

L'influenza del fosforo, del calcio e del magnesio sulla proteina Gla di matrice e sul processo di calcificazione vascolare: una review sistematica



E. Houben¹, A. Neradova², L.J. Schurgers³, Marc Vervloet^{2,4}

(1) Department of Internal Medicine, Noordwest Ziekenhuisgroep, Alkmaar, The Netherlands

(2) Department of Nephrology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

(3) Department of Biochemistry, Cardiovascular Research institute Maastricht, University Maastricht, The Netherlands

(4) Institute for Cardiovascular Research VU, ICaR-VU, Amsterdam, The Netherlands

Testo tradotto dalla Dott.ssa Pina Acampora (Scuola di Specializzazione in Nefrologia SUN, Napoli)

Correspondence to: MG Vervloet, MD, PhD Department of Nephrology VU university medical center Amsterdam, The Netherlands; E-mail: M.Vervloet@vumc.nl

Abstract

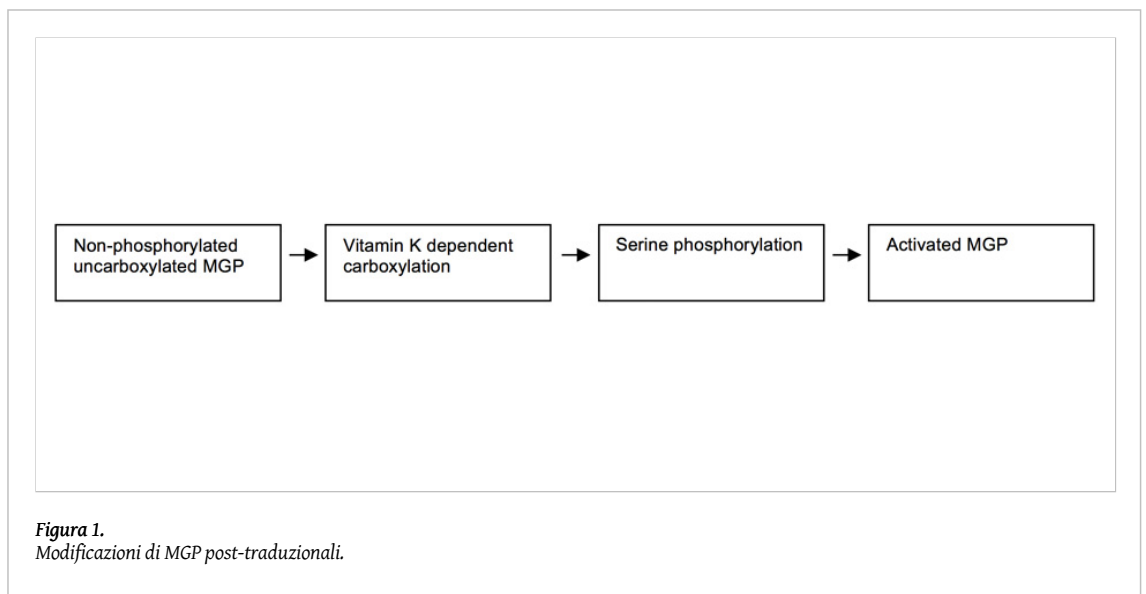
La proteina Gla di Matrice vitamina K-dipendente (MGP: Matrix Gla-Protein) agisce come inibitore chiave nel processo di calcificazione vascolare (VC). MGP viene sintetizzata dai condrociti e dalle cellule muscolari lisce della tonaca media vascolare (VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell) e la sua assenza o inattività comporta un'eccessiva calcificazione sia della cartilagine di accrescimento sia del tessuto vascolare. Oltre alla sua dipendenza dalla vitamina K, poco si sa circa altri fattori che ne influenzano il metabolismo. Fosforo, calcio e magnesio sono coinvolti nella mineralizzazione dell'osso e giocano un ruolo importante nella VC. In questa review forniamo una sintesi degli effetti del fosforo, del calcio e del magnesio sul metabolismo di MGP. Elevati livelli di fosforo e di calcio promuovono la VC, in parte, aumentando il rilascio di vescicole di matrice (MV), che sotto l'influenza di questi elettroliti formano calcificazioni competenti. Fosforo e calcio contemporaneamente inducono una up-regulation di MGP e della sua espressione genica, che forse inibisce il processo di calcificazione. Elevati livelli di fosforo non cambiano i livelli di proteina MGP presente nelle MV. Al contrario, elevate concentrazioni di calcio causano una diminuzione della quota di MGP presente nelle vescicole, che potrebbe in parte spiegare la conseguente calcificazione delle MV. Il magnesio è un noto inibitore della VC. Tuttavia, il magnesio ha dimostrato di avere un effetto inibitorio sulla sintesi di MGP attraverso la down-regulation del recettore sensibile al calcio (CaRS: Calcium Sensing Receptor) determinando così, una riduzione nella up-regulation di MGP indotta dal calcio. Ci potrebbe anche essere un effetto stimolante del magnesio su MGP in cui è coinvolto il canale TRPM7. In conclusione, esiste una chiara interazione tra MGP, fosforo, calcio e magnesio. L'up-regulation di MGP da parte del fosforo e del calcio potrebbe essere una risposta cellulare di protezione al processo di VC.

