
REVISIÓN

Regulación de la mineralización ósea por factores inorgánicos y peptídicos

Regulation of Bone Mineralization by inorganic and peptide factors

Negri A.L.

Cátedra de posgrado en osteología, Instituto de Investigaciones Metabólicas. Universidad del Salvador, Buenos Aires

RESUMEN

La mineralización ortotópica comienza con la producción de las vesículas de matriz, por brotación polarizada de la superficie de condrocitos, osteoblastos y odontoblastos. Esta transcurre en dos etapas. La primera es la formación de cristales de hidroxiapatita dentro de las vesículas de matriz, seguido por la propagación de la hidroxiapatita a través de la membrana de la vesícula dentro de la matriz extracelular. En la regulación de la mineralización ortotópica, aparte de las células tejido específicas, intervienen un gran número de enzimas, factores inorgánicos y peptídicos, que tienen complejas interacciones. Para que la mineralización normal continúe se necesita un ajustado balance entre los niveles de fosfato inorgánico (Pi) y de pirofosfato inorgánico (PPi) extracelular. El PPi antagoniza la habilidad del Pi para cristalizar con el calcio y formar hidroxiapatita y por lo tanto suprime su propagación. Se han identificado tres moléculas reguladoras centrales de los niveles extracelulares de PPi: la fosfatasa alcalina tejido-no específica (TNAP), que hidroliza el PPi, la nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa 1 (NPP1), que genera PPi de nucleósidos trifosfato y la proteína transmembrana de múltiples-pasos ANK, que media la transferencia intracelular al extracelular de PPi. A su vez existen dos proteínas SIBLING llamadas DMP1 y MEPE reguladoras de la mineralización. La expresión de DMP1 por el osteocito se induce en forma marcada en respuesta a la carga mecánica incrementando la mineralización ósea. La proteína MEPE contiene un motivo peptídico proteasa resistente llamado ASARM, que se cree es un candidato a ser un inhibidor de la mineralización (minhibina). La osteropontina es otro inhibidor de la mineralización en su forma fosforilada y su secreción está marcadamente reducida en los ratones "knockout" para NPP1. Los datos actuales parecen sostener la hipótesis que estas moléculas podrían ser las transductoras del "strain" óseo y participar en la regulación de la mineralización del espacio osteocítico perilacunar. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 216-224, 2011**

El autor declara no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: mineralización, regulación, pirofosfato, MEPE, osteocito

ABSTRACT

Orthotopic mineralization begins with the production of matrix vesicles that are produced by polarized budding of the surface of chondrocytes, osteoblasts and odontoblasts. It occurs in two steps: The first one is the formation of hydroxyapatite crystals within the matrix vesicles, followed by the propagation of the hydroxyapatite crystals through the membrane vesicle into the extra cellular matrix. In the regulation of orthotopic mineralization, apart from tissue-specific cells, a great number of enzymes, inorganic and peptide factors participate, that have complex interactions among them. Inorganic pyrophosphate (PPi) antagonizes the ability of phosphate (Pi) to crystallize with calcium and to form hydroxyapatite, thus suppressing its propagation. For the normal mineralization to continue, an adjusted balance of the extra cellular Pi and PPi levels is needed. Three molecules have been identified that have a central role in the regulation of extra cellular PPi levels: tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), which hydrolyzes PPi, the nucleotide

pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (NPP1), which generates PPI from triphosphate nucleosides, and the multiple-steps transmembrane protein ANK which transfers PPI from the intracellular to the extracellular compartment. There are, in turn, two SIBLING proteins called DMP1 and MEPE that regulate mineralization. The expression of DMP1 by the osteocyte is dramatically induced in response to mechanical loading increasing bone mineralization. MEPE protein contains a protease resistant motif called ASARM, which is believed to be the candidate for the mineralization inhibitor (minhibin). Osteopontin is another mineralization inhibitor in its phosphorylated form and its secretion is markedly reduced in knockout mice for NPP1. Present data seem to support the hypothesis that these molecules could be the translators of bone strain and participate in the regulation of mineralization of the perilacunar osteocytic space. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 216-224, 2011**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: mineralization, regulation, pyrophosphate, MEPE, osteocyte

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es el proceso por el cual los minerales son depositados en el interior o por fuera de una variedad de organismos⁽¹⁾. En los tejidos de los vertebrados el mineral se deposita en una forma de fosfato de calcio, la hidroxiapatita. La mineralización fisiológica ocurre en los tejidos duros, como el hueso, siendo este proceso altamente regulado por células tejido específicas⁽²⁾. En contraste, la calcificación heterotópica o calcificación de tejidos blandos puede ocurrir en el cartílago articular, en tejidos cardiovasculares como los vasos y en el riñón⁽³⁾, etc. En la regulación de la mineralización ortotópica, aparte de las células tejido específicas, intervienen un gran número de enzimas, factores inorgánicos y peptídicos, que tienen complejas interacciones y que son el motivo de esta revisión.

