanti, **Caterina Brasacchio**, Barbara Menzaghi, Chiara Molteni, Laura Soldati, Tiziana Quirino, Stefano Mora.

5. **EXPO 2015:** IMPORTANZA DELLA DIETA MEDITERRANEA. 28 SETTEMBRE 2015. **Titolo presentazione orale: "Studio Europeo Athena: Antiossidanti E Rischio Cardiovascolare".**

6. **Nutrimi 2014.** Milano (Italia). **Titolo Poster: "Nephrolithiasis, Obesity andMediterranean Diet".** Authors: **C.Brasacchio**, L. Soldati, S. Bertoli, A. Terranegra, A. Mingione, E. Dogliotti, F. Frau,A. Leone, L. Vignati, G. Vezzoli, D. Cusi, A. Battezzati.

9. RINGRAZIAMENTI

Vorrei, anzitutto, ringraziare la prof.ssa Laura Soldati per avermi dato la possibilità di svolgere il mio dottorato di ricerca in questo laboratorio. Sono stati 3 anni di crescita per me, sia come ricercatrice che come persona. Sono stati anni di lavoro intenso, di cambiamenti all'ultimo minuto, di imprevisti, di sorprese, di scoperte. E tutto quello che ho imparato e vissuto in questi anni lo custodirò come dono prezioso per il mio futuro.

Ringrazio la mia prima tutor di laboratorio, Annalisa, che mi ha insegnato a lavorare al meglio senza arrendermi di fronte alle difficoltà incontrate durante questi anni e che mi ha trasmesso la consapevolezza e l'entusiasmo che in ricerca non si smette mai di imparare .

Ringrazio di cuore Alessandra, collega ed amica, senza la quale non avrei potuto finire al meglio questa tesi! Grazie per il sostegno morale, fisico e psicologico!

Ringrazio i miei genitori e i miei fratelli (Manuela e Giuseppe) per avermi sempre ascoltata e sostenuta in questi anni.

Ringrazio le mie due coinquiline, Betta e Carlotta, che soprattutto in questi giorni mi stanno sopportando e supportando!!!vi voglio bene girls!!

E vorrei concludere questa tesi con una frase che mi ha accompagnata in queste ultime settimane e che mi disse qualche tempo fa una persona inaspettatamente a me cara:

“Quando sei seduta alla tua scrivania, davanti al tuo pc e pensi di non riuscire a farcela, tu ricorda sempre: Keep it simple! E tutto andrà per il meglio”.