Parole chiave: calcificazione vascolare, carbossilazione, magnesio, malattia renale cronica, minerali

Introduzione

Gli eventi cardiovascolari rappresentano il 50% di tutte le cause di morte nei pazienti con malattia renale allo stadio terminale [1] ([full text](#)). Questo aumento del rischio cardiovas-

scolare è in parte causato da un processo noto come calcificazione vascolare (VC). VC è caratterizzata da un aumento dei depositi di sale di calcio nelle arterie che portano a rigidità di parete [1] (full text) [2] (full text) ed è un processo complesso che è simile alla formazione ossea e coinvolge il differenziamento delle cellule muscolari lisce della tonaca media vascolare (VSMC) in cellule simil-osteoblasti [3] (full text) [4] (full text). La differenziazione di VSMC risulta da uno squilibrio tra fattori pro-osteogenici e quelli inibitori dell'osteogenesi [5] (full text). Inoltre, la precipitazione di calcio e fosforo in forma di cristalli di idrossiapatite è una componente importante del processo di VC. La precipitazione di idrossiapatite è inizialmente mediata da piccole vescicole membranose che formano un *nidus* per la calcificazione e contengono minerali e sostanze che alimentano sempre più questo processo. Tali vescicole sono denominate vescicole di matrice (MV) e sono rilasciate dalla membrana cellulare delle cellule presenti nella parete del vaso [6]. La proteina Gla di Matrice (MGP) contenente acido γ -carbossigluttammico (Gla) è una proteina secreta dai condrociti e dalle VSMC ed è un inibitore chiave della VC [7] [8] [9] (full text). Topi knock-out per MGP sviluppano calcificazioni estese nelle arterie e nelle cartilagini e muoiono entro sei-otto settimane dopo la nascita a causa della rottura dei vasi sanguigni [7]. Negli esseri umani, mutazioni nel gene che codifica MGP determina la sindrome di Keutel, una malattia rara caratterizzata da calcificazioni anomali dei tessuti molli [10] [11]. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi attraverso i quali MGP inibisce il processo di calcificazione. In primo luogo, è stato suggerito che MGP leghi i cristalli di idrossiapatite mascherando così i siti di nucleazione per la crescita minerale. Pertanto, MGP potrebbe agire come un competitore nella precipitazione di idrossiapatite nella VC [12] (full text) [13] (full text). In secondo luogo, MGP può legare e inattivare la proteina morfogenetica dell'osso-2 (BMP-2: *Bone Morphogenetic Protein-2*). BMP-2 è un fattore di crescita osteogenico, trovato in forma attiva sulle VSMC [14]. Oltre a ciò, topi knock-out per MGP mostrano una up-regulation dell'espressione del fattore di trascrizione osseo-specifico *cbf1a/Runx2* e della proteina osteogenica Osteopontina. L'up-regulation di questi geni è associata alla differenziazione di VSMC in cellule simil-osteoblastiche [15] (full text). Prima che MGP possa esercitare i suoi effetti inibitori sul processo di calcificazione, deve subire due modifiche post-traduzionali: una γ -glutammato-carbossilazione ed una serina-fosforilazione (illustrati nella Figura 1). MGP carbossilata e fosforilata è considerata la forma attiva di MGP [16] (full text) [17] (full text). Il rapporto tra MGP attiva rispetto alla forma inattiva nel plasma è sconosciuto. I numerosi tentativi di misurazione effettuati fino ad ora tramite il metodo ELISA non sono riusciti a distinguere in modo specifico tutte le diverse forme di MGP.



La carbosilazione di MGP è interamente dipendente dalla presenza del suo cofattore, la vitamina K [17] (full text). Poco si sa circa i fattori coinvolti nella fosforilazione di MGP. Fosforo, calcio e magnesio sono i principali componenti della cartilagine e dell'osso [18]. Inoltre, questi ioni svolgono un ruolo importante nella patogenesi della VC. Come risultato, molti studi si sono focalizzati sul ruolo del fosforo, del calcio e del magnesio nella VC [19] [20] (full text) [21] (full text) [22] [23]. Tuttavia, solo un numero limitato di studi descrivono l'interazione diretta di questi ioni con MGP, tuttavia i dati sono contrastanti. Questo articolo si propone di fornire una visione generale sulla complessa interazione tra MGP, fosforo, calcio e magnesio.

Metodi

Sono stati identificati dai database bibliografici di PubMed studi scientifici presenti tra il 1° dicembre 2014 fino al 1° gennaio 2015 utilizzando i seguenti termini di ricerca: "fosforo E proteina di matrice Gla", "calcio E proteina di matrice Gla", "magnesio E proteina di matrice Gla", e "interazione" E "stimolazione". Abbiamo trovato un numero totale di 556 articoli. Sono stati inclusi tutti gli studi, sia in vitro che in vivo, focalizzati sull'interazione diretta del fosforo e/o del calcio e/o del magnesio con MGP. Sulla base di questi criteri, 11 studi, tutti studi in vitro, sono stati giudicati idonei.