Las Vesículas de matriz en el proceso de mineralización ósea

Las vesículas de matriz son elementos vesiculares de 50 a 200 nm de diámetro revestidos de membrana que se producen por brotación polarizada de la superficie de condrocitos, osteoblastos y odontoblastos⁽²⁾. Las señales necesarias para la liberación de estas vesículas de matriz no se conocen con precisión, a pesar de que se presume que las concentraciones de calcio intracelular y fosfato extracelular podrían ser importantes. La composición lipídica de las vesículas de matriz difiere de las de la membrana de las células de donde se originan. Estas vesículas de matriz son ricas en varios fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina, un lípido con alta afinidad por el calcio⁽⁴⁾. Las vesículas de matriz son también ricas en anexinas A2 (II), A5 (V), y A6 (VI) y en

Ca ATasa, calbindina D9K, anhidrasa carbónica, colágeno X, fosfatasa alcalina, pirofosfatasa fosfodiesterasa 1 (NPP1), el cotransportador Na/Pi III y PHOSPHO1^(2,3,5) (Gráfico1).

Etapas de la Mineralización

La mineralización ocurre en dos etapas⁽²⁾. La primera comienza con la formación de cristales de hidroxiapatita dentro de las vesículas de matriz, seguido por la propagación de la hidroxiapatita a través de la membrana de la vesícula dentro de la matriz extracelular.

Primera etapa: Los fosfolípidos ligadores de calcio como la fosfatidilserina, las proteínas ligadoras de calcio como la calbindina D9K y la sialoproteína ósea promueven la acumulación de calcio dentro de las vesículas de matriz^(2,6). Las anexinas en las vesículas de matriz forman canales de calcio que incorporan calcio dentro de las vesí-

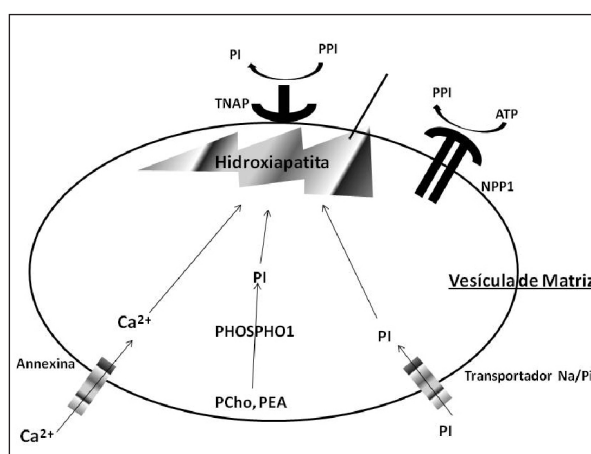


Gráfico 1. Vesícula de Matriz. Pi: fósforo; PPi Pirofosfato; TNAP: Fosfatasa alcalina tejido inespecífica; NPP1; nucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa 1; PCho: fosfatidilcolina; PEA: fosfatidil-etanolamina.

culas^(5,7). El fosfato inorgánico (Pi) es provisto por el cotrasportador Na/Pi tipo III que se encuentra tanto en la membrana de las células originadoras de vesículas como en las mismas vesículas de matriz^(8,9). La fosfatasa citosólica PHOSPHO1 también produce fosfatos hidrolizando fosfocolina y fosfoetanolamina que derivan de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa C⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Cuando la acumulación de calcio y fósforo excede el punto de solubilidad para el fosfato de calcio (CaPO_4) éste se deposita en la forma de hidroxapatita en las vesículas.

Segunda etapa: El cristal de hidroxapatita generado en la primera etapa penetra la pared de membrana de la vesícula de matriz y se elonga dentro del espacio extracelular de la matriz. El fluido extracelular contiene suficiente calcio y fósforo inorgánico para soportar la formación continua de nuevos cristales de hidroxapatita. Ésta se propaga en acúmulos alrededor de las vesículas de matriz rellenando el espacio entre las fibrillas de colágeno presentes en la matriz^(12,13). La propagación de los cristales de hidroxapatita depende críticamente de la relación entre Pi y el pirofosfato inorgánico (PPi), ya que este último inhibe la formación de la hidroxapatita.

