

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Η σηματοδοτική οδός Wnt στα οστά* Οστική βιολογία και θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η σηματοδότηση Wnt έχει δειχθεί ως ένα σημαντικό ρυθμιστικό μονοπάτι στην οστεογενετική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. Επαγωγή του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt προάγει τον σχηματισμό των οστών, την οστική ανανέωση, καθώς και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, ενώ η αδρανοποίηση της οδού οδηγεί σε οστεοπενία. Επίσης, ενεργοποίηση και αδρανοποίηση των εκτροπών της κανονικής οδού σηματοδότησης Wnt στην οστεογένεση οδηγεί στη σκληροστέωση και στην οστεοπόρωση, αντίστοιχα. Η μελέτη του μηχανισμού σηματοδότησης Wnt και των αλληλεπιδράσεών του με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης στα οστά παρέχει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία των εν λόγω οστικών παθήσεων. Μολονότι η τροποποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt έχει πληθώρα θεραπευτικών δυνατοτήτων, απαιτούνται προσεκτικοί χειρισμοί λόγω του κινδύνου της ογκογένεσης. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ο ρόλος της σηματοδότησης Wnt στον οστικό μεταβολισμό, οι δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι, αλλά και οι κίνδυνοι που προκύπτουν από την παρέμβαση στη σηματοδότηση του Wnt.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το οστό και τα οστικά κύτταρα

Το οστό είναι ο συμπαγής ιστός που κινεί, υποστηρίζει και προστατεύει τα διάφορα όργανα του σώματος. Αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και κρυστάλλους φωσφορικού ασβεστίου.¹ Ο οστικός μεταβολισμός υποδιαιρείται σε δύο επί μέρους φάσεις: Στη διαμόρφωση (modeling), η οποία λαμβάνει χώρα στην ανάπτυξη, και στην αναδιαμόρφωση (remodeling) που συνοδεύει την ανανέωση του οστού. Η αναδιαμόρφωση του οστού στον άνθρωπο είναι μια διάβιου διαδικασία, όπου ώριμος οστίτης ιστός απομακρύνεται από τον σκελετό και αντικαθίσταται με νέο οστίτη ιστό. Η ανάπτυξη των οστών περιλαμβάνει δύο στάδια: την ενδομεμβρανώδη (intramembranous) οστεοποίηση και την ενδοχόνδρια (endochondral) οστεοποίηση. Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση συμβαίνει κατά τη διαμόρφωση

των πλατιών οστών, αρχίζει με τη συγχώνευση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων και καταλήγει στη διαφοροποίησή τους σε προδρομικά οστικά κύτταρα και, τελικά, σε ώριμους οστεοβλάστες. Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση λαμβάνει χώρα στα μακρά οστά και η μετάβαση από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα στους οστεοβλάστες περιλαμβάνει το στάδιο του χόνδρου.²

Οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες είναι οι δύο βασικές μορφές οστικών κυττάρων που συμμετέχουν στην οστική αναδιαμόρφωση. Υπάρχει ισορροπία μεταξύ της οστικής απορρόφησης από τους οστεοκλάστες και της οστικής παραγωγής από τους οστεοβλάστες.³ Πολλές σκελετικές παθήσεις, όπως η οστεοπόρωση, το πολλαπλούν μυέλωμα και οι οστικές μεταστάσεις, είναι απότοκες της διαταραχής αυτής της ισορροπίας. Επομένως, η μελέτη του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών μπορεί να συνδράμει στην

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2022, 39(4):469-481
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2022, 39(4):469-481

Α. Αδαμόπουλος,¹
Γ.Ι. Λάμπρου^{1,2}

¹Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
«Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών»,
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
²Α΄ Παιδιατρική Κλινική, Χωρέμειο
Ερευνητικό Εργαστήριο, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα

The Wnt signaling pathway
in bone metabolism: Biology
and therapeutic interventions

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Γονιδιακή ρύθμιση
Θεραπεία
Οστικός μεταβολισμός
Wnt

Υποβλήθηκε 18.6.2021
Εγκρίθηκε 10.7.2021

* Η παρούσα ανασκόπηση βασίζεται στη διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ αναρτημένης Πέργαμο.

κατανόηση της παθογένειας των συγκεκριμένων παθήσεων και να οδηγήσει στην ανακάλυψη κατάλληλων θεραπειών.