Fosforo

Nell'Insufficienza renale cronica (CKD: Chronic Kidney Disease) l'iperfosforemia è una complicanza comune. Ci sono prove convincenti che quantità elevate di fosforo correlano con VC e si traducono in un maggiore tasso di mortalità cardiovascolare nei pazienti con CKD [24] (full text) [27] (full text). I meccanismi attraverso i quali il fosforo stimola il processo di VC sono, tuttavia, non pienamente conosciuti. È noto che la presenza di elevati livelli di fosforo possa accelerare la precipitazione di calcio e fosforo in forma di cristalli di idrossiapatite [26] (full text). Nelle VSMC murine, quantità elevate di fosforo stimolano l'espressione di Osterix, un fattore di trascrizione osteoblastica. Osterix è un fattore essenziale di induzione di calcificazione nelle MV [20] (full text) [28] (full text). In condizioni fisiologiche le MV non calcificano poiché contengono inibitori della calcificazione come MGP e Fetuina-A [26] (full text). Tuttavia, livelli elevati di fosforo determinano un aumento del rilascio di MV che potrebbe dare inizio al processo di calcificazione e formare il nidus per la precipitazione di idrossiapatite [26] (full text). Quattro studi hanno evidenziato che alti livelli di fosforo aumentano i livelli di MGP (Tabella 1) [5] (full text) 30-32). Uno studio non ha riscontrato alcun effetto del fosforo sui livelli di MGP [32] (full text). L'effetto del fosforo su MGP è stato prima studiato in un modello in vitro utilizzando la linea cellulare ATDC5. Le cellule ATDC5 sono state prelevate da un teratocarcinoma, differenziatosi in condrociti [33]. Un livello di fosforo elevato ha indotto un aumento statisticamente significativo di 6 volte nell'espressione di mRNA di MGP rispetto al controllo [29]. Ci sono tuttavia due limiti importanti in questi studi. In primo luogo, la concentrazione di fosforo è troppo elevata, a livelli non fisiologici, e in secondo luogo nessun dato viene presentato sulla modifica post-traduzionale di MGP, che determina la sua attività. L'iperfosforemia induce l'up-regulation del pathway ERK1/2-Fra-1, che è stato dimostrato essere essenziale per l'up-regulation di MGP [30] (full text). Il pathway ERK1/2-Fra-1 è costituito dalla cascata di ERK1/2, un membro della famiglia enzimatica Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) che comunica segnali extracellulari al nucleo, con conseguente trascrizione di proteine [34]. Il blocco del segnale di trasduzione di ERK1/2 tramite U0126, un inibitore ampiamente utilizzato di MEK1/2 (chinasi a monte di ERK1/2), sopprime l'induzione fosforo-indotta di

MGP, sia a livello di trascrizione di mRNA che di produzione proteica [30] (full text). Inoltre, l'espressione di Fra-1 è stimolata dal fosforo [30] (full text). Fra-1 è un regolatore chiave di espressione di MGP, dal momento che la sovraespressione di Fra-1 aumenta l'espressione di MGP negli osteoblasti primari [35] (full text). Il blocco di attivazione di ERK1/2 sopprime l'effetto stimolante del fosforo su Fra-1. Inoltre, l'attività ERK1/2 impedisce anche la degradazione di Fra-1. Questi dati suggeriscono fortemente che il fosforo stimola MGP attivando Fra-1 attraverso il pathway ERK1/2 [30] (full text). Inoltre, Pit-1 è un trasportatore attivo del fosforo nelle VSMC [36] (full text) e può anche svolgere un ruolo nel pathway ERK1/2. Il segnale indotto dall'iperfosforemia tramite la fosforilazione di ERK1/2 viene soppresso in soggetti con VSMC deficitarie di Pit-1 [37]. Uno studio recente ha studiato le MV isolate da VSMC trattate con elevati livelli di fosforo. La quantità di MGP nelle MV è rimasta invariata rispetto a MV provenienti da VSMC che non sono state trattate con alti livelli di fosforo [32] (full text). Questo non è concorde con i risultati che, invece, indicano il fosforo come un up-regolatore della quantità di MGP totale presente nelle VSMC. Inoltre, è stato suggerito che il fosforo riduca l'affinità di MGP per l'idrossiapatite [38]. In sintesi, il fosforo stimola la trascrizione totale di MGP e la sua traduzione proteica attraverso il pathway ERK1/2-Fra-1. Tuttavia la quantità di MGP nelle MV non è influenzata da elevati livelli di fosforo. Inoltre il fosforo può limitare l'affinità di MGP per i cristalli di idrossiapatite. Questo suggerisce che, nonostante gli effetti complessivi del fosforo sulla VC, questo elettrolita porta ad abbassare i livelli di MGP e la sua trascrizione, possibilmente con conseguente limitazione del processo di VC.

Calcio

Il calcio è uno ione abbondante che gioca un ruolo importante nella patogenesi della VC. Sia in vivo che in vitro è stata dimostrata una correlazione tra il processo di calcificazione e i livelli di calcio. Questo effetto è sia indipendente che sinergico al fosforo a livelli elevati [31] [39]. Vari meccanismi sono responsabili degli effetti calcificanti da parte degli ioni calcio, tra cui un aumento della produzione di mineralizzazione delle MV [26] (full text). In presenza di alti livelli sia di fosforo sia di calcio, gli effetti calcificanti sono fortemente potenziati [21] (full text) [26] (full text). Tuttavia, nonostante gli effetti calcificanti del calcio, un livello di calcio elevato può anche indurre un aumento sia a livello trascrizionale sia proteico di MGP. Questi effetti sono descritti in quattro studi riassunti in Tabella 1. In tre studi è stato dimostrato che il calcio aumenta il livello di MGP [31] [40] [41], mentre uno studio ha rilevato una diminuzione di MGP [32] (full text). In un altro studio, è stato mostrato che sia il calcio sia il fosforo sono necessari per indurre un aumento di MGP in una linea cellulare MC3T3 - E1. Rispetto agli studi che descrivono gli effetti del fosforo sul metabolismo di MGP, le concentrazioni di calcio appaiono non fisiologicamente alte. Tuttavia, i livelli di calcio nel tessuto in esame superano le normali concentrazioni plasmatiche, forse a causa del processo di apoptosi locale e, pertanto, i dati di questi studi *in vitro* potrebbero essere falsati e non ancora applicabili in situazioni cliniche [21] (full text). L'interazione tra gli ioni di calcio e fosforo è probabilmente basata sulla formazione di precipitati che stimolano la fosforilazione ERK1/2 [31]. Come precedentemente menzionato, ERK1/2 fosforilata determina un aumento sia a livello di mRNA che proteico di MGP. In VSMC aortiche umane la fosforilazione di ERK1/2 può essere mediata attraverso il CaSR [42] (full text). Il calcio in VSMC di ratto stimola l'up-regulation di MGP attraverso un pathway che potrebbe coinvolgere un recettore, funzionalmente legato al CaSR. I CaSR-agonisti inducono una stimolazione significativa della trascrizione di MGP nelle VSMC aortiche di ratto. Tuttavia, quando è stata effettuata una rtPCR su mRNA totale di ratto con un noto CaSR come primer, il CaSR non è stato trovato in questa linea cellulare. Questo suggerisce la presenza di un