Reguladores de la biomineralización

Reguladores inorgánicos: Relación Fosfato /Pirofosfato

La exposición de los cristales de hidroxapatita al medio extracelular permite que continúe el crecimiento y proliferación de los cristales⁽¹³⁻¹⁵⁾. El PPi antagoniza la habilidad del Pi para cristalizar con el calcio y formar hidroxapatita y por lo tanto suprimir la propagación del cristal de hidroxapatita. Para que la mineralización normal continúe se necesita un ajustado balance entre los niveles de Pi y de PPi extracelular. (Gráfico 2)

Se han identificado tres moléculas que son reguladores centrales de los niveles extracelulares de PPi y Pi: la fosfatasa alcalina tejido-no específica (TNAP), que hidroliza el PPi⁽¹⁶⁻²⁰⁾, la nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa 1 (NPP1), que genera PPi de nucleósidos trifosfato⁽²¹⁻²³⁾, y la proteína transmembrana de múltiples-pasos ANK, que media la transferencia de intracelular a extracelular del PPi^(24,25). Tanto la TNAP como la NPP1 están localizadas en las vesículas de matriz pero no la ANK.

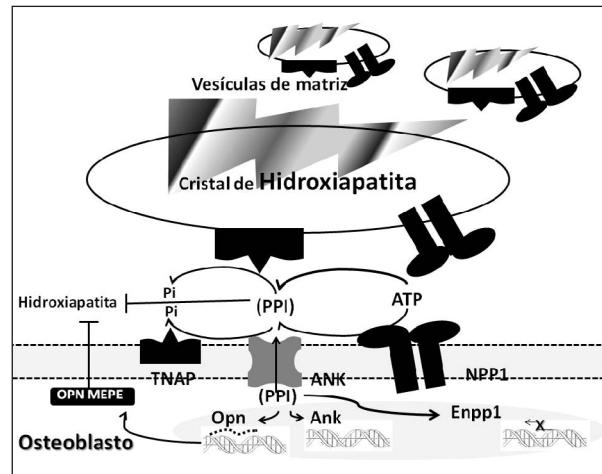


Gráfico 2. Interacción entre las vesículas de matriz y los osteoblastos. Pi: fósforo; PPi Pirofosfato; TNAP: Fosfatasa alcalina tejido inespecífica; NPP1: nucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa; OPN: osteopontina; MEPE: fosfoglicoproteína de Matriz Extracelular.

La TNAP es un importante promotor de mineralización porque cataliza la hidrólisis del PPi disminuyendo por lo tanto, las concentraciones de este inhibidor de la calcificación, mientras que concomitantemente incrementa los niveles de Pi. En los ratones en los cuales se ha inactivado el gen de la TNAP (*Akp2*^{-/-}) se producen alteraciones que se parecen a la forma más severa de hipofosfatasa, una enfermedad caracterizada por raquitismo, osteomalacia, fracturas óseas espontáneas e incremento en los niveles de PPi^(26,27). Las preparaciones esqueléticas de ratones *Akp2*^{-/-} muestran pobre mineralización en los huesos parietales, escápulas, vértebras y costillas⁽²⁸⁻³⁰⁾. La NPP1 funciona como una inhibidora fisiológica de la calcificación, por lo menos en parte, al generar PPi^(21-23,31). A los niños con deficiencia severa de NPP1 se los ha asociado recientemente al síndrome de calcificación arterial y periarticular espontánea infantil^(32,33). Los ratones “knockout” para NPP1 (*Enpp1*^{-/-}) también conocidos como “tiptoe walking (*ttw/ttw*) mice”, desarrollan en forma espontánea anquilosis progresiva intervertebral, hiperostosis periférica articular y calcificación del cartilago articular⁽³⁴⁻³⁷⁾. A pesar de la manera diferente por la cual la NPP1 y la ANK proveen PPi a la matriz ósea, un fenotipo similar se asocia con una mutación de truncado del dominio citosólico C-terminal del ANK, que ocurre naturalmente y que aparece atenuar la canalización extracelular del PPi en el ratón mutante *ank/ank*^(24, 25,38). Por lo tanto, los ratones

