

12. FISIOPATOLOGIA DEL METABOLISMO MINERALE

Up-to-date 2008

*Ferdinando Silveri, Luca Di Geso, Rita Girolimetti,
Marika Tardella*

Clinica Reumatologica, Università Politecnica delle Marche

Introduzione

Il tessuto osseo, sebbene possa sembrare inerte, risulta in realtà estremamente dinamico, consentendo allo scheletro un incessante rimodellamento tale da sostenere il carico meccanico e i continui microtraumatismi. I meccanismi di rimodellamento si realizzano nelle cosiddette BMU (*bone multicellular unit*), costituite da osteoclasti, osteoblasti e osteociti. Le cellule della BMU non sono in diretta contiguità con il midollo osseo, ma sono ricoperte dalle *lining-cell* [1]. I capillari penetrano le *lining-cell* e garantiscono una comunicazione con le cellule della BMU. Queste ultime, insieme con i capillari e le *lining-cell*, costituiscono il compartimento di rimodellamento dell'osso (CRO).

Considerata la struttura della CRO, diviene più semplice comprendere il ruolo chiave svolto dagli osteociti nel controllare il rimodellamento dell'osso, nonostante si trovino imprigionati nella matrice ossea. È noto, infatti, che gli osteociti agiscono anche come meccanocefftori, in grado di rispondere ai cambiamenti del microambiente ormonale (per esempio, carenza di estrogeni) e di innescare un rimodellamento osseo, forse per mezzo della comunicazione con le *lining-cell* [2-4]. All'interno della BMU le cellule pre-osteoblastiche, che esprimono il RANKL, probabilmente controllano la differenziazione degli osteoclasti dai progenitori emopoietici [5]; d'altro canto il completamento della fase di riassorbimento osseo è seguito da una fase di neoformazione controllata in parte da citochine prodotte dagli osteoclasti, che stimolano la differenziazione e l'attività degli osteoblasti attraverso un meccanismo d'azione paracrina. Nel contesto di questa attività orchestrata all'interno della BMU, ci sono quindi cellule (gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti, e forse le cellule endoteliali dei vasi ematici) che sono il bersaglio di una serie di agenti farmacologici in grado d'incrementare la massa ossea [6].

Differenziazione degli osteoblasti

Molti fattori di secrezione paracrina, autocrina ed endocrina influenzano lo sviluppo e la maturazione dell'osteoblasto. Tra questi vi sono alcune proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), PTH, FGF, IGF, endotelina-1 e agonisti delle prostaglandine [7-10].

Gli osteoblasti, cellule mesenchimali derivate dal mesoderma, una volta differenziati producono molecole essenziali per la formazione della matrice minerale e per il supporto dell'emopoiesi e dell'angiogenesi. L'espressione sequenziale di questi "mediatori" facilita la differenziazione delle cellule progenitrici in pre-osteoblasti proliferanti e quindi in osteoblasti, che producono matrice ossea, ed eventualmente in osteociti o *lining-cell*. Il fattore di trascrizione 2 Runt-correlato (Runx2), che è il più precoce marcatore della linea cellulare osteoblastica, regola la proliferazione cellulare, integra numerose vie di segnale e controlla l'espressione di molti geni, quali l'osteocalcina, il VEGF (*vascular endothelial growth factor*), il RANKL, la sclerostina e la proteina-1 della matrice (DMP1), che consentono la maturazione degli osteoblasti [11,12]. Osterix è un altro fattore di trascrizione essenziale per la formazione di pre-osteoblasti da progenitori multipotenti [13]; esso agisce a valle di Runx2 [14], ma ostacola la differenziazione degli osteoblasti e inibisce anche l'espressione di VEGF conseguente all'esposizione a endotelina-1 [15]. Durante le fasi di maturazione osteoblastica e di formazione della matrice, la mineralizzazione ossea è garantita dalla simultanea espressione di fosfatasi alcalina e collagene di tipo I [16]. Gli osteoblasti maturi, quindi, producono osteocalcina, RANKL e il recettore per il PTH (PTHr1) che, tra l'altro, regola sia la formazione dell'osso sia il suo riassorbimento. Quando gli osteoblasti vengono fissati all'interno della matrice ossea, si trasformano in osteociti e iniziano a esprimere numerose molecole, tra cui DMP1 e sclerostina, che controllano la formazione dell'osso e il metabolismo del fosfato [17].