altro recettore che è funzionalmente correlato, ma dal punto di vista molecolare distinto dal CaSR [41]. Tuttavia, studi più recenti che utilizzano un calcimimetico più selettivo suggeriscono che il CaSR è coinvolto [43]. Il calcio non solo aumenta la quantità di MGP, ma può anche influenzare la sua efficacia nel prevenire VC. In presenza di quote elevate di calcio, MGP mostra una maggiore affinità per l'idrossiapatite. Questo suggerisce che il calcio induce un cambiamento conformazionale di MGP che promuove il legame MGP-idrossiapatite [38]. In contrasto con questi dati, uno studio ha valutato MGP presente nelle MV rilasciate da VSMC. In condizioni patologiche MV possono promuovere la calcificazione. Si è riscontrato che quando VSMC aortiche umane sono trattate con il calcio, la quantità di MGP nelle MV inizialmente aumenta, ma dopo 48 ore di trattamento MGP diminuisce [32] (full text). In sintesi, la maggior parte di questi dati sostiene l'ipotesi che MGP è up-regolata in risposta a livelli di calcio elevati. Questo potrebbe implicare un meccanismo di feedback negativo nella regolazione di VC da parte di elevati livelli di calcio attraverso l'up-regulation di MGP. Tuttavia, in risposta ad elevati livelli di calcio, la quantità di MGP nelle MV si riduce. L'impatto globale degli effetti calcio-mediati del metabolismo di MGP sulla calcificazione non è completamente chiarito e sono necessarie ulteriori ricerche.

Tabella 1.

Article	Cell line	Used ion concentrations	Duration	MGP detection	Result
Julien, 2007 (ref.n. 29)	ATDC5 cell line (chondrocytes)	Pi unknown control concentration, 10.0 mM Ca ²⁺ unknown Mg ²⁺ unknown	24 hours	PCR	High phosphate increased MGP gene expression
Julien, 2009 (ref.n. 30)	MC3T3-E1 cell line (osteoblast precursor cells) and primary osteoblasts mice	Pi 1.0, 9.0 mM Ca ²⁺ unknown Mg ²⁺ unknown	24 hours	PCR and western blotting	High phosphate increased MGP gene expression
Louvet L, 2013 (ref. n. 5)	Human aorta VSMC	Pi 0.9, 3.0 mM Ca ²⁺ 1.8 mM Mg ²⁺ 0.8, 1.5, 2.0 mM	21 days	ELISA on cell medium	High phosphate increased MGP protein High magnesium decreased MGP protein
Khoshniat, 2011 (ref. n. 31)	MC3T3-E1 cell line (osteoblast precursor cells)	Pi 1.0, 10.0 mM Ca ²⁺ 0, 1.8 mM Mg ²⁺ unknown	24 hours	PCR	High phosphate increased MGP gene expression High calcium increased MGP gene expression
Kapustin, 2011 (ref. n. 32)	Human aorta VSMC	Pi 2.5 mM Ca ²⁺ 5.4, 2.7 mM Mg ²⁺ unknown	5 days	Mass spectrometry on MGP in MV	High phosphate did not change MGP protein High calcium decreased MGP protein
Farzaneh-Far, 2000 (ref. n. 41)	Rat aorta VSMC	Pi unknown Ca ²⁺ 1.8, 6.0 mM Mg ²⁺ unknown	48 hours	PCR	High calcium increased MGP gene expression
Nakatani, 2006 (ref. n. 40)	ATDC5 cell line (chondrocytes)	Pi unknown Ca ²⁺ 1.0, 6.0 mM Mg ²⁺ 0.7, 4.2 mM	28 days	PCR and immunohistochemistry	High phosphate increased MGP protein and gene expression High magnesium decreased MGP protein and gene expression
Montezano, 2010 (ref. n. 46)	VSMC WKY rats and inbred mice	Pi unknown Ca ²⁺ unknown Mg ²⁺ 2.0, 2.5, 3.0 mM	10 days	PCR	High magnesium increased MGP gene expression
Kircelli F, 2012 (ref. n. 48)	Bovine VSMC	Pi 0.9 mM Ca ²⁺ 1.8 mM Mg ²⁺ 1.0, 2.0, 3.0 mM	14 days	ELISA on cell medium	High Magnesium increased MGP protein
Montes de OA, 2014 (ref. n. 45)	Human aorta VSMC	Pi 0.9, 3.3 mM Ca ²⁺ 1.8 mM Mg ²⁺ 0.8, 1.4, 2.6 mM	9 days	PCR	High Magnesium increased MGP gene expression