deficientes en NPP1 (*Enpp1*^{-/-}), o con trastornos en la función de canalización del PPi del ANK (*ank/ank*), tienen disminuciones en los niveles de PPi extracelular y están hipermineralizados. Los ratones deficientes en TNAP, NPP1 y ANK tienen todos niveles alterados de PPi y por lo tanto estos ratones son herramientas muy valiosas para comprender con más profundidad la función del PPi en el proceso de mineralización ósea. En la comprensión del proceso de biomineralización es muy importante no solo cómo los osteoblastos y los condrocitos elaboran y disponen del PPi, sino también que efectos tiene el PPi sobre las células formadoras de hueso, en particular la expresión génica en los osteoblastos. El entrecruzamiento de ratones “knockout” para fosfatasa alcalina (*Akp2*^{-/-}) y NPP1 (*Enpp1*^{-/-}) se produce un rescate de los niveles de PPi con respecto los animales con una sola deficiencia, resultando en una corrección del defecto de mineralización⁽²⁰⁾. Dada la similitud de función de NPP1 y ANK y también la similitud en el fenotipo de los ratones deficientes, el entrecruzamiento de ratones *Akp2*^{-/-} con ratones *ank/ank* produce una normalización parcial del fenotipo de mineralización y de los niveles de PPi. Al examinar los ratones *Enpp1*^{-/-} y *ank/ank* se observa que los ratones *Enpp1*^{-/-} tienen un fenotipo más severamente hipermineralizado que los ratones *ank/ank*, ya que la NPP1 pero no la ANK se localiza en la vesículas de matriz, sugiriendo que la falla de la deficiencia de ANK para corregir la hipomineralización del ratón *Akp2*^{-/-} refleja la falta de actividad ANK, en el compartimiento de la vesícula de matriz.

Reguladores peptídicos de la mineralización: La hipótesis de los péptidos ASARM

El ratón Hyp presenta una enfermedad similar al raquitismo hipofosfatémico ligado al X (XLH) de los humanos. Tanto el ratón Hyp como el XLH son causados por mutaciones del gen PHEX (del inglés Phosphate regulating gene with homologues to endopeptidases on the chromosome X) que codifica la enzima Phex, un miembro de la familia de la enzima convertidora de endotelina, que son endopeptidasas localizadas en la parte externa de la membrana celular⁽³⁹⁾. Tanto los ratones Hyp como los pacientes con XLH presentan un defecto de mineralización ósea. Se ha hipotetizado que los ratones Hyp producen un factor secretado desconocido llamado Minibina, que inhibiría la mineralización de la matriz extracelular. La

Minibina sería teóricamente un sustrato de la enzima Phex, que se presume se acumularía en el hueso de los ratones Hyp y en los humanos con la enfermedad XLH⁽⁴⁰⁾. Existe otra enfermedad que tiene un fenotipo similar al de la XLH que es el raquitismo autosómico recesivo (ARHR). Esta enfermedad al igual que el XLH presenta raquitismo/osteomalacia, hipofosfatemia y regulación anormal del calcitriol, esto debido a niveles elevados de una fosfatona ósea el FGF23. El ARHR es causado por mutaciones inactivadoras de la proteína extracelular de matriz llamada DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), que pertenece a las llamadas proteínas SIBLING (del Inglés Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)⁽⁴¹⁾. Ambas enfermedades (XLH y ARHR) tienen elevado el FGF23 de origen osteocítico, lo que sugiere la presencia de una vía paracrina/endocrina que coordinaría el proceso de mineralización ósea con la reabsorción renal de fósforo.

Existe otra proteína SIBLING llamada MEPE (del Inglés Matrix Extracellular phosphoglycoprotein) también llamado MGP (Matrix Gla Protein). MEPE contiene un motivo peptídico proteasa resistente llamado ASARM (del inglés Acidic serine-aspartate-rich-motief) que se cree es un candidato para la elusiva minihibina⁽⁴²⁾. La idea de que MEPE es una fuente de minihibina surge de observaciones en que la inactivación del Phex en el ratón Hyp se asocia con un incremento en la proteólisis del MEPE y la liberación de péptidos ASARM que acumulados en la matriz extracelular inhiben el proceso de mineralización⁽⁴³⁾. Además, estos péptidos ASARM parecerían ser degradados por la ectopeptidasa Phex, lo cual contribuiría más a su acumulación en la ausencia de Phex⁽⁴⁴⁾. Otros estudios demuestran que anticuerpos anti-ASARM o péptidos solubles derivados del Phex secuestran ASARM y corrigen la mineralización defectuosa de los osteoblastos derivados de Hyp y células del estroma medular óseo “in vitro”⁽⁴⁵⁾. La relevancia de MEPE con respecto al hueso se sustenta por el mapeo de un loci de densidad mineral ósea en humanos al 4q21.1, una región donde se encuentra localizado el gen del MEPE en humanos⁽⁴⁶⁾ y un pequeño incremento de la densidad ósea con la edad en el ratón null para MEPE⁽⁴⁷⁾. Finalmente la sobreexpresión de MEPE en ratones, bajo el control del promotor col1a1, lleva a un incremento de MEPE y niveles de ASARM en hueso asociándose a mineralización defectuosa.

