

## LE PROTEINE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE NELL'AMBITO DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

Isabella Manetti DDS, Firenze

### INTRODUZIONE

L'osso è un tessuto dinamico, che si rimodella continuamente per tutto l'arco della vita. Le sue proprietà dipendono dalla componente extracellulare la cui struttura è costituita da due fasi: una fase solida minerale e una fase organica in stretta associazione (tab. 1).

<b>COMPONENTI EXTRACELLULARI DEL TESSUTO OSSEO</b>	
Fase minerale	Fase Organica
Calcio e fosforo	Collagene tipo I
	Collagene tipo III
	Collagene tipo IV
	Proteine non collageniche

La fase minerale è costituita da calcio e fosfato e può essere paragonata ad una idrossiapatite poco cristallizzata che viene depositata in stretto rapporto con le fibrille collagene e principalmente in siti particolari, cioè negli spazi vuoti che si creano nelle fibrille al momento dell'aggregazione molecolare ed è probabile che la formazione e la disposizione della fase inorganica siano determinate in parte da tale matrice (1).

La fase organica o matrice extracellulare è costituita per il 90-95% da collagene di tipo I e per la restante porzione da proteine non collageniche tra cui troviamo proteine contenenti l'acido  $\alpha$ -carbossi-glutammico, glicoproteine, sialoproteine e fosfoproteine (tab. 2).

<b>PROTEINE NON COLLAGENICHE</b>		
<b>1) PROTEINE CON AC. GAMMA-CARBOSSI GLUTAMMICO</b>	<b>2) GLICOPROTEINE</b>	<b>3) PROTEOGLICANI</b>
<b>A) OSTEOCALCINA</b>	<b>A) OSTEONECTINA</b>	<b>A) G.A.G.</b>

<b>B) PROT. GLA</b>	<b>B) FOSFATASI ALCALINA</b>	<b>B) BIGLICANO</b>
	<b>C) FIBRONECTINA</b>	<b>C) DECORINA</b>
	<b>D) TROMBOSPONDINA</b>	
	<b>E) OSTEOPONTINA</b>	
	<b>F) SIALOPROTEINE OSSEE</b>	

Inoltre sono presenti altre importanti proteine, alcune delle quali ancora in via di caratterizzazione (tab. 3).

<b>ALTRE PROTEINE</b>
A) FATTORI DI CRESCITA (GF)
B) PROT. MORFOGENETICHE fattori osteoinduttivi osteogenina
C) COMPONENTI DI SINTESI OSTEOCLASTICA
D) ALFA 2 HS GLICOPROTEINA

Durante l'arco della vita, il tessuto osseo va incontro ad un processo di rimodellamento che coinvolge un numero di funzioni cellulari dirette al riassorbimento e alla formazione coordinata di nuovo osso (2).

Tale processo è regolato da fattori sistemici e da fattori locali che influenzano le cellule della linea osteoclastica e osteoblastica ed esercitano i loro effetti su :

- a) la replicazione di cellule non differenziate
- b) il reclutamento cellulare
- c) la funzione differenziata delle cellule

Il prodotto finale del rimodellamento è il mantenimento della matrice ossea mineralizzata attraverso un meccanismo regolato da ormoni polipeptidici, steroidei e tiroidei, come anche da fattori locali che giocano un ruolo diretto ed importante. Il rimodellamento osseo implica la continua rimozione di tessuto (riassorbimento) seguito dalla sintesi di nuova matrice.

In più è una parte integrante dell'omeostasi del calcio poichè la continua rimozione di osso per opera degli osteoclasti, conduce alla liberazione di calcio e costituenti della

matrice nel siero.

Tali costituenti possono essere usati come markers del processo di riassorbimento, e i componenti liberati durante la sintesi osteoblastica della matrice potrebbero essere assunti come marker della formazione ossea.

In approfondite ed estese ricerche negli ultimi dieci anni si è individuata una grande varietà di markers di attività cellulare nell'osso.

I livelli sierici ed urinari di questi markers si sono dimostrati correlati al rimodellamento come confermato dalla istomorfometria ossea e dalla cinetica del calcio.