Wnt e differenziazione osteoblastica

Le Wnt sono glicoproteine di secrezione cruciali per lo sviluppo e il rinnovamento di molti tessuti, incluso il tessuto osseo. Esse stimolano numerose vie di segnale attraverso il legame di un complesso recettoriale, formato dalla proteina 5 correlata con il recettore dell'LDL (LRP5) o da LRP6 e da una delle 10 molecole Frizzled (Fz) [18]. La via di segnale Wnt più studiata negli osteoblasti è quella della *canonical Wnt*, che coinvolge la stabilizzazione della β -catenina e la regolazione di molteplici fattori di trascrizione (Lef1, Tcf7, Tcf7L1 e Tcf7L2). Questa via è attivata in tutte le cellule della linea osteoblastica, inclusi i pre-osteoblasti, le *lining-cell* e gli osteociti. In particolare, la via della Wnt/ β -catenina rappresenta una risposta fisiologica al carico meccanico [19] e partecipa ai processi di "guarigione" delle fratture [20]. Il segnale Wnt svolge tre funzioni principali sulle cellule della linea osteoblastica:

- determinare la differenziazione da osteo/condroprogenitori
- stimolare la proliferazione osteoblastica
- aumentare la sopravvivenza degli osteoblasti e degli osteociti.

All'interno della BMU, la Wnt stimola la maturazione degli osteoclasti attraverso la regolazione dei livelli di RANKL negli osteoblasti [21].

Il ruolo cruciale della via della *canonical Wnt* nelle cellule dell'osso è emerso da studi che dimostrano come la perdita di funzione del gene che codifica per LRP5 determina una riduzione della massa ossea e viceversa [22-25]. La via di segnale

della *canonical Wnt* facilita la differenziazione osteoblastica da progenitori mesenchimali a scapito dell'adipogenesi, con conseguente incremento della densità minerale ossea. Numerosi studi mostrano, inoltre, che questa via di segnale partecipa alla trascrizione di fattori Runx2 e Osterix, stimolando la maturazione degli osteoblasti [26-30]. È evidente, quindi, che diversi meccanismi intervengono nel controllo dell'omeostasi ossea. La β -catenina, per esempio, incrementa la massa ossea inducendo l'espressione genica per l'osteoprotegerina (OPG), e quindi inibendo la maturazione osteoclastica [26,30]. L'incremento della LRP5 o la somministrazione di Wnt3a aumentano la proliferazione dei pre-osteoblasti e prevengono l'apoptosi degli osteoblasti e degli osteociti senza agire sugli osteoclasti [24-31]. Quindi l'attivazione delle vie di segnale della Wnt, per mezzo del legame delle proteine Wnt ai loro recettori, ne innesca altre, differenti da quelle che coinvolgono la β -catenina [31] la quale, a sua volta, partecipa ad altre vie di segnale, indotte dai recettori tirosina-chinasi attivati e dai recettori nucleari ormonali [32].

Ulteriori studi sono necessari per riconoscere i complessi ruoli che le singole Wnt hanno entro la BMU e per determinare in che misura la β -catenina possa essere utilizzata come surrogato per misurare l'attività Wnt. La via di segnale della Wnt si propone come potenziale bersaglio in terapie orientate a incrementare la massa ossea. Il limite è rappresentato dalla difficoltà e dal costo elevato della purificazione delle molecole, per cui al momento il suo utilizzo nella terapia dell'osteoporosi appare poco praticabile. Le possibili alternative sono:

- inibire gli antagonisti della Wnt (Dkk1, sclerostina e Sfrp1) con anticorpi neutralizzanti
- inibire la *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β), che determina la fosforilazione della β -catenina e ne promuove la degradazione.

Quest'ultimo approccio è stato realizzato nei topi, dove la somministrazione di molecole a basso peso molecolare, che inibiscono la GSK3 β , si è dimostrata in grado di:

- prevenire la perdita di massa ossea causata dall'età, dal deficit di estrogeni e dalle mutazioni di LRP5 [33]
- incrementare la sensibilità degli osteoblasti e degli osteociti al carico meccanico
- accelerare la "guarigione" delle fratture [21].