Recientemente, se ha demostrado la importancia de la modificación postranslacional para la

actividad sitioespecífica de la actividad de MEPE y sus péptidos ASARM. La proteína intacta fosforilada fue un efectivo promotor de mineralización, mientras que el péptido ASARM fue un efectivo inhibidor. Cuando se defosforilaron ambos la proteína intacta como el péptido ASARM no tuvieron efecto sobre la mineralización⁽⁴⁸⁾.

Regulación de los factores peptídicos por pirofosfato y fósforo

La osteopontina (OPN) es otra proteína inhibidora de la mineralización que esta incrementada en los ratones *Akp2*^{-/-}, y disminuida en los ratones *ank/ank*. Los niveles de PPI y OPN se normalizan en los ratones doble knockout [*Akp2*^{-/-}; *Enpp1*^{-/-}] y [*Akp2*^{-/-}; *ank/ank*], tanto a nivel del ARNm como a nivel del suero⁽⁴⁹⁾. Los osteoblastos del ratón Wild-type tratados con PPI muestran un incremento en OPN, y una disminución en la expresión *Enpp1* y *Ank*. Por lo tanto TNAP, NPP1, y ANK en forma coordinada regulan los niveles PPI y OPN. La hipomineralización observada en los ratones *Akp2*^{-/-} surge de los efectos inhibitorios combinados de PPI y OPN. En contraste, las deficiencias de NPP1 o ANK causan una disminución en los pools de PPI y OPN que llevan a hipermineralización. No se conoce la forma en que el PPI regula el gen de osteopontina y se desconoce si existen receptores celulares para PPI.

La expresión de varios genes que codifican proteínas reguladoras de la mineralización específicos de células óseas, como la DMP1, la osteopontina y la matrix-gla-proteína, son estimulados por el fósforo a nivel trascripcional, mientras que la expresión de TNAP es suprimida⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. La captación celular de fósforo por transportadores especializados parece ser un requerimiento indispensable, ya que la adición del ácido fosfonofórmico (forskarnet), un inhibidor del cotrasportador sodio/fosfato, bloquea estos efectos del fósforo⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Los efectos posteriores que resultan en la supresión de TNAP puede requerir de señalización la proteína morfogenética ósea, como se ha visto en las células de estroma medular óseo ST-2 de ratones⁽⁵⁵⁾. En contraste, en células ATDC5, la señalización del fosfato depende de la vía p42/p44- MAPK (mitogen activated protein kinase) / ERK (extracellular signal-regulated kinase)⁽⁵⁶⁾. En forma similar la inducción de osteopontina y matrix-gla-proteína requieren de la activación de la vía p42/p44-MAPK/ERK y puede ser bloqueada por el UO126, un inhibidor específico de MAPK/ERK kinasa^(57,58).

Regulación de la mineralización en el espacio lacuno canalicular osteocítico

Las proteínas SIBLINGs, DMP1, MEPE y osteopontina como mencionáramos anteriormente, han mostrado jugar un rol importante en la regulación de la mineralización ósea. DMP1 y MEPE se encuentran expresadas por los osteoblastos (en etapas tardías) y osteocitos que están localizados en los canaliculos y paredes de las lagunas osteocíticas. En contraste con la DMP1, la MEPE parece ser un regulador negativo de la mineralización ya que el ratón nulo para MEPE, tiene un incremento en la densidad mineral ósea⁽⁵⁹⁾. Los péptidos ASARM, productos del clivaje de la MEPE pueden bloquear en forma directa la mineralización tanto “in vitro”⁽⁶⁰⁾ como “in vivo”⁽⁶¹⁾. Los datos actuales parecen sostener la hipótesis que estas moléculas podrían ser las transductoras del “strain” óseo y participar en la regulación de la mineralización del espacio perilacunar. El modelo propuesto sería el siguiente: los fragmentos ASARM derivados del MEPE reducirían el contenido mineral local en la zona perilacunar mientras que la DMP1 haría lo opuesto, sería un regulador positivo de la mineralización en el mismo sitio⁽⁶²⁻⁶⁴⁾.