L'espressione dei markers associati con il fenotipo osteoblastico (fosfatasi alcalina, osteocalcina metaboliti del collagene) dipende dal processo di differenziazione e dal ciclo cellulare.

Studi sulle culture differenziate di osteoblasti di pulcino hanno dimostrato che i metaboliti del collagene si esprimono prima della fosfatasi alcalina mentre l'osteocalcina viene secreta in elevate concentrazioni in relazione all'inizio della mineralizzazione.

Vale la pena sottolineare che i livelli di markers ossei nelle urine e nel siero riflettono il prodotto della produzione cellulare e il numero di cellule attive in quel momento . Il marker ideale della formazione ossea dovrebbe essere una proteina strutturale rilasciata nel sangue in quantità proporzionale alla sua incorporazione nell'osso e la frazione di rilascio dovrebbe cambiare negli stati patologici.

Inoltre dovrebbe essere noto il suo percorso metabolico e l'emivita sierica.

Gli osteoblasti producono collagene, un diverso numero di proteine della matrice non collageniche e enzimi che partecipano alla regolazione della mineralizzazione ossea. Benchè nessuna di queste proteine incontri tutti i requisiti ideali, molte possono essere dosate nel siero come indicatori discretamente affidabili di attività osteoblastica.

## **IL COLLAGENE**

Come molti altri tessuti connettivi, la proteina fibrosa collagenica è il componente strutturale primario dell'osso ed il principale prodotto di secrezione degli osteoblasti. E' una molecola composta da tre catene polipeptidiche, dette catene alfa, che formano una struttura a tripla elica.

Il collagene osseo è differente da ciò che troviamo in altri tessuti, poichè è composto quasi esclusivamente da collagene di tipo I (circa il 90%), contenente due catene alfa 1 e una catena alfa 2, con solo piccole tracce di altri tipi come il tipo III e V (tab.4).

Questi altri tipi di collagene sembrano essere implicati nella regolazione del diametro fibrillare , ed i loro bassi livelli possono spiegare la dimensione relativamente grande delle fibrille presenti nell'osso.

Tale processo di formazione non è stato ancora ben chiarito , ma sembra che la deposizione dei diversi tipi di collagene possa essere mediata dalla rimozione di un precursore post-trascrizionale non collagenico, attraverso specifiche peptidasi seguito dalla formazione di cross-links, attraverso la conversione di residui di lisina ed idrossilisina in derivati aldeidici, attuata da adeguate ossidasi.

Nell'osso il collagene di tipo I contiene prevalentemente residui di galattosil-OH-lisina, in contrapposizione agli altri tessuti connettivi che presentano numerosi residui di glucosil-galattosil-OH-lisina.

Inoltre presenta un numero minore di legami (cross-links), probabilmente dovuto al rapido turn-over cui è sottoposto il tessuto osseo.

Nonostante queste proprietà, sembra però che non siano le fibrille collageniche a mediare direttamente la deposizione di idrossiapatite; queste ultime infatti sono probabilmente rivestite da un numero di differenti proteine , ed è possibile che il

collagene orienti queste proteine in modo tale da mediare gli eventi della mineralizzazione.

## **PROTEINE NON COLLAGENICHE**

Circa il 10% della componente organica dell'osso è costituita da una larga varietà di proteine non collageniche, i cui livelli sono dipendenti dall'età, dalla maturazione ossea e dalla loro stessa degradazione (fig.1).

### • 1) **PROTEINE CONTENENTI AC. GAMMA-CARBOSSI-GLUTAMMICO**

-a) *OSTEOCALCINA*: è stata una delle prime proteine della matrice ad essere stata descritta (13).

Compare tardivamente nello sviluppo del tessuto osseo ed è peraltro l'unica proteina presente esclusivamente nell'osso e nella dentina (14).

La sua espressione è regolata dalla vitamina D e da enzimi vitamina K dipendenti (in uno studio su ratti trattati con warfarin si è notata una alterazione post-trascrizionale della proteina stessa).