1.2. Η σηματοδοτική οδός Wnt

Καθώς η σηματοδότηση Wnt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι εκτροπές στη σηματοδότηση Wnt μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβες του οστικού σχηματισμού. Πράγματι, μελέτες ζωικών μοντέλων και ανθρώπινης παθολογίας έχουν δείξει ότι η ελαττωματική Wnt σηματοδότηση προκαλεί διάφορες οστεογενετικές διαταραχές. Τα αποτελέσματα της εν λόγω διαταραχής της Wnt σηματοδότησης όχι μόνο τονίζουν τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει αυτή στη φυσιολογία των οστών αλλά επίσης επισημαίνουν τη δυναμική της σηματοδότησης του Wnt μονοπατιού ως ενός στόχου για την ανάπτυξη των θεραπευτικών στόχων στην αγωγή διαταραχών των οστών.

Η οικογένεια Wnt συνιστά ομάδα γονιδίων που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, την κυτταρική συμπεριφορά, την προσκόλληση και την πολικότητα. Περιλαμβάνει 19 γονίδια στον άνθρωπο, 7 στην *Drosophila* και 5 στην *C. elegans*. Ο όρος "Wnt" προέρχεται από τους όρους "wingless" (άπτερο) και "int". Τα ογκογονίδια *Int* ταυτοποιήθηκαν αρχικά σε όγκους μαστού στα ποντίκια. Το 1987, ερευνητές ανακάλυψαν ότι το γονίδιο *Wingless (Wg)* της *Drosophila* και το ογκογονίδιο *Int1* των σπονδυλωτών είναι ομόλογα. Η ανακάλυψη ότι η έκτοπη έκφραση του γονιδίου *Int1* σε έμβρυα *Xenopus* επιφέρει αξονικό διπλασιασμό και γέννηση δικέφαλων βατράχων εγκαθίδρυσε, περαιτέρω, τον ρόλο των Wnt πρωτεϊνών ως σημαντικών ρυθμιστών στην εμβρυογένεση και στην ογκογένεση. Ο σύνδεσμος ανάμεσα σε Wnt πρωτεΐνες και β-κατενίνη ανακαλύφθηκε το 1990, όταν σε μια μελέτη σε *Drosophila* φάνηκε ότι το γονίδιο *Wnt/Wg* διαδραμάτισε ρυθμιστικό ρόλο στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του γονιδίου *Armadillo* της *Drosophila*. Το ομόλογο του *Armadillo* για τα σπονδυλωτά είναι η β-κατενίνη.⁴ Από τότε έχουν αναγνωρισθεί 19 ισομορφές των Wnt στον άνθρωπο (*Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt2B*, *Wnt3*, *Wnt3A*, *Wnt4*, *Wnt5A*, *Wnt5B*, *Wnt6*, *Wnt7A*, *Wnt7B*, *Wnt8A*, *Wnt8B*, *Wnt9A*, *Wnt9B*, *Wnt10A*, *Wnt10B*, *Wnt11*, *Wnt16*). Στα θηλαστικά, η πολυπλοκότητα και η ειδικότητα του μονοπατιού Wnt επιτυγχάνονται εν μέρει μέσω των συνδετών Wnt (*Wnt ligands*), των πρωτεϊνών R-spoding και της νορρίνης, ενώ οι κυτταρικοί υποδοχείς επιφέρουν ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης. Η παραγωγή και η έκκριση των συνδετών Wnt απαιτούν την τροποποίηση των λιπιδίων από τη χοίρεια ακυλτρανσφεράση (*Porcn*) και τη σύνδεση των *Wntless (Wls)*, που λειτουργεί ως συνοδός

του Wnt και διευκολύνει τη μεταφορά των τροποποιημένων Wnt λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη.⁵