Magnesio

Il magnesio è ampiamente conosciuto come un inibitore di VC sia *in vitro* che *in vivo* [5] (full text) [44]. Il magnesio non solo previene, ma può anche diminuire la quota di VC già esistente [45] (full text). Alcuni studi *in vitro* hanno trovato che la sua funzione di inibizione viene esercitata in presenza di fosforo o calcio [5] (full text) [40] [45] (full text) [46] (full text). I meccanismi con cui il magnesio impedisce la VC non sono pienamente stabiliti. Tra gli altri effetti, il magnesio impedisce direttamente la cristallizzazione di apatite *in vitro* [47]. Inoltre, esso inibisce la via di segnalazione Wnt/ β -catenina, un pathway coinvolto nella VC [45] (full text). Oltre a ciò, insieme ad altri ioni, il magnesio influisce direttamente sull'espressione di MGP, come discusso di seguito. L'interazione tra magnesio e MGP è stata studiata in cinque studi, riassunti nella Tabella 1. In due di essi il magnesio riduce il livello di MGP [5] (full text) [40]. In tre studi, invece, il magnesio aumenta il livello di MGP [45] (full text) [46] (full text) [48] (full text). In un recente studio, che ha esaminato VSMC aortiche umane con calcificazioni fosforo-indotte, più alta è la concentrazione di magnesio più diminuisce il livello di MGP. Il magnesio non ha effetti sui livelli di MGP in assenza di fosforo [5] (full text). Un altro studio ha esaminato una linea cellulare ATDC5 trattata con calcio e magnesio. In presenza di magnesio, i livelli elevati di MGP calcio-indotti sono ridotti. Questo studio ha messo in evidenza che il calcio aumenta MGP attraverso il CaSR e che il magnesio down-regola l'espressione del CaSR e quindi provoca una diminuzione del MGP calcio-indotta [40]. Infine, è stato osservato che il magnesio riduce l'affinità di MGP per l'idrossiapatite, competendo con MGP per i siti di legame. Questa competizione nel sito di legame potrebbe essere spiegata sia dal legame magnesio-idrossiapatite sia dal legame magnesio-MGP. Il magnesio potrebbe anche influenzare la conformazione di MGP [38]. Tuttavia, altri studi recenti mostrano che il magnesio aumenta il livello di MGP. Nelle VSMC calcificate, MGP risulta aumentato tramite il magnesio sia in assenza sia in presenza di altri ioni. Questi studi sono stati eseguiti utilizzando VSMC umane, bovine o murine [45] (full text) [46] (full text) [48] (full text). Le VSMC bovine incubate con β -glicerofosfato, un promotore di calcificazione, hanno mostrato una diminuzione del 86% della secrezione di MGP. Quando è stato aggiunto il magnesio, prima si sono normalizzati i livelli di MGP e, dopo l'aggiunta di un massimo di 3mM di magnesio, MGP è addirittura aumentata del 68 % al di sopra dei valori normali [48] (full text). È stato accertato che quando un canale del magnesio, TRPM7, responsabile dell'ingresso di magnesio nella cellula, è bloccato, l'aumento indotto di MGP viene invertito [46] (full text). In sintesi, se il magnesio up-regola o down-regola MGP rimane controverso. Sembra che ci siano due vie di interazione tra magnesio e MGP: un effetto inibitorio eventualmente tramite la down-regulation dell'espressione di CaSR e un effetto stimolante in cui è coinvolta l'entrata cellulare di magnesio attraverso il canale TRPM7. L'effetto netto del magnesio su VC è di tipo inibitorio, ma se questo si verifica nonostante o per l'interazione con MGP, deve essere ancora chiarito. Una panoramica delle interazioni tra fosforo, calcio e magnesio sia su VC che su MGP è messo in evidenza nella Figura 2.

Discussione

Mentre il fosforo e il calcio sono entrambi potenziali induttori di VC, il magnesio è generalmente considerato protettivo contro VC. In presenza di fosfato di calcio si osserva una up-regulation di MGP. Tuttavia, in presenza di concentrazione elevate di calcio nelle MV si determina una diminuzione di MGP, mentre un livello di fosforo elevato non ha alcun effetto su MGP. L'effetto del magnesio su MGP resta controverso. I dati sull'interazione tra MGP e calcio e/o fosforo sono coerenti e indicano, nella maggior parte dei casi, un aumento della produzione di MGP sotto l'influenza di questi minerali, ad eccezione di uno studio con-