Appare necessaria un'attenta valutazione degli effetti a lungo termine degli inibitori della GSK3 β e degli agonisti della via di segnale della Wnt, prima di un loro utilizzo clinico come agenti anabolizzanti [34,35].

L'altro approccio terapeutico si basa sulla possibilità di neutralizzare, mediante anticorpi monoclonali umanizzati, gli antagonisti della via della *canonical Wnt*, che può essere inibita a livello extracellulare dal sequestro sia del ligando sia del recettore. Il Dkk1 e la sclerostina inibiscono la via di segnale della Wnt attraverso la dissociazione di LRP5 da Fz e Wnt. La Sfrp, invece, lega la Wnt e ne previene l'associazione con il complesso LRP5/Fz. I livelli sierici del Dkk1 (inversamente proporzionali alla massa ossea nel topo) sono un marcatore biochimico dell'osteolisi associata al mieloma multiplo nell'uomo, così come i livelli di Sfrp1 sono inversamente correlati alla formazione di tessuto osseo, con una modulazione da parte degli ormoni sessuali [36,37]. Gli anticorpi che neutralizzano il

Dkk1 sono stati sperimentati in diversi studi, mentre gli anticorpi che neutralizzano la Sfrp1 non sono stati ancora descritti. Diarra e coll. hanno rilevato, in un modello murino di artrite reumatoide, la riduzione delle lesioni a carattere erosivo in seguito alla somministrazione di anticorpi anti-Dkk1, con un aumento del numero degli osteoblasti, della neoformazione ossea, dell'espressione di OPG e della riduzione degli osteoclasti [38]. È interessante notare che gli animali trattati con anticorpi anti-Dkk1 sviluppavano osteofiti, convertendo il quadro in un modello di osteoartrite. Tale elemento suggerisce, inoltre, un possibile ruolo del Dkk1 nel prevenire l'osteoartrite. In un altro studio con un modello murino di mieloma multiplo, la somministrazione di un anticorpo anti-Dkk1 promuoveva la neoformazione ossea a livello sia del femore colpito dalle lesioni mielomatose sia del femore sano [39]. Gli anticorpi anti-Dkk1 riducono il numero di osteoblasti che esprimono la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP) e incrementano il numero di osteoblasti che producono osteocalcina.

Sebbene quindi gli anticorpi specifici per il Dkk1 possano promuovere la formazione di tessuto osseo, esistono alcuni timori riguardo la potenza e il profilo di sicurezza, poiché in molte neoplasie si osserva un'attivazione della via di segnale Wnt. Non si può quindi escludere che tale approccio si associ con un incremento rischio di sviluppare tumori, anche se ciò appare altamente improbabile.

La funzione osteocitaria

La sclerostina, secreta esclusivamente dagli osteociti, rientra tra i bersagli di terapie biologiche volte a incrementare la massa ossea. Essa è il prodotto del gene SOST, che risulta mutato e/o inibito in soggetti affetti da sclerosteosi e da malattia di van Buchem, patologie caratterizzate da un'elevata massa ossea [40]. La produzione di sclerostina è ridotta in risposta al carico meccanico e alla secrezione intermittente di PTH. La sua principale azione è quella di inibire l'attività degli osteoblasti, e quindi la neoformazione ossea, sequestrando LRP5 e LRP6 e dunque inibendo la via di segnale Wnt. È interessante notare che una mutazione di LRP5 che inibisce il legame della sclerostina con la LRP5 è associata a un'elevata BMD (anche nell'uomo).

La sclerostina lega anche le BMP, ma con bassa affinità, senza interessare direttamente i geni bersaglio delle BMP2 negli osteoblasti. Sembra, quindi, bloccare indirettamente la formazione di osso BMP-indotta attraverso l'inibizione delle vie di segnale Wnt. Studi preliminari con anticorpi monoclonali sclerostina-specifici hanno mostrato attività anabolizzante sull'osso in modelli animali e donne in post-menopausa, offrendo, in prospettiva futura, un possibile approccio anabolizzante sull'osso [41,42].