Το μονοπάτι Wnt ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 σε ογκογόνους ιούς που προκαλούσαν καρκίνο του μαστού σε ποντίκια.⁶ Εκτοτε, το μονοπάτι αυτό έχει ερευνηθεί διεξοδικά και πλέον χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πλέον σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στις βιολογικές διαδικασίες. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στη βρεφική ανάπτυξη και στην ιστική ομοιοστάση στους ενήλικες, μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της πολικότητας.^{4,7} Το ενδιαφέρον για το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt αυξήθηκε όταν ανακαλύφθηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης APC (*adenomatous polyposis coli*) με τη β-κατενίνη στο σύνδρομο οικογενούς αδενωμάτωσης πολυποδίασης.^{8,9} Η ογκογόνος συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης APC και της β-κατενίνης οδήγησε στην ανακάλυψη συσχέτισης του μονοπατιού Wnt με ποικίλα νοσήματα, που κυμαίνονταν από τον καρκίνο μέχρι τις μεταβολικές και τις αναπτυξιακές διαταραχές.¹⁰

Πρόσφατα, ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στην οστική βιολογία έχει τύχει ιδιαίτερης προσοχής. Οστικά νοσήματα όπως το σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοϊώματος, η σκληροστέωση και η νόσος van Buchem έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της σηματοδοτικής οδού Wnt.¹¹ Η κατανόηση του ρόλου της σηματοδοτικής οδού στις οστικές διαταραχές όχι μόνο συνέδραμε στη διαλεύκανση της παθογένειας των νοσημάτων αυτών, αλλά οδήγησε και στην ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών σχημάτων.⁴ Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι ενδογενών ανταγωνιστών Wnt, όπως η σκληροστέωση και ο παράγοντας Dickkopf-1, έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στις κλινικές δοκιμές.¹²

1.3. Επισκόπηση της σηματοδοτικής οδού Wnt

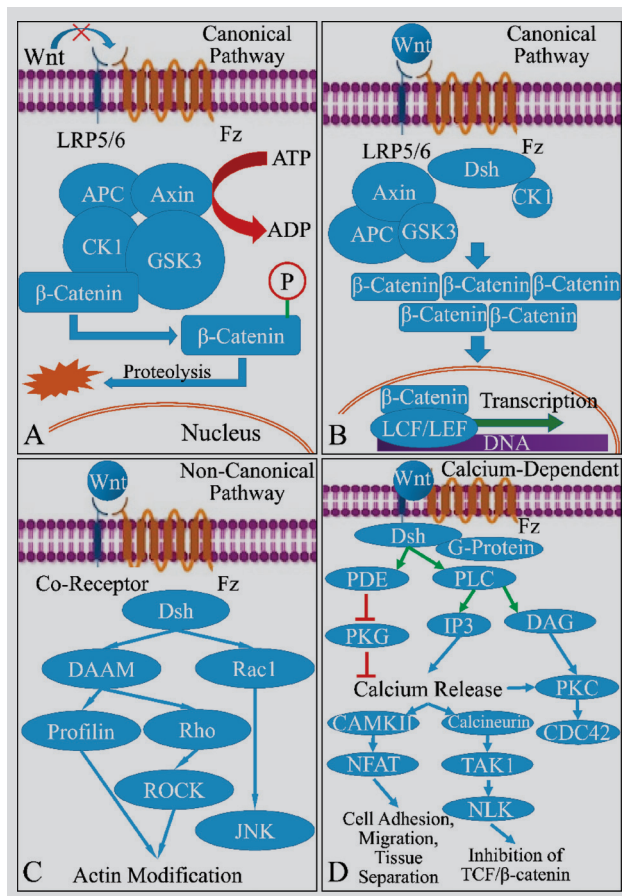
Οι συνδέτες (*ligands*) Wnt αποτελούν ομάδα από 19 εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες ενεργοποιούν κυτταρικούς υποδοχείς προκειμένου να επάγουν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση. Ο ρόλος τους είναι να παρέχουν στα κύτταρα πληροφορίες θέσης στον χώρο και να πυροδοτούν κυτταρικές αποκρίσεις εξαρτώμενες από τη συγκέντρωσή τους. Σε γενικές γραμμές, οι Wnt πρωτεΐνες εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο και προσλαμβάνονται από άλλα κύτταρα, εκτελώντας αντίστοιχες λειτουργίες. Σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι υφίστανται μεταμεταφραστική τροποποίηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, συνδεόμενες με λιπίδια, γεγονός σημαντικό για την έκκρισή τους, αλλά και τη σηματοδοτική τους δράση.¹⁰

Η σηματοδότηση Wnt μπορεί να διαιρεθεί σε δύο βασικές κατηγορίες: στην κανονική, στη μη κανονική σηματοδοτική οδό και, τέλος, στη μη κανονική σηματοδοτική οδό Wnt/ασβεστίου. Η κανονική σηματοδοτική οδός σηματοδοτεί μέσω της σταθεροποίησης της εξ αιτίας της β-κατενίνης, ενώ η μη κανονική σηματοδοτική οδός λειτουργεί ανεξάρτητα από τη β-κατενίνη. Η κανονική οδός έχει διερευνηθεί περισσότερο σχετικά με τον ρόλο της, ενώ το θεραπευτικό δυναμικό της αναφορικά με τις οστικές παθήσεις.