El ratón null para *Dmp1* provee un buen modelo para entender cómo estos genes y sus productos están asociados al proceso de mineralización. DMP1 es una proteína ácida rica en serinas, que tiene numerosos sitios potenciales de fosforilación que promueven la formación de mineral en las superficies perilacunares^(65,66). La proteína completa de DMP1 es susceptible de clivaje proteolítico resultando en la generación de fragmentos específicos N-terminales y C-terminales. A pesar de ello, las funciones biológicas de la molécula intacta versus los fragmentos todavía no es clara. Si bien está establecido en estos ratones que DMP1 no es esencial para la mineralización, en el desarrollo temprano⁽⁷⁾, los ratones muestran notables defectos en la morfología osteocítica, el remodelado óseo y la mineralización durante el desarrollo posnatal cuando el esqueleto soporta carga mecánica^(63-65,66). Estos estudios han confirmado que la pérdida del DMP1 resulta en profundos cambios tanto la estructura del osteocito, como en la mineralización ósea total⁽⁶⁷⁻⁷¹⁾ y están en acuerdo con estudios previos en animales adultos del tipo silvestre, donde la expresión de DMP1 por el osteocito se induce en forma marcada, en respuesta a la carga mecánica inducida por la remodelación ósea^(72,73). Tomados en conjunto,

los datos emergentes sugieren que las proteínas SIBLINGs controlan el grado de mineralización en la interfase de las superficies óseas que revisten el espacio lacuno-canalicular. Una hipótesis posterior sugiere que el grado de mineralización dicta la flexibilidad del osteocito, alterando a la inducción mecánica y como transmite señales que regulan la remodelación activa de la superficie ósea. La esclerostina es una proteína reguladora de la formación ósea que está expresada “in vivo” en los osteocitos sumergidos en el mineral óseo. Recientemente, se evaluó la hipótesis de que la esclerostina podía regular la conducta de las células activamente comprometidas en la mineralización del hueso maduro, los preosteocitos⁽⁷⁴⁾. Cultivos primarios de osteoblastos humanos que fueron expuestos a esclerostina recombinante humana (rhSCL) por 35 días, mostraron una inhibición dosis- y tiempo-dependiente de la mineralización “in vitro”, siendo los cultivos más tardíos los más respondedores en términos de mineralización y expresión génica. El tratamiento de los cultivos avanzados con rhSCL aumentó en forma marcada la expresión del marcador preosteocítico E11 y disminuyó la expresión de los marcadores maduros, DMP1 y SOST. En forma concomitante, la expresión de MEPE se incrementó por la administración de rhSCL tanto a nivel del mRNA como de la proteína, mientras que el PHEX disminuyó, implicando una regulación a través del eje MEPE-ASARM. Estos autores confirmaron que la mineralización por osteoblastos humanos es exquisitamente sensible a péptidos ASARM trifosforilados. La inmunomarcación reveló que la rhSCL incrementó los niveles endógenos de MEPE-ASARM. La neutralización mediada por anticuerpos de los MEPE-ASARM endógenos antagonizaron en forma notable el efecto de la rhSCL sobre la mineralización, como hizo el péptido sintético PHEX, SPR4. Finalmente, encontraron que la expresión elevada del ARNm del Sost en los huesos largos de ratones HYP, sugieren que la esclerostina puede conducir los niveles incrementados de péptidos MEPE-ASARM y producir los defectos de mineralización que se observan en este genotipo. Por lo tanto estos resultados sugieren que la esclerostina actuaría a través del eje PHEX/MEPE a nivel de la etapa preosteocito y sería un regulador principal de la mineralización ósea fisiológica, consistente con su localización “in vivo” y su rol establecido en la inhibición de la formación ósea.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Boskey AL.** Biomineralization: Conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem*, 30/31 Suppl 83-91,1998.
2. **Anderson HC.** Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Rel Res* 314: 266-280,1995.
3. **Kirsch T.** Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 18:174-180,2006.
4. **Wuthier RE.** Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim Biophys Acta* 409:128-134,1975.
5. **Balcerzak M, Hamade E, Zhang L y col.** The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Bichim Pol* 50: 1019-1038,2003.
6. **Anderson HC.** The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Curr Opin Orthop* 18:428-433,2007.
7. **Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah H-D.** The roles of annexins and type II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275:35577-35583,2000.
8. **Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, Caverzasio J** A novel in vitro culture system for the analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone* 27:69-74,2000.
9. **Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE.** Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization *Mol Cell Biol* 27:4465-4474,2007.
10. **Houston B, Stewart AJ, Farquharson C.** PHOSPHO1- a novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralization in bone and cartilage. *Bone* 34:629-637,2004.
11. **Roberts SJ, Stewart AJ, Sadler PJ, Farquharson C.** Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoetanolamina and phosphatidilcoline phosphatase activities. *Biochem J* 382:59-65,2004.
12. **Anderson HC.** Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol*. 41:59-72,1969.
13. **Ali SY, Sajdera SW, Anderson HC.** Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:1513-1520,1970.
13. **Akisaka T, Gay CV.** The plasma membrane and matrix vesicles of mouse growth plate chondrocytes during differentiation as revealed in freeze-fracture replicas. *Am J Anat* 173:269-286,1985.
14. **Moss DW, Eaton RH, Smith JK, Whitby LG.** Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem J*. 102:53-57,1967.
15. **Majeska RJ, Wuthier RE.** Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta*. 391:51-60,1975.
16. **Meyer JL.** Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophos-

- phatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 231:1-8,1984.
17. **Rezende A, Pizauro J, Ciancaglini P, Leone F.** Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem J*. 301:517-522,1994.
 18. **Hessle L, Johnsson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millán JL.** Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:9445-9449,2002.
 19. **Terkeltaub R, Rosenbach M, Fong F, Goding J.** Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1. *Arthritis Rheum* 37:934-941,1994.
 20. **Johnson K, Vaingankar S, Chen Y, Moffa A, Goldring M, Sano K, Jin-Hua P, Sali A, Goding J, Terkeltaub R.** Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 42:1986-1997,1999.
 21. **Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R.** Matrix vesicle plasma membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J Bone Miner Res*. 14:883-892,1999.
 22. **Hakim FT, Cranley R, Brown KS, Eanes ED, Harne L, Oppenheim JJ.** Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy. *Arthritis Rheum* 27:1411-1420,1994.
 23. **Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM.** Role of mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289:265-269,2000.
 24. **Whyte MP.** Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Rev* 15:439-461,1994.
 25. **Whyte MP.** The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. New York: MacGraw-Hill pp 5313-5329,2001.
 26. **Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, McGregor GR.** Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet* 11:45-51,1995.
 27. **Narisawa N, Frölander N, Millán JL.** Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208:432-446,1997.
 28. **Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millán JL, MacGregor GR, Whyte MP.** Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 14:2015-2026,1999.
 29. **Terkeltaub R.** Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol* 281: C1-C11,2001.
 30. **Rutsch R, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauer P, Kalhoff H, Sano K, Boisvert WA, Superti-Furga A, Terkeltaub R.** PC-1 Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol* 158:543-554,2001.
 31. **Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Höhne W, Schauer G, Lehmann M, Roscioli T, Schnabel D, Epplen JT, Knisely A, Superti-Furga A, McGill J, Filippone M, Sinaiko AR, Vallance H, Hinrichs B, Smith W, Ferre M, Terkeltaub R, Nürnberg P.** Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* 34:379-381,2003.
 32. **Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M.** Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 41:1632-1638,1998.
 33. **Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S.** Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet* 19:271-273,1998.
 34. **Sali A, Favaloro JM, Terkeltaub R, Goding JW.** Germline deletion of the nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (NTPPPH) plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1) produces abnormal calcification of periarticular tissues. Vanduffel L, Lemmings R, editors. Maastricht: Shaker Publishing BV; Ecto-ATPases and Related Ectoenzymes pp 267-282,1999.
 35. **Johnson K, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R.** The nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase isozyme PC-1 directly promotes cartilage calcification through chondrocyte apoptosis and increased calcium precipitation by mineralizing vesicles. *J Rheumatol* 28:2681-2691,2001.
 36. **Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R.** Up-regulated expression of the phosphodiesterase nucleotide pyrophosphatase family member PC-1 is a marker and pathogenic factor for knee meniscal cartilage matrix calcification. *Arthritis Rheum* 44:1071-1081,2001.
 37. **Johnson K, Goding J, Van Etten D, Sali A, Hu SI, Farley D, Krug H, Hessle L, Millán JL, Terkeltaub R.** Linked deficiencies in extracellular inorganic pyrophosphate (P_i) and osteopontin expression mediate pathologic ossification in PC-1 null mice. *J Bone Miner Res* 18:994-1004,2003.
 38. **Nürnberg P, Theile H, Chandler D, Höhne W, Cunningham ML, Ritter H, Leschik G, Uhlmann K, Mischung C, Harrop K, Goldblatt J, Borochowitz ZU, Kotzot D, Westermann F, Mundlos S, Braun HS, Laing N, Tinschert S.** Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. *Nat Genet* 28:37-41,2001.
 39. **Miao D, Bai X, Panda D, McKee M, Karaplis A, Goltzman D.** Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with

- altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology*. 142(2):926-39,2001.
40. **Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, Nesbitt T, Drezner MK, Quarles LD.** Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 1): E700-8.
 41. **Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE.** Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 38(11):1310-5,2006.
 42. **Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD, Mundy GR** MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone* 34(2):303-19,2004.
 43. **Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD.** MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23(10):1638-49,2008.
 44. **Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD.** MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23(10):1638-49,2008.
 45. **Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge AM, Rowe PS.** Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology* 149(4):1757-72,2008.
 46. **Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, y col.** Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 41(11):1199-206,2009.
 47. **Liu S, Brown TA, Zhou J, Xiao ZS, Awad H, Guilak F, Quarles LD.** Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1645-53,2005.
 48. **Boskey AL, Chiang P, Fermanis A, Brown J, Taleb H, David V, Rowe PS.** MEPE's diverse effects on mineralization. *Calcif Tissue Int* 86(1):42-6,2010.
 49. **Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL** Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*. 164(4):1199-209,2004.
 50. **Berendsen AD, Smit TH, Schoenmaker T, y col.** Inorganic phosphate stimulates DMP1 expression in human periodontal ligament fibroblasts embedded in three-dimensional collagen gels. *Cells Tissues Organs* 192: 116-124,2010.
 51. **Beck GR Jr, Sullivan EC, Moran E, Zerler B.** Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 68: 269-280,1998.
 52. **Beck GR Jr, Zerler B, Moran E.** Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8352-8357,2000.
 53. **Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE.** Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 27:4465-4474,2007.
 54. **Chang SH, Yu KN, Lee YS, y col.** Elevated inorganic phosphate stimulates Akt-ERK1/2-Mnk1 signaling in human lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 528-539,2006.
 55. **Goseki-Sone M, Yamada A, Hamatani R, Mizoi L, Iimura T, Ezawa I.** Phosphate depletion enhances bone morphogenetic protein-4 gene expression in a cultured mouse marrow stromal cell line ST2. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 395-399,2002.
 56. **Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, y col.** Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na(1)/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone* 47: 938-947,2010.
 57. **Beck GR Jr, Knecht N.** Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278: 41921-41929,2003.
 58. **Julien M, Magne D, Masson M, y col.** Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology* 148: 530-537,2007.
 59. **Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, y col.** Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 278:1998-2007,2003.
 60. **Addison WN, Nakano Y, Loisel T, y col.** MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23:1638-1649,2008.
 61. **Rowe PS, Garrett IR, Schwarz PM, y col.** Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). *Bone* 36:33-46,2005.
 62. **Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, y col.** Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 283:5866-5875,2008.
 63. **Yang W, Lu Y, Kalajzic I, y col.** Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 280:20680-20690,2005.
 64. **Harris SE, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, y col.** DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7:313-315,2007.
 65. **Qin C, Brunn JC, Cook RG, y col.** Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem* 278:34700-34708,2003.
 66. **Qin C, D'Souza R, Feng JQ.** Dentin matrix protein

- 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res* 86: 1134-1141,2007.
67. **Feng JQ, Ward LM, Liu S, y col.** Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 38: 1310-1315,2006.
68. **Rios HF, Ye L, Dusevich V, y col.** DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5:325-327,2005.
69. **Ling Y, Rios HF, Myers ER, y col.** DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res* 20: 2169-2177,2005.
70. **Ye L, Mishina Y, Chen D, y col.** Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem* 280:6197-6203,2005.
71. **Ye L, Zhang S, Ke H, y col.** Periodontal breakdown in the Dmp1 null mouse model of hypophosphatemic rickets. *J Dent Res* 87: 624-629,2008.
72. **Yang W, Kalajzic I, Lu Y, y col.** In vitro and in vivo study on osteocyte-specific mechanical signaling pathways. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4: 386-387,2004.
73. **Yang W, Lu Y, Kalajzic I, y col.** Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 280: 20680-20690,2005.
74. **Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, Zelenchuk L, Evdokiou A, Findlay DM.** Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/pre-osteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM dependent mechanism. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb 1. doi: 10.1002/jbmr.345.