dotto da Kapustin et al in cui è stato valutato il ruolo di MGP nella mineralizzazione nelle MV [32] (full text). Gli autori hanno trovato che MGP è significativamente ridotta nelle MV rilasciate dalle VSMC quando trattate con il calcio mentre è invariata dopo il trattamento con il fosforo. Questi risultati contraddittori potrebbero eventualmente essere spiegati con il fatto che Kapustin e colleghi si sono focalizzati su MGP presente nelle MV, invece che su MGP totale che comprende anche la quota intracellulare. È stato dimostrato che MGP presente nelle MV rappresenta la forma fosforilata [49] (full text). MGP è una proteina altamente insolubile che viene trasportata nell'ambiente intracellulare tramite strutture vescicolari che sono probabilmente precursori di MV. Tale frazione contiene la forma acida di MGP, che è stata identificata come forma fosforilata di MGP, non riscontrabile nella frazione citosolica di VSMC [49] (full text). Nonostante lo stato di carbosilazione di MGP microsomiale sia sconosciuto, questo potrebbe suggerire che Kapustin e colleghi hanno misurato la forma attiva di MGP, dal momento che il loro studio si è focalizzato su MGP presente nelle MV, rispetto agli altri studi presi in esame. Anche se tale ipotesi dovrà essere confermata, questo potrebbe indicare che il calcio e il fosforo aumentano il livello di MGP in forma inattiva, ma riducono la forma fisiologicamente attiva di MGP, presente nelle MV. Inoltre, studi clinici hanno mostrato che la quota di MGP circolante non-carbosilata e defosforilata aumenta progressivamente in pazienti con CKD e alti livelli di questi metaboliti inattivi sono stati associati al grado di severità della calcificazione [9] (full text). Pertanto, un aumento di MGP in presenza di fattori pro-calcificanti non indica necessariamente un aumento di MGP in forma attivata e non garantisce un meccanismo di protezione efficace. Il magnesio ha un effetto protettivo sulle VC, ma i dati sull'interazione tra magnesio e MGP sono contraddittori. Tutti gli articoli inclusi in questa review riguardanti magnesio e MGP, sono fo-

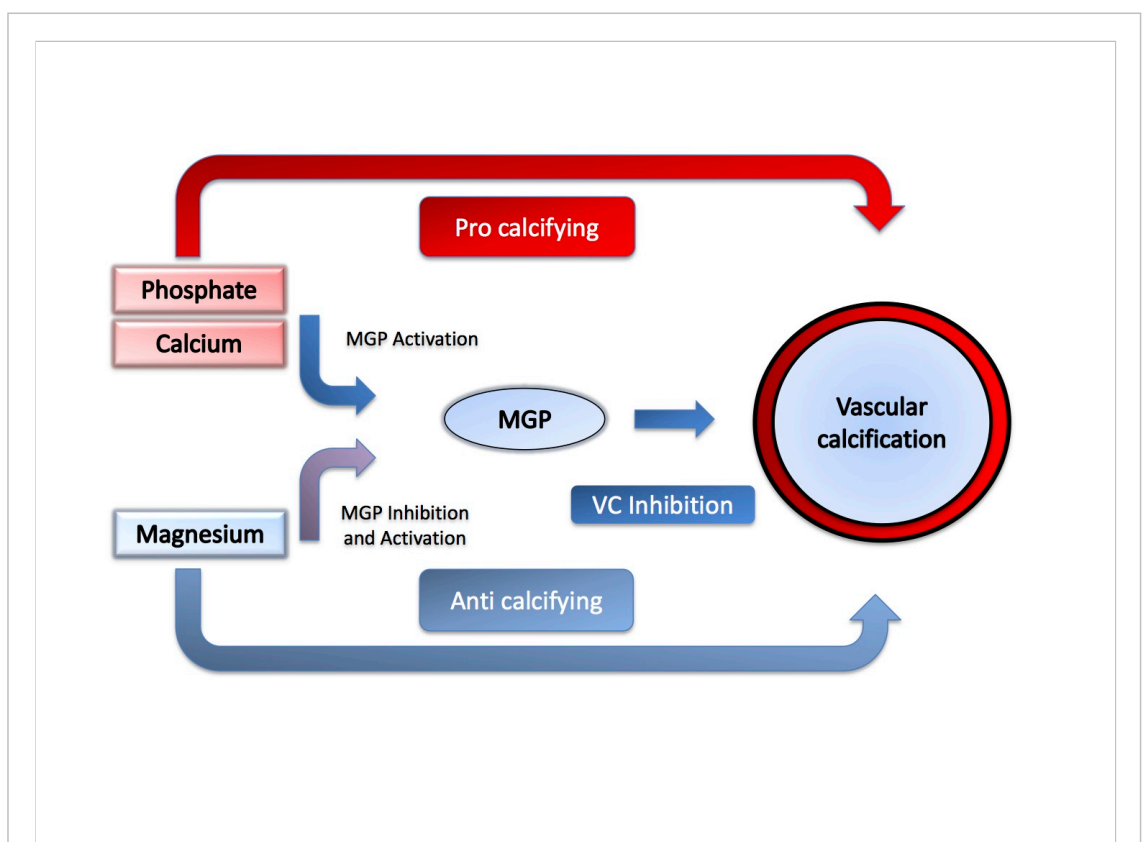


Figura 2.

Interazioni tra fosforo, calcio e magnesio sia sulla calcificazione vascolare che su MGP. Il fosforo elevato aumenta l'espressione sia genica che proteica di MGP. Il calcio elevato aumenta l'espressione della proteina MGP e del suo gene, e diminuisce MGP nelle MV (non mostrato in figura). Non è chiaro se il magnesio elevato aumenta o diminuisce l'espressione del gene MGP e della proteina MGP.