Η κλασική οδός. Το κεντρικό σημείο της κανονικής οδού του μονοπατιού Wnt είναι η σταθεροποίηση του μορίου της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Χωρίς την παρουσία των συνδεδώνων Wnt, η κυτταροπλασματική β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αποτελείται από την πρωτεΐνη GSK3β (glycogen synthase kinase 3β), την αξίνη (axin) και την πρωτεΐνη APC. Η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης οδηγεί στην πρωτεοσωμική αποικοδόμησή της (εικ. 1A).¹³ Εν τούτοις, όταν είναι παρόντες οι συνδέτες Wnt, όπως οι Wnt1, Wnt3A και Wnt8, συνδέονται με τους

υποδοχείς Frizzled (Fz) και κάποιον από τους συνυποδοχείς, είτε τον LRP-5 είτε τον LRP-6 (low density lipoprotein receptor protein), και προκαλείται φωσφορυλίωση της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης Disheveled (Dvl). Η φωσφορυλιωμένη Dvl παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα (εικ. 1B). Ως αποτέλεσμα, το μόριο της β-κατενίνης σταθεροποιείται και μεταναστεύει στον πυρήνα, σχηματίζοντας μεταγραφικό σύμπλεγμα με τον T-cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer-binding factor (LEF), το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, όπως *cyclin D1*, *axin2*, *c-Myc* και *PPARδ* (peroxisome proliferator-activated receptor).¹³

Η μη κλασική οδός. Η μη κανονική οδός σηματοδότησης Wnt περιλαμβάνει την ασβεστιο-εξαρτώμενη οδό (calcium-dependent pathway) και την οδό planar cell polarity (PCP) (εικόνες 1C, 1D). Η ασβεστιο-εξαρτώμενη οδός είναι σημαντική στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην κυτταρική μετανάστευση και στην εξέλιξη των καρκίνων.¹⁴ Αρχίζει από την πρόσδεση των συνδεδώνων Wnt στους υποδοχείς Fz, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης και την επαγόμενη κυτταροπλασματική απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το απελευθερωμένο ασβέστιο ενεργοποιεί ενδοκυττάριους μεσολαβητές, όπως η πρωτεϊνική κινάση C, η καλσινευρίνη και η calcium calmodulin-dependent protein kinase II, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κB και η cAMP. Το άλλο μονοπάτι της μη κανονικής οδού (planar cell polarity pathway) είναι σημαντικό για την κυτταρική πολικότητα, τη μετανάστευση και τη διαίρεση.¹⁵ Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης GTPασών, όπως η Rho, η Rac και η Cdc42 μέσω των υποδοχέων Fz και της απενεργοποίησης κινασών, όπως η c-Jun NH2 κινάση.¹³ Δεδομένων των πολλών ρόλων που διαδραματίζει η Wnt σηματοδότηση στην ανάπτυξη και στη συντήρηση βλαστικών κυττάρων, δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι η Wnt σηματοδότηση τελεί κάτω από πολύπλοκες κανονιστικές ρυθμίσεις και ο διαχωρισμός σε κανονική και μη κανονική οδό είναι κάπως υπεραπλουστευμένος. Θεωρείται ότι οι μη κανονικοί συνδέτες Wnt, όπως ο Wnt5A και ο Wnt11, δρουν μέσω της μη κανονικής οδού σηματοδότησης, ενώ οι κανονικοί συνδέτες Wnt1, Wnt3A και Wnt11 δρουν μέσω της κανονικής οδού.¹³ Εν τούτοις, η διασταυρούμενη ενεργοποίηση των δύο οδών δεν είναι ασυνήθης. Για παράδειγμα, ο Wnt5A, κλασικός μη κανονικός συνδέτης, ενεργοποιεί την κανονική οδό παρουσία των υποδοχέων Fz5, Fz4 και LRP-5. Επιπρόσθετα, υπάρχουν 19 συνδέτες Wnt, 10 υποδοχείς Fz και 2 συνυποδοχείς LRP που μετέχουν και στις δύο οδούς. Επί πλέον, οι συνδέτες Wnt μπορούν να προσδένονται σε υποδοχείς τυροσινικής κινάσης.¹⁶ Η εν λόγω πολυπλοκότητα υποδηλώνει τους πολυάριθμους δυναμικούς συνδυασμούς συνδεδώνων/υποδοχέων. Η κατανόηση της πολυπλοκότητας