Per il fatto che compare tardivamente nella maturazione tissutale, viene spesso messa in relazione con un inizio di turn-over metabolico. Ha inoltre una modesta affinità per il calcio.

E' stato suggerito infatti che possa rappresentare un fattore chemiotattico per i precursori degli osteoclasti e che possa influenzare l'attività di tali cellule nell'ambito del rimodellamento osseo.

-b) *PROTEINA GLA DELLA MATRICE*: è presente sia nella cartilagine che nell'osso in fasi precoci di maturazione e, poichè la sua sintesi è stimolata dalla vitamina D prima della fase di mineralizzazione, sembra essere implicata nella regolazione dell'omeostasi del calcio.

### • 2) **GLICOPROTEINE**

- a) *OSTEONECTINA*: questa glicoproteina acida è altamente presente nella matrice ossea e a causa della sua alta affinità per il collagene (16) e per alcuni ioni minerali, è stata spesso considerata un precursore della mineralizzazione (fig.2).

Recenti studi hanno evidenziato la presenza di osteonectina in molti tessuti non mineralizzati, dove assume una diversa nomenclatura (SPARC, BM 40, PROT.44-K) e ciò ha suggerito una funzione più generalizzata della stessa(4). E' espressa attivamente in tessuti atti alla steroidogenesi e alla sintesi di proteine della membrana basale, così come nell'osso a mineralizzazione endondrale ed intramembranosa, e nella cartilagine.

- b) *FOSFATASI ALCALINA*: la fosfatasi alcalina totale (tAP) è ancora il marker osseo più usato nella pratica clinica.

Nel sangue si ritrovano tre isoenzimi codificati da geni separati: fosfatasi alcalina epatica, ossea e renale (17).

La fosfatasi alcalina intestinale e placentare esiste in minori concentrazioni.

La forma epatica e quella ossea si distinguono solo per sottili differenze nella glicosilazione post-trascrizionale. L'enzima funzionale è legato in tetrameri alle membrane cellulari e alle vescicole citoplasmatiche, mentre la tAP sembra rappresentare la parte versata.

Essa ha la capacità di spezzare il fosfato inorganico dal fosfato organico,

umentando il prodotto calcio-fosfato e permettendo la mineralizzazione, ma agisce anche sul pirofosfato inorganico che è un potente inibitore della mineralizzazione.

Mutazioni nella regione funzionale dell'enzima, come riscontrato nell'ipofosfatemia, sono caratterizzate da gradi variabili di osteomalacia e rachitismo, indicando che tale enzima è essenziale per la normale mineralizzazione dell'osso.

La fosfatasi ossea costituisce circa il 50% della fosfatasi alcalina sierica ed ha una emivita di 24-48 ore, variando con un ritmo circadiano con picchi nel pomeriggio e nella notte.

Viene eliminata principalmente dal fegato e la sua clearance viene alterata in alcune malattie epatiche, come nella cirrosi biliare primitiva.

- o c) FIBRONECTINA: è una delle più versatili fra le proteine della matrice extracellulare, in quanto partecipa ad un gran numero di processi extracellulari, quali la migrazione cellulare, l'attacco cellulare e l'organizzazione della matrice(12).

Chimicamente è un dimero composto di due subunità simili ma non identiche prodotto dagli osteoblasti e regolato dal TGF- $\beta$ .

Il ruolo della fibronectina nel metabolismo osseo non è stato investigato approfonditamente; in studi sulla formazione ossea indotti da polvere di osso mineralizzato, la fibronectina viene sintetizzata durante lo sviluppo osseo.

Essa è inoltre presente attorno agli osteoblasti durante l'osteogenesi, anche se non è stato determinato se è un componente integrale della matrice ossea.

- o d) TROMBOSPONDINA: è una glicoproteina trimerica costituita da subunità identiche fra loro che si legano ad una lunga lista di tessuti connettivi e a proteine sieriche (7).

Si lega inoltre al calcio, all'idrossiapatite e all'osteonectina.