L'interazione osteoblasto-osteoclasto

Nella maggior parte dei casi l'osso riassorbito è sostituito da osso neoformato. È noto che gli osteoblasti modulano la differenziazione osteoclastica attraverso la presentazione di membrana di RANKL, M-CSF e OPG. In molte circostanze la

soppressione dell'OPG, generalmente associata con l'aumentata espressione di M-CSF e di RANKL, incrementa il riassorbimento osseo [43,44].

All'interno della matrice dell'osso vi sono numerosi fattori di crescita in grado di promuoverne la formazione, come TGF- β , IGF-I e IGF-II [45,46]. Poiché il riassorbimento osseo, osteoclasto-mediato, rilascia IGF e TGF- β dall'osso, si è ipotizzato che questi ultimi abbiano un ruolo nell'interazione tra riassorbimento e conseguente neoformazione dell'osso, sebbene non ci sia nessuna evidenza diretta di ciò. In modelli murini dove l'osteoclastogenesi era presente, ma non era capace di determinare il riassorbimento dell'osso (topi *knock-out* per il canale cloro-7 o per c-*Src*) [47-49], non si osservava alcun difetto di formazione dell'osso. Allo stesso modo nell'uomo, in presenza di inattivazione di uno dei geni che codificano per il canale cloro-7, gli osteoclasti sono presenti senza l'inibizione del riassorbimento dell'osso né la riduzione della neoformazione dell'osso. Questo dato entra in forte contrasto con i modelli murini con difetto di osteoclastogenesi (topi *knock-out* per c-*fos* o M-CSF), che non posseggono osteoclasti e che presentano anche un difetto di formazione dell'osso. Quindi la presenza di osteoclasti sembra essere necessaria per la normale formazione di tessuto osseo, indipendentemente dall'azione riassorbitiva [50-52].

Recentemente alcuni Autori hanno descritto la presenza di un segnale bidirezionale, mediato dalle proteine transmembrana eprinaB2 e recettore EPH B4 (EphB4), espresse rispettivamente sugli osteoclasti e sugli osteoblasti [53]. Il conflitto di queste molecole stimola la differenziazione degli osteoblasti e la formazione degli osteoclasti. L'eprinaB2 dell'osteoclasto sembra stimolare la differenziazione dell'osteoblasto attraverso il legame dell'EphB4 sulle cellule osteoprogenitrici, promuovendo la formazione di tessuto osseo. D'altro canto l'EphB4, sulle cellule osteoblastiche, riduce la differenziazione degli osteoclasti. Queste interazioni, che probabilmente si realizzano nella CRO, richiedono un contatto diretto della linea osteoblastica con pre-osteoclasti e osteoclasti maturi. Tale vicinanza è già stata dimostrata dalla scoperta che il RANKL, legato alla membrana e alla M-CSF sulle cellule della linea osteoblastica, promuove la differenziazione degli osteoclasti [54,55].

Ryu e coll. hanno dimostrato che la sfingosina 1-fosfato (S1P), prodotta dagli osteoclasti, stimola la migrazione e la sopravvivenza degli osteoblasti. Quindi gli osteoclasti potrebbero reclutare gli osteoprogenitori a livello dei siti di riassorbimento dell'osso, per mezzo della secrezione di S1P, e stimolare la differenziazione osteoblastica attraverso la stimolazione del segnale EphB4. D'altro canto, il segnale osteoblasto-mediato, attraverso il legame Eph4 alla eprinaB2 sui precursori degli osteoclasti, potrebbe reprimere la differenziazione degli osteoclasti, inibendo la fase di riassorbimento dell'osso e attivando quella di neoformazione [56].

Il paratormone (PTH)

È assodato che l'esposizione intermittente dell'osso al PTH incrementa la formazione della massa ossea nell'uomo, in contrasto con quanto avviene a seguito di una esposizione continua [57], come nell'iperparatiroidismo primitivo. Anche se

il PTH (teriparatide o paratormone 1-84) è ampiamente utilizzato nella terapia dell'osteoporosi, il meccanismo d'azione resta oggetto di ricerca. Il PTH probabilmente agisce su osteoblasti, *bone lining-cell*, osteociti e osteoclasti e su multiple vie che insieme stimolano la neoformazione del tessuto osseo. In analisi su tessuto osseo di ratti trattati con PTH, è emerso come un ampio numero di geni (circa 1000) era modulato da tale ormone. Essi includono i geni coinvolti nella via di segnalazione Wnt (Wnt4 e Sfrp4), fattori di trascrizione (modulatori di elementi di risposta cAMP, CREM), fattori di crescita (ampiregulina, AREG) e chemochine (CCL2, anche nota come MCP-1) [58].