Εικόνα 1. Απλοποιημένα υποδείγματα της σηματοδότησης Wnt. Παρουσιάζονται η κλασική οδός (A, B), η μη κλασική οδός (C) και η ασβεστιο-εξαρτώμενη οδός (D) (από Wikipedia, τροποποιημένο).⁹⁹

της σηματοδότησης Wnt είναι καθοριστική στη διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών που βασίζονται στο συγκεκριμένο μονοπάτι.

2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ WNT ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

2.1. Εξωκυττάριοι ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού Wnt στην οστική βιολογία

Low density lipoprotein receptor proteins (LRPs). Το πλέον αξιοσημείωτο παράδειγμα μεταβολής της Wnt σηματοδότησης που προκαλεί οστική παθολογία είναι η μετάλλαξη αδρανοποίησης του LRP5, η οποία οδηγεί σε σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος (osteoporosis-pseudoglioma syndrome, OPPG). Το σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος είναι μια αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την πρώιμη εμφάνιση οστεοπόρωσης, χαμηλή οστική πυκνότητα (bone mineral density, BMD) και τύφλωση.¹⁷ Η αδρανοποιητική (activating) μετάλλαξη του LRP5 έχει συνδεθεί με το σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος μέσα από γονιδιακές αναλύσεις και αργότερα από μελέτες σε ζώα.¹⁸ Μύες με αδρανοποιητική μετάλλαξη LRP5 έπασχαν από διαταραγμένη πύρωση καταγμάτων σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα.¹⁹ Αντίθετα, ανακαλύφθηκε παρερμηνεύσιμη (missense) μετάλλαξη του LRP5 (G171V), η οποία προκαλεί φαινότυπο υψηλής οστικής μάζας στους ανθρώπους.²⁰ Σε αντίθεση με την LRP5, δεν υπάρχει σαφώς ορισμένη οστική παθολογία που να σχετίζεται με μετάλλαξη της LRP6. Εν τούτοις, γενετικές αναλύσεις και μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι διαταραχή της LRP6 στο μονοπάτι Wnt επηρεάζει σημαντικά την οστεογενετική ανάπτυξη. Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη του γονιδίου της LRP6 προκάλεσε οστεοπόρωση σε συνδυασμό με μεταβολικό σύνδρομο σε ανθρώπους.²¹ Επιπρόσθετα, συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της LRP6 σχετίζονται σημαντικά με χαμηλή οστική μάζα.²² Σε μυσ, σιωπηλές μεταλλάξεις του γονιδίου της LRP6 προκάλεσαν νεογνικό θάνατο, σοβαρές διαταραχές του αξονικού σκελετού και ανωμαλίες των άκρων.²³ Παρομοίως, μια αυτόματη παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη του γονιδίου της LRP6 στα ποντίκια βρέθηκε επίσης να επηρεάζει την οστική ανάπτυξη και την ομοιόσταση, μέσω της διατάραξης του μονοπατιού της β-κατενίνης.²⁴

Σκληροστίνη. Οστική παθολογία μπορεί επίσης να προκύψει από τη διατάραξη των εκκρινόμενων εξωκυτταρικών ανταγωνιστών της σηματοδότησης Wnt. Η σκληροστίνη είναι ένας από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους ανταγωνιστές Wnt. Ως το προϊόν του γονιδίου *SOST*, η σκληροστίνη εκκρίνεται από οστεοκύτταρα κατά τη διάρκεια της οστικής