calizzati sulla quota totale della proteina MGP o sulla sua trascrizione. Non è stata trovata alcuna differenza nella metodologia utilizzata, come ad esempio i livelli di ioni utilizzati, le linee cellulari o le strategie di rilevamento di MGP che potrebbero spiegare le differenze nei risultati. Non abbiamo trovato studi con un focus specifico sulla quota di MGP presente nelle MV. Il recettore CaSR, è stato suggerito come pathway coinvolto nell'inibizione di MGP mediata dal magnesio. Infatti la presenza di CaSR è stata rilevata nelle cellule ATDC5 e la sua espressione è stata inibita dal magnesio, limitando l'up-regulation di MGP [40]. Tuttavia, in altri studi che utilizzano VSMC di aorta di ratto o la linea cellulare MC3T3 - E1, il CaSR non è stato rilevato [31] [41]. Nelle VSMC di aorta umana, invece, la proteina CaSR era rilevabile [42] (full text). Tuttavia, se il magnesio induce l'inibizione di MGP attraverso la soppressione di CaSR rimane discutibile e dovrà essere chiarito se il CaSR gioca un ruolo nella regolazione di MGP nei pazienti con CKD. La ricerca futura dovrà concentrarsi sull'interazione di MGP con tutti gli ioni insieme e dovrà distinguere tra le diverse forme di MGP; in questo senso potrebbero essere utili anticorpi specifici capaci di rilevare e distinguere le varie forme di MGP, recentemente introdotti in ambito scientifico [22]. Una migliore comprensione dei fattori che influenzano MGP, potrebbe portare a nuovi spunti per future terapie contro la calcificazione patologica. Un esempio è l'effetto dei calciomimetici, gli agonisti di CaSR che sono spesso utilizzati in pazienti con CKD per controllare l'iperparatiroidismo secondario. Un recente studio clinico ha dimostrato che i calciomimetici possono impedire la formazione di VC nei pazienti in ESRD e numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che questo effetto è probabilmente raggiunto tramite l'up-regulation di MGP [43] [50] [51] (full text). Un altro esempio è la possibilità che i chelanti del fosforo possano aumentare, invece di ridurre, il rischio di VC [52] (full text). Questo effetto è ancora da dimostrare ma potrebbe essere dovuto ai presunti effetti dannosi del contenuto di calcio dei chelanti utilizzati [52] (full text). Questa review dovrebbe essere un invito a una ricerca più approfondita sui complessi meccanismi che stanno alla base del processo di calcificazione vascolare, e sull'influenza che i vari ioni e proteine hanno sulle risposte di protezione cellulare. In particolare il ruolo di MGP è tutt'altro che costante, pur essendo una proteina potente nel proteggere le pareti dei vasi. Un'importante limitazione degli articoli esaminati, è che tutti gli studi analizzati utilizzavano strategie che rilevavano sia la quota di MGP trascritto che quella totale. Come precedentemente descritto, MGP può esercitare la sua funzione di inibizione solo dopo aver subito modifiche post-traduzionali [16] (full text) [53] (full text). Di conseguenza, la rilevazione della trascrizione di MGP non riflette necessariamente la quota di MGP in forma attiva, ma una produzione del suo precursore. Gli anticorpi utilizzati nella rilevazione delle proteine spesso non distinguono tra MGP in forma attiva da quella inattiva. È stato constatato, inoltre, che gli anticorpi utilizzati con la metodica ELISA, non solo rilevano tutte le forme di MGP senza distinzione di forma, ma cross-reagiscono anche con altri antigeni MGP-like, come la Fetuina-A [49] (full text). Pertanto, non è chiaro se i risultati ottenuti dagli studi esaminati indicano interazioni biologicamente efficaci. Inoltre, in questo articolo ci siamo concentrati sull'interazione tra MGP, fosforo, calcio e magnesio nelle VSMC, nelle linee cellulari di condrociti e negli osteoblasti. Anche se non abbiamo trovato chiare differenze tra le interazioni di MGP nelle diverse linee cellulari, questo potrebbe spiegare alcuni bias nei nostri risultati. Alcune delle differenze tra gli studi potrebbero essere spiegate dalle condizioni non fisiologiche dei modelli *in vitro*. Inoltre, è possibile che in condizioni patologiche come una grave iperfosforemia, la protezione fisiologica da parte di MGP nelle VSMC viene persa, e alcuni modelli rilevano questa risposta anomala.

Conclusione

Il calcio e il fosforo inducono VC, ma allo stesso tempo potrebbero limitare i loro effetti calcificanti tramite l'up-regulation di MGP. Tuttavia, elevate concentrazioni di calcio nelle MV inducono una diminuzione di MGP mentre livelli elevati di fosforo non hanno alcun effetto su MGP. Il magnesio previene la calcificazione vascolare, ma il suo effetto su MGP rimane poco chiaro. Un effetto inibitorio del magnesio è probabilmente indotto attraverso il CaSR e ci potrebbe anche essere un effetto stimolante in cui è coinvolto il canale TRPM7. Maggiori informazioni sono necessarie per comprendere pienamente i meccanismi alla base delle interazioni e le possibili implicazioni cliniche.