E' localizzata negli a-granuli delle piastrine ed è distribuita in una varietà di tessuti come la giunzione dermo epidermica cutanea, in piccoli vasi sanguigni di molti tessuti che circondano le fibre del muscolo scheletrico, sotto l'epitelio ghiandolare, e negli spazi peritubulari di cute e polmoni.

Generalmente è presente durante gli stadi della proliferazione cellulare, della migrazione e adesione intercellulare (9).

E' prodotta da molti tipi di cellule fra cui gli osteoblasti e le sue funzioni variano dall'aggregazione piastrinica, all'organizzazione dei componenti della matrice extracellulare in virtù della sua capacità di legarsi con più sostanze.

- o e) OSTEOPONTINA: mediante metodiche immuno istochimiche, l'osteopontina è stata localizzata specificamente nella matrice extracellulare dell'osso lamellare durante l'ossificazione endondrale ed intramembranosa nel ratto.

Sembra esistere in numerose forme a seconda dei livelli di fosforilazione (11) ed è prodotta da diversi tipi di cellule quali condrociti, cellule ossee, monociti, cellule dei tubuli renali.

La sua funzione in vitro è simile a quella della fibronectina, come mediatore dell'aggregazione cellulare (6).

- o f) SIALOPROTEINA OSSEA (BSP-II): è stata ritrovata solo in osteoblasti, osteociti, ed a bassi livelli in condrociti fetali ipertrofici.

Come l'osteopontina presenta una attività in senso di ancoraggio cellulare, anche se agisce solamente ad alte concentrazioni e per un tempo meno

prolungato (5).

E' una molecola ricca di acido aspartico, glutammico e glicina ed è composta per un 50 % da carboidrati.

Recentemente è stata utilizzata per isolare un sito di legame sulla superficie cellulare, identificato come un recettore per le integrine, attivo nel legare molecole di osteopontina.

### • 3) **PROTEOGLICANI**

Una delle classi di proteine non collageniche maggiormente rappresentate nella matrice mineralizzata sono i proteoglicani (8).

Queste molecole sono composte da un nucleo proteico cui si attaccano lunghe catene saccaridiche, denominate glicosamminoglicani (GAG) (15).

La composizione dell'unità disaccaridica determina il tipo di G.A.G.

Troviamo fra essi : il condroitinsolfato (CS), il dermatansolfato (DS), l'eparansolfato (HS), il cheratansolfato (KS) e l'acido ialuronico (HA).

L'osso contiene catene di G.A.G. molto più lunghe della cartilagine ed inoltre nel tessuto subperiosteale in sviluppo, sono state identificate due classi di proteoglicani denominate PG I o biglicano e PG II o decorina(fig.3) (3).

Nel tessuto osseo il biglicano e la decorina sono stati entrambi immunolocalizzati nella matrice e nelle cellule di aree ossee di nuova formazione.

In altri tessuti connettivi, il biglicano è predominante in prossimità di cellule endoteliali, epiteliali e muscolari, mentre la decorina è localizzata nel derma, nei tendini, nella sclera e nella cornea.

Biglicano e decorina differiscono significativamente nel processo di sintesi, secrezione e deposizione nella matrice.

Sono depositati circa in egual quantità, ma il biglicano è modificato, secreto e degradato molto più velocemente.

Inoltre la vitamina D ne diminuisce la sintesi, mentre sembra non interagire con quella di decorina.

## **ALTRE PROTEINE**

- 1) **FATTORI DI CRESCITA (GF)** : un diverso numero di fattori di crescita è stato isolato dalla matrice ossea mineralizzata (10); tra questi ritroviamo: a) GF insulino simili : sono polipeptidi ormono-dipendenti con un peso molecolare di 7.600. Sono state caratterizzate due IGF: la I e la II. Questi peptidi sono sintetizzati da più tessuti incluso l'osso, ed hanno proprietà biologiche simili, benchè la IGF I sia circa sette volte più potente della II.

E' stato dimostrato, con analisi biochimiche ed istomorfometriche , che la IGF I accentua la sintesi del collagene e della matrice ossea e che stimola la replicazione di cellule della linea osteoblastica.