αναδιαμόρφωσης, συνδέεται με τις LRP5 και LRP6, αναστέλλοντας το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt κατά τον οστικό σχηματισμό.²⁵ Δύο σχετικές παθολογίες έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένες μεταλλάξεις του *SOST*: η σκληροστέωση και η νόσος van Buchem. Και οι δύο παθολογικές καταστάσεις είναι αυτοσωματικές υπολειπόμενες διαταραχές που χαρακτηρίζονται από προοδευτική ανάπτυξη των οστών, αυξημένη οστική πυκνότητα, όγκο και ισχύ. Μεταλλάξεις του γονιδίου *SOST* προκαλούν σκληροστέωση, ενώ η νόσος van Buchem σχετίζεται με μια έλλειψη 52kb στη μη κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου *SOST*.²⁶ Οι φαινότυποι των δύο νοσημάτων αναπαρήχθησαν σε *SOST* knockout ποντίκια, τα οποία εμφάνισαν υψηλή οστική πυκνότητα.²⁷ Αντίστοιχα, υπερέκφραση του γονιδίου *SOST* σε ποντίκια προκαλεί οστεοπενία.²⁸ Η ανασταλτική δράση της σκληροστίνης στο μονοπάτι Wnt μπορεί επίσης να αναπαραχθεί από συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου της LRP5. Οι μεταλλάξεις αυτές, όπως η G171V, καθιστούν την LRP5 ανίκανη να συνδεθεί με τη σκληροστίνη, καταργώντας τις ανασταλτικές δράσεις της.²⁹ Επομένως, η σκληροστίνη συνιστά έναν βασικό ενδογενή ρυθμιστή του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt στον σχηματισμό οστού και έχει άφθονο δυναμικό ως θεραπευτικό στόχο στη διαμόρφωση του Wnt μονοπατιού, είτε για την προώθηση είτε για τη μείωση του οστικού σχηματισμού.

Παράγοντας Dickkopf-1. Ο παράγοντας Dickkopf-1 (Dkk-1) είναι το πρωτότυπο μιας οικογένειας γονιδίων με τέσσερα μέλη, που πρωτοαναγνωρίστηκε το 1998. Οι πρωτεΐνες Dkk είναι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες 255–235 αμινοξέων, περιέχουν δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και συνιστούν άλλο ένα παράδειγμα εξωκυττάρων ανταγωνιστών του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Ο παράγοντας Dkk-1 σχηματίζει τριπλό σύμπλοκο με τους Krm και LRP5/LRP6 στην κυτταρική μεμβράνη, εμποδίζοντας έτσι τις LRPs να προσδεθούν σε συνδέτες Wnt.³⁰ Εκφράζεται στους οστεοβλάστες, στα οστεοκύτταρα, στο δέρμα, στον πλακούντα, στον προστάτη, στα αιμοπετάλια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοθήλιο. Η σημαντική επίδραση του Dkk-1 στην οστική ανάπτυξη και ομοιόσταση έχει γίνει εμφανής σε γενετικές έρευνες και σε μελέτες σε πειραματόζωα. Οι διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου της LRP5 που προκαλούν τον φαινότυπο υψηλής οστικής μάζας σε ανθρώπους βρέθηκαν να παρουσιάζουν αντίσταση στην ανασταλτική δράση της Dkk-1. Στα ποντίκια, μια απλή έλλειψη αλληλόμορφου στο γονίδιο του Dkk-1 προκαλεί υψηλή οστική πυκνότητα.⁷ Εν τούτοις, η υπερέκφραση του Dkk-1 σε οστεοβλάστες ποντικών προκάλεσε οστεοπενία και σκελετικές διαταραχές.³¹ Επομένως, ο παράγοντας Dkk-1 διαδραματίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην οστική ανάπτυξη και στην ομοιόσταση.