Bibliografia

- [1] London GM, Guérin AP, Marchais SJ et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003 Sep;18(9):1731-40 (full text)
- [2] Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England journal of medicine* 2000 May 18;342(20):1478-83 (full text)
- [3] Abedin M, Tintut Y, Demer LL et al. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004 Jul;24(7):1161-70 (full text)
- [4] Duer MJ, Friscić T, Proudfoot D et al. Mineral surface in calcified plaque is like that of bone: further evidence for regulated mineralization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008 Nov;28(11):2030-4 (full text)
- [5] Louvet L, Büchel J, Stepan S et al. Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2013 Apr;28(4):869-78 (full text)
- [6] Anderson HC Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports* 2003 Jun;5(3):222-6
- [7] Luo G, Ducey P, McKee MD et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997 Mar 6;386(6620):78-81
- [8] Price PA, Urist MR, Otawara Y et al. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochemical and biophysical research communications* 1983 Dec 28;117(3):765-71
- [9] Schurgers LJ, Barreto DV, Barreto FC et al. The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2010 Apr;5(4):568-75 (full text)
- [10] Hur DJ, Raymond GV, Kahler SG et al. A novel MGP mutation in a consanguineous family: review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* 2005 May 15;135(1):36-40
- [11] Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature genetics* 1999 Jan;21(1):142-4
- [12] Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M et al. Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *The Journal of cell biology* 1999 Nov 29;147(5):1097-108 (full text)
- [13] Lomashvili KA, Wang X, Wallin R et al. Matrix Gla protein metabolism in vascular smooth muscle and role in uremic vascular calcification. *The Journal of biological chemistry* 2011 Aug 19;286(33):28715-22 (full text)
- [14] Wallin R, Cain D, Hutson SM et al. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thrombosis and haemostasis* 2000 Dec;84(6):1039-44
- [15] Steitz SA, Speer MY, Curinga G et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation research* 2001 Dec 7;89(12):1147-54 (full text)
- [16] Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN et al. Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007 Dec;5(12):2503-11 (full text)
- [17] Furie B, Bouchard BA, Furie BC et al. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999 Mar 15;93(6):1798-808 (full text)
- [18] Green J The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Mineral and electrolyte metabolism* 1994;20(1-2):7-15
- [19] Evrard S, Delanaye P, Kamel S et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2015 Jan 1;438:401-14
- [20] Mathew S, Tustison KS, Sugatani T et al. The mechanism of phosphorus as a cardiovascular risk factor in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008 Jun;19(6):1092-105 (full text)
- [21] Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A et al. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research* 2011 Sep 2;109(6):697-711 (full text)

- [22] Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C et al. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thrombosis and haemostasis* 2008 Oct;100(4):593-603
- [23] Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP et al. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends in molecular medicine* 2013 Apr;19(4):217-26
- [24] Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005 Feb;16(2):520-8 (full text)
- [25] Jono S, McKee MD, Murry CE et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research* 2000 Sep 29;87(7):E10-7 (full text)
- [26] Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004 Nov;15(11):2857-67 (full text)
- [27] Davies MR, Lund RJ, Mathew S et al. Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005 Apr;16(4):917-28 (full text)
- [28] Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K et al. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *The Journal of biological chemistry* 2012 Sep 28;287(40):33179-90 (full text)
- [29] Julien M, Magne D, Masson M et al. Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2007 Feb;148(2):530-7
- [30] Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009 Nov;24(11):1856-68 (full text)
- [31] Khoshniat S, Bourguine A, Julien M et al. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone* 2011 Apr 1;48(4):894-902
- [32] Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circulation research* 2011 Jun 24;109(1):e1-12 (full text)
- [33] Yao Y, Wang Y ATDC5: an excellent in vitro model cell line for skeletal development. *Journal of cellular biochemistry* 2013 Jun;114(6):1223-9
- [34] Sugden PH, Clerk A Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular signalling* 1997 Aug;9(5):337-51
- [35] Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF et al. The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *The EMBO journal* 2004 Jul 21;23(14):2789-99 (full text)
- [36] Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013 Nov;33(11):2625-32 (full text)
- [37] Chavkin NW, Chia JJ, Crouthamel MH et al. Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells. *Experimental cell research* 2015 Apr 10;333(1):39-48
- [38] Roy ME, Nishimoto SK Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* 2002 Aug;31(2):296-302
- [39] Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW et al. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998 Apr;31(4):607-17
- [40] Nakatani S, Mano H, Ryanghyok IM et al. Excess magnesium inhibits excess calcium-induced matrix-mineralization and production of matrix gla protein (MGP) by ATDC5 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2006 Sep 29;348(3):1157-62
- [41] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL et al. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2000 Nov 2;277(3):736-40
- [42] Molostvov G, Fletcher S, Bland R et al. Extracellular calcium-sensing receptor mediated signalling is involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2008;22(5-6):413-22 (full text)
- [43] Mendoza FJ, Martinez-Moreno J, Almaden Y et al. Effect of calcium and the calcimimetic AMG 641 on matrix-Gla protein in vascular smooth muscle cells. *Calcified tissue international* 2011 Mar;88(3):169-78
- [44] Ishimura E, Okuno S, Kitatani K et al. Significant association between the presence of peripheral vascular calcification and lower serum magnesium in hemodialysis patients. *Clinical nephrology* 2007 Oct;68(4):222-7
- [45] Montes de Oca A, Guerrero F, Martinez-Moreno JM et al. Magnesium inhibits Wnt/ β -catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells. *PLoS one* 2014 Feb 25;9(2):e89525 (full text)
- [46] Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H et al. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2010 Sep;56(3):453-62 (full text)
- [47] Ennever J, Vogel JJ Magnesium inhibition of apatite nucleation by proteolipid. *Journal of dental research* 1981 Apr;60(4):838-41
- [48] Kircelli F, Peter ME, Sevinc Ok E et al. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012 Feb;27(2):514-21 (full text)
- [49] Wajih N, Borrás T, Xue W et al. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *The Journal of biological chemistry* 2004 Oct 8;279(41):43052-60 (full text)

[50] Ciceri P, Elli F, Brenna I et al. The calcimimetic calindol prevents high phosphate-induced vascular calcification by upregulating matrix GLA protein. *Nephron. Experimental nephrology* 2012;122(3-4):75-82

[51] Raggi P, Chertow GM, Torres PU et al. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2011 Apr;26(4):1327-39 (full text)

[52] Block GA, Wheeler DC, Persky MS et al. Effects of phosphate binders in moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012 Aug;23(8):1407-15 (full text)

[53] Murshed M, Schinke T, McKee MD et al. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology* 2004 Jun 7;165(5):625-30 (full text)