E' probabile quindi che giochi un ruolo fondamentale nel processo di formazione ossea e nel mantenimento di tale massa.

Il processo di sintesi di tali fattori di crescita sembra essere mediato da fattori quali il PTH, le prostaglandine E2 e la beta 2 microglobulina.

Inoltre le cellule ossee secernono proteine leganti le IGF , che possono neutralizzare o rafforzare l'attività biologica di tali fattori o essere coinvolte nel trasporto delle IGF alle cellule bersaglio.

b) GF beta trasformanti: sono polipeptidi che giocano funzioni molteplici nella

regolazione del normale metabolismo cellulare.

Il TGF beta viene sintetizzato da molti tessuti incluso l'osso, dove sembra stimolare la replicazione dei precursori cellulari della linea osteoblastica ed avere un effetto stimolatorio diretto sulla sintesi del collagene osseo.

Inoltre diminuisce il riassorbimento osseo, poichè i suoi valori aumentano significativamente in presenza di ormoni, quali il PTH, che favoriscono il processo degradativo.

c) GF fibroblastici: sono polipeptidi acidi e basici, leganti l'eparina, sintetizzati dal sistema nervoso centrale e da una varietà di tessuti normali e maligni, che rivestono un ruolo di primaria importanza nel processo di guarigione delle ferite. Le FGF acide e basiche contenute nell'osso stimolano la replicazione cellulare e la sintesi di collagene attraverso l'aumentato numero di cellule. Non sembrano invece modificare il riassorbimento o la degradazione della matrice.

d) GF piastrino derivato: il PDGF viene prodotto da tessuti normali e neoplastici a conferma della sua capacità di azione come regolatore sistemico o locale di crescita tissutale. E' un dimero che stimola il riassorbimento osseo e la replicazione cellulare e svolge un' importante azione nel rimodellamento e nella guarigione ossea, pur non agendo direttamente sulla funzione differenziata dell'osteoblasta.

- **2) PROTEINE MORFOGENETICHE DELL'OSSO** (osteogenina e fattori osteoinduttivi): sono proteine geneticamente distinte spesso associate al TGF beta nella formazione di tessuto osseo, delle quali non è stata identificata chiaramente la sintesi ed il processo di assorbimento sierico.
- **3) COMPONENTI DI SINTESI OSTEOCLASTICA:** è noto come nel tempo tutte le proteine non collageniche vengano lentamente degradate. Gli enzimi che mediano questa degradazione sono proteasi ossee capaci di eliminare molecole di osteonectina e osteopontina. Durante il riassorbimento, gli osteoclasti aderiscono alla superficie ossea formando un' area assimilabile ad un lisosoma extracellulare. Gli enzimi lisosomiali sono trasportati in questo compartimento extracellulare che viene acidificato attraverso l'azione di una pompa protonica. Gli enzimi presenti, a questo punto, sono capaci di degradare i componenti della matrice extracellulare.
- **4) ALFA 2 HS GLICOPROTEINA:** è un dimero composto da due catene A e B che presentano entrambe la sequenza ALA-ALA o PRO-PRO. Attraverso l'utilizzo di metodiche radioattive è stato stimato che circa il 40 % della proteina prodotta nel fegato si ritrova nel tessuto osseo, dove è concentrata cento volte di più che nel siero. Nell'osso la sua quantità diminuisce con l'età e sembra essere attiva nel processo di rimodellamento, attraverso l'azione chemiotattica sui monociti e sui macrofagi. E' quindi possibile pensare ad una sua funzione nell'attivazione di precursori osteoclastici durante il turn-over osseo.

**CONCLUSIONI** Il rimodellamento osseo avviene in sedi circoscritte della superficie ossea, ad opera di milioni di unità funzionali denominate Basic Multicellular Units (BMU), ognuna delle quali evolve con una sequenza fissa che comprende l'iniziale rimozione di un volume microscopico di osso e la sua successiva sostituzione con osso di nuova sintesi.

La relazione temporale tra riassorbimento e formazione prende il nome di accoppiamento. I markers biochimici, ritrovabili nel tessuto osseo riflettono l'entità globale di tali processi.