Come dimostrato da Jilka e coll. [59], il trattamento intermittente con PTH nei topi inibisce l'apoptosi degli osteoblasti, incrementandone il numero e promuovendo la neoformazione di tessuto osseo. Tuttavia l'inibizione dell'apoptosi da parte del PTH nell'uomo deve ancora essere confermata [60]. Studi su colture di cellule osteoblastiche hanno mostrato che il PTH attiva rapidamente le vie di segnale anti-apoptotiche che coinvolgono l'attivazione cAMP-mediata di PKA, la sua conseguente fosforilazione e l'inattivazione dell'antagonista della proteina pro-apoptotica BCL2 (Bad), come anche l'incrementata espressione di geni della sopravvivenza (Bcl-2). Il PTH sembra, inoltre, diminuire la proliferazione osteoblastica promuovendone la differenziazione; tali effetti potrebbero essere dovuti alla ridotta espressione della ciclina D1 e all'espressione di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti [61,62]. Nello stesso tempo, il PTH incrementa transitoriamente i livelli e l'attività della Runx2; questi dati supportano il ruolo della via di segnale Wnt LRP5-mediata nel determinare almeno parte dell'effetto anabolizzante del PTH.

Alcune azioni del PTH sulle cellule osteoblastiche potrebbero essere dovute all'aumentata produzione di IGF-I e IGF-2 dotati di effetti autocrino/paracrini [63,64]. È possibile, inoltre, che il PTH possa attivare le *bone lining-cell* quiescenti sulla superficie dell'osso in modo da spiegare il precoce incremento di neoformazione di tessuto osseo in seguito a terapia con PTH [65]. A differenza degli effetti che si realizzano sulle cellule osteoblastiche differenziate, il PTH non sembra influenzare la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici non commissionate, forse per il fatto che il recettore del PTH è espresso soltanto una volta che le cellule sono differenziate per la linea osteoblastica [66]. Il PTH sarebbe, infatti, in grado di determinare una riduzione transitoria dei livelli di mRNA che codifica per la sclerostina negli osteociti, tale da condurre a un incremento del segnale Wnt nel microambiente locale, possibile meccanismo attraverso cui il PTH determinerebbe lo sviluppo dell'osteoblasto agendo sull'osteocita [67].

I bisfosfonati

Esistono diverse evidenze a sostegno dell'azione dei bisfosfonati, oltre che a livello degli osteoclasti, sugli osteoblasti/osteociti con differenti meccanismi [68]. A conferma di ciò, è noto che l'effetto anti-apoptotico dei bisfosfonati sulla linea cellulare osteoblastica si realizza a concentrazioni molto inferiori a quelle neces-

sarie per indurre l'apoptosi degli osteoclasti (più basse di circa tre ordini di grandezza: 10^{-8} - 10^{-9} M il primo, 10^{-5} - 10^{-4} il secondo) [69-73]. Esistono, inoltre, molecole come l'aminoolpadronato (IG9402), inattive sugli osteoclasti ma capaci di accentuare la sopravvivenza degli osteoblasti e degli osteociti [70,73]. Sebbene i bisfosfonati non aminati e gli aminobisfosfonati riconoscano meccanismi d'azione differenti (rispettivamente a livello della sintesi di ATP e della via del mevalonato), condividono l'effetto anti-apoptotico esercitato sugli osteoblasti e sugli osteociti attraverso una via indipendente dalla loro capacità di inibire gli osteoclasti [74]. Nello specifico, i bisfosfonati causano la transitoria apertura di emicanali non giunzionali Cx-43, determinandone un cambiamento conformazionale e la conseguente attivazione della Src. A sua volta, un'augmentata attività della chinasi Src determina l'attivazione di una cascata di chinasi attivate da mitogeni che culmina della fosforilazione di ERK (*extracellular signal-regulated*) e conseguente sopravvivenza cellulare [75].