Il principale determinante dell'attività metabolica totale dello scheletro è rappresentato dalla velocità con cui nascono le nuove unità di rimodellamento, che viene detta frequenza di attivazione.

Di conseguenza, il livello dei markers biochimici di turn over osseo indica principalmente la frequenza di attivazione del metabolismo osseo. In condizioni normali e nella maggior parte delle malattie metaboliche dell'osso, l'esistenza dell'accoppiamento dei due processi e l'asincronia fra le varie BMU, fa sì che i livelli di riassorbimento e di formazione siano altamente correlati fra loro.

Di conseguenza, sia i markers di formazione, sia quelli di riassorbimento, danno informazioni simili, che riflettono l'entità del processo globale di rimodellamento. Con la presente review della letteratura, abbiamo voluto fornire un quadro generale sulle attuali conoscenze dei processi di apposizione e riassorbimento, ed una visione globale dei possibili fattori che li determinano. E' utile tener presente la necessità di ampliare tali conoscenze, con studi sperimentali, allo scopo di poter individuare con maggior precisione le proprietà di ogni elemento analizzato.

Ciò potrà essere di aiuto, in campo odontoiatrico, per progettare terapie riabilitative di tipo implantologico o per favorire processi riparativi in regioni lesionate.

Le conoscenze attuali, pertanto, si spingono verso questo proposito, con lo scopo di chiarire in modo migliore, sia a livello generale, sia in ambito odontostomatologico, il fenomeno del rimaneggiamento osseo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1)Anderson HC: Biology of disease: mechanism of mineral formation in bone. Lab Invest 60:320, 1989.
- 2)Auf'mkolk R, Hauschka PV, Schwartz E: Characterization of human bone cells in culture. Calcif Tissue Int 37:228: 1985.
- 3)Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Gerhony Robey P: Expression and localization of the two small proteoglycans, biglycan and decorin, in human developing skeletal and non skeletal tissues. J Histochem Histochem J 1990;38:1549-63.
- 4)Bianco P, Kopp JB, Fisher LW, Termine JD, Gerhony Robey P: New data on the distribution of osteonectin/SPARC in human and mouse tissues their potential implication. J Bone Miner Res 1989, 4 (suppl):s 245.
- 5)Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Gerhony Robey P: Expression of bone sialoprotein in human developing skeletal and non skeletal tissues. Calcif Tissue Int. in press.
- 6)Butler WT: The nature and significance of osteopontin. Coll Relat Res 1989;23:123-36.
- 7)Donoviel DB, Framson P, Eldridge CF, Cooke M, Kobayashi S, Bornstein P: Structural analysis and expression of the human thrombospondin gene promoter. J Biol Chem 1988;263:18590-3.
- 8)Fisher LW: The nature of proteoglycans of bone. The chemistry and biology of mineralized tissues. EBSCO Media 1985;188-96.
- 9)Frazier WA. Thrombospondin. J Cell Biol 1987;105:625-32.



- 10) Hauschka PV, Mavrakos AE, Klagsburn M: Growth factor in bone matrix. J Biol Chem 1986;261:12665-74.
- 11) Kiefer MC, Auer DM, Barr PJ,: The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. Nucleic Acids Res 1989;17:3306.
- 12) Peirschbacher MD, Ruoslathi E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 1984;309:30-3.
- 13) Price PA: Osteocalcin. Bone and mineral research. Princeton Excerpta medica 1983, 157-90.
- 14) Puchacz E, Lian JB, Stein GS: Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. Endocrinology 1989;124:2648-52.
- 15) Ruoslathi E: Proteoglycans in cell regulation. J Biol Chem 1989;264:13369-72.
- 16) Termine JD, Kleimann HK, Whitson SW: Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. Cell 1981;26:99-105:
- 17) Weiss MP, Kunal R, Harris H: Structure of the Human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 1988;263:12002.

**Autore :**

***Dr.ssa Isabella Manetti***  
[manetti@vjo.it](mailto:manetti@vjo.it)

[Torna all' home page](#)