Sebbene quindi l'efficacia dei bisfosfonati nelle malattie metaboliche dello scheletro sia per lo più attribuita all'inibizione del riassorbimento del tessuto osseo attraverso la capacità di indurre apoptosi degli osteoclasti, questi farmaci si sono dimostrati efficaci anche in condizioni in cui il riassorbimento degli osteoclasti appare normale, come per esempio l'osteoporosi idiopatica giovanile [76]. Si ricorda, inoltre, come i bisfosfonati prevengano le fratture nell'osteoporosi da glucocorticoidi, nonostante l'effetto pro-apoptotico dei bisfosfonati sugli osteoclasti sia antagonizzato dagli steroidi [77]. È importante infine osservare che la somministrazione a lungo termine di bisfosfonati incrementa lo spessore trabecolare, un indice di focale incremento del numero e/o dell'attività degli osteoblasti, dando luogo a un maggiore riempimento delle cavità di riassorbimento [78-81].

In conclusione, esiste un numero sempre maggiore di evidenze del ruolo non trascurabile che i bisfosfonati svolgono nel prolungare la sopravvivenza degli osteoblasti e degli osteociti.

Bibliografia

1. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF et al (2001) Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 16:1575-1582
2. Everts V, Delaissé JM, Korper W et al (2002) The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17:77-90
3. Bonewald LF (2007) Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab* 5:410-411
4. Parfitt AM (2000) The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* 26:319-323
5. Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S (2007) Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res* 22:1-6
6. Wang Y, Wan C, Deng L et al (2007) The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117:1616-1626
7. Iwaniec UT, Moore K, Rivera MF et al (2007) A comparative study of the bone-restorative efficacy of anabolic agents in aged ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 18:351-362
8. Li M, Ke HZ, Qi H et al (2003) A novel, non-prostanoid EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist stimulates local bone formation and enhances fracture healing. *J Bone Miner Res* 18:2033-2042
9. Qin L, Qiu P, Wang L et al (2003) Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem* 278:19723-19731
10. Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L et al (2005) Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem* 95:403-418

11. Otto F, Lubbert M, Stock M (2003) Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 89:9-18
12. Lian JB, Stein GS, Javed A et al (2006) Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7:1-16
13. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G et al (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29
14. Qu G, von Schroeder HP (2006) Role of osterix in endothelin-1-induced downregulation of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Bone* 38:21-29
15. Meury T, Verrier S, Alini M (2006) Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 98:992-1006
16. Murshed M, Harmey D, Millán JL et al (2005) Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 19:1093-1104
17. Bonewald L (2006) Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:331-333
18. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341:19-39
19. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ et al (2006) Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 281:31720-31728
20. Chen Y, Whetstone HC, Lin AC et al (2007) Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 4:1216-1229
21. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL et al (2006) Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 119:1283-1296
22. Gong Y, Slee RB, Fukai N et al (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513-523
23. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG et al (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70:11-19
24. Kato M, Patel MS, Levasseur R et al (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303-314
25. Babij P, Zhao W, Small C et al (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 18:960-974
26. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD et al (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751-764
27. Hill TP, Später D, Taketo MM et al (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8:727-738
28. Hu H, Hilton MJ, Tu X et al (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132:49-60
29. Day TE, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*;8:739-750
30. Rodda SJ, McMahon AP (2006) Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133:3231-3244
31. Almeida M, Han L, Bellido T et al (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280:41342-41351
32. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991) A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254:1359-1361
33. Clément-Lacroix P, Ai M, Morvan F et al (2005) Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17406-17411
34. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2005) Reduced relative risk of fractures among users of lithium. *Calcif Tissue Int* 77:1-8
35. Wilting I, de Vries F, Thio BM et al (2007) Lithium use and the risk of fractures. *Bone* 40:1252-1258
36. MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM et al (2007) Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone* 41:331-339
37. Tian E, Zhan F, Walker R et al (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349:2483-2494
38. Diarra D, Stolina M, Polzer K et al (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 13:156-163
39. Yaccoby S, Ling W, Zhan F et al (2007) Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* 109:2106-2111
40. Li X, Liu P, Liu W et al (2005) Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 37:945-952

41. Ominsky MS, Warmington KS, Asuncion FJ et al (2006) Sclerostin monoclonal antibody treatment increases bone strength in aged osteopenic ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 21[Suppl.]:44
42. Padhi D, Stouch B, Jang G et al (2007) Anti-sclerostin antibody increases markers of bone formation in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 22[Suppl. 1]:37
43. Suda T, Kobayashi K, Jimi E et al (2001) The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 232:235-247; discussion 247-250
44. Khosla S (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142:5050-5055
45. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF (2002) Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 277:21352-21360
46. Linkhart TA, MacCharles DC (1992) Interleukin-1 stimulates release of insulin-like growth factor-I from neonatal mouse calvaria by a prostaglandin synthesis-dependent mechanism. *Endocrinology* 131:2297-2305
47. Marzia M, Sims NA, Voit S et al (2000) Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Cell Biol* 151:311-320
48. Kornak U, Kasper D, Bösl MR et al (2001) Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104:205-215
49. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693-702
50. Dai XM, Zong XH, Akhter MP, Stanley ER (2004) Osteoclast deficiency results in disorganized matrix, reduced mineralization, and abnormal osteoblast behavior in developing bone. *J Bone Miner Res* 19:1441-1451
51. Sakagami N, Amizuka N, Li M et al (2005) Reduced osteoblastic population and defective mineralization in osteopetrotic (op/op) mice. *Micron* 36:688-695
52. Tuukkanen J, Koivukangas A, Jämsä T et al (2000) Mineral density and bone strength are dissociated in long bones of rat osteopetrotic mutations. *J Bone Miner Res* 15:1905-1911
53. Zhao C, Irie N, Takada Y et al (2006) Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4:111-121
54. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3597-3602
55. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176
56. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ et al (2006) Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J* 25:5840-5851
57. Neer RM, Amaud CD, Zanchetta JR et al (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434-1441
58. Li X, Liu H, Qin L et al (2007) Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J Biol Chem* 282:33086-33097
59. Jilka RL (2007) Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40:1434-1446
60. Lindsay R, Zhou H, Cosman F et al (2007) Effects of a one-month treatment with PTH(1-34) on bone formation on cancellous, endocortical, and periosteal surfaces of the human ilium. *J Bone Miner Res* 22:495-502
61. Qin L, Li X, Ko JK, Partridge NC (2005) Parathyroid hormone uses multiple mechanisms to arrest the cell cycle progression of osteoblastic cells from G1 to S phase. *J Biol Chem* 280:3104-3111
62. Datta NS, Chen C, Berry JE, McCauley LK (2005) PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J Bone Miner Res* 20:1051-1064
63. Bikle DD, Sakata T, Leary C et al (2002) Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 17:1570-1578
64. Hurley MM, Tetradis S, Huang YF et al (1999) Parathyroid hormone regulates the expression of fibroblast growth factor-2 mRNA and fibroblast growth factor receptor mRNA in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 14:776-783
65. Dobnig H, Turner RT (1995) Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136:3632-3638
66. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE et al (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47-56
67. Bellido T, Ali AA, Gubrij I et al (2005) Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 146:4577-4583

68. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T (2006) Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 39:443-452
69. Hughes DE, Wright KR, Uy HL et al (1995) Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10:1478-1487
70. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM et al (1999) Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104:1363-1374
71. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL et al (2000) Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88[12 Suppl.]:2961-2978
72. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP et al (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 13:581-589
73. Van Beek E, Löwik C, Que I, Papapoulos S (1996) Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Miner Res* 11:1492-1497
74. Rogers MJ (2004) From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 75:451-461
75. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T (2002) Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 277:8648-8657
76. Brumsen C, Hamdy NA, Papapoulos SE (1997) Long-term effects of bisphosphonates on the growing skeleton. Studies of young patients with severe osteoporosis. *Medicine (Baltimore)* 76:266-283
77. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC et al (2002) Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109:1041-1048
78. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C et al (1997) Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 100:1475-1480
79. Balena R, Toolan BC, Shea M et al (1993) The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 92:2577-2586
80. Storm T, Steiniche T, Thamsborg G, Melsen F (1993) Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 8:199-208
81. Horie D, Takahashi M, Aoki K, Ohya K (2003) Clodronate stimulates bone formation as well as inhibits bone resorption and increases bone mineral density in rats fed a low-calcium diet. *J Med Dent Sci* 50:121-132