Secreted frizzled-related proteins (SFRPs). Η SFRP είναι ένας άλλος ανταγωνιστής της σηματοδότησης Wnt. Η SFRP συνδέεται άμεσα με τους Wnt συνδέτες για να αποφευχθεί η σύνδεσή τους με FzD και LRP5/6.³² Ανεπάρκεια της SFRP έχει δείξει ότι διαταράσσει την ορθή οστεογένεση σε ποντικούς. Τα SFRP-1 knockout ποντίκια έχουν υψηλό όγκο σπογγώδους οστού, καθώς και υψηλή οστική μάζα.³³ Πιο συγκεκριμένα, η διαγραφή της SFRP-1 ενίσχυσε την ενδοχόνδρια οστεοποίηση και ακόμη οδήγησε σε επιτάχυνση επούλωσης καταγμάτων σε μοντέλα ζώων.³⁴ Ο εν λόγω στόχος μπορεί ενδεχομένως να χρησιμεύσει ως ένα θεραπευτικό μοντέλο για τη βελτίωση της επούλωσης καταγμάτων σε ανθρώπους. Επί πλέον, ορισμένοι πολυμορφισμοί της SFRP3 σε ανθρώπους έχουν συσχετιστεί με οστεοαρθρίτιδα ισχίου, καθιστώντας την SFRP έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο στη θεραπεία της αρθρίτιδας.³⁵

Συνδέτες Wnt. Η υπερέκφραση ή η αδρανοποίηση των συνδετών Wnt μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχές της οστεογένεσης. Η υπερέκφραση Wnt10B σε νεογέννητα ποντίκια προκάλεσε αυξημένη οστική μάζα, ενώ η ανεπάρκεια Wnt10B οδήγησε σε ελαττωμένη οστική μάζα, κυρίως στο σπογγώδες οστό. Οι Wnt1 και Wnt10B καταστέλλουν τη λιπογένεση στα προλιποκύτταρα. Ειδικά, η Wnt10B φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή σχηματισμού οστεοβλαστών αντί λιποκυττάρων.³⁶ Η Wnt7B εκφράζεται στους οστεοβλάστες και τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η ανεπάρκεια Wnt7B οδήγησε σε ελαττωματική οστεοβλαστογένεση και σε διαταραγμένη οστική ανάπτυξη σε έμβρυα ποντικών.³⁷ Τα εν λόγω παραδείγματα ανωμαλιών της οστεογένεσης που σχετίζονται με τις διαταραχές της σηματοδότησης Wnt υποδεικνύουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους οστικών νοσημάτων.

2.2. Ενδοκυττάριοι ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού Wnt στην οστική βιολογία

Β-κατενίνη. Παρόμοια με τους εξωκυττάρους ρυθμιστές, οι ενδοκυττάριοι ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt πιθανόν να προκαλέσουν διαταραχή της οστεογένεσης. Η σταθεροποίηση και η συσσωρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην είσοδό της στον πυρήνα και στον σχηματισμό ετεροδιμερών με τους παράγοντες Lef/Tcf, ώστε να ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων-στόχων. Έτσι, η λειτουργική δραστηριότητα της β-κατενίνης επηρεάζει άμεσα την οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Η διαγραφή της β-κατενίνης στους αρχέγονους οστεοβλάστες εμπόδισε την τελική διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες και, αντίθετα, προήγαγε τον σχηματισμό χονδροκυττάρων.^{38,39} Στους ώριμους

οστεοβλάστες, η ενεργοποίησή της οδηγεί σε φαινότυπο αυξημένης οστικής μάζας.^{36,40,41} Αντίστροφα, η σταθεροποίηση της β-κατενίνης οδήγησε σε υψηλή οστική μάζα και στην πρόωρη οστεοποίηση χωρίς σχηματισμό χονδροκυττάρων.³⁹ Είναι ενδιαφέρον ότι η οστεοπενική κατάσταση που προκαλείται από την αδρανοποίηση της β-κατενίνης συνοδεύεται από ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, ενώ η σταθεροποίηση της β-κατενίνης συνδεόταν με μειωμένους οστεοκλάστες.⁴² Αυτό υποδηλώνει ότι η β-κατενίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση αμφοτέρων των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, ελέγχοντας έτσι τον συνολικό οστικό σχηματισμό.

Σύμπλεγμα Axin/GSK3B/APC. Η ανεπάρκεια του συμπλέγματος Axin/GSK3β/APC ή των Tcf/Lef-1 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διαταραχή της φυσιολογικής ανάπτυξης των οστεοβλαστών. Η αδρανοποίηση της Axin2 σε μύς αποδείχθηκε ότι προκαλεί υπερενεργοποίηση της κανονικής οδού της σηματοδότησης Wnt και ο παραγόμενος φαινότυπος περιλαμβάνει αυξημένη οστική μάζα, υπερπλασία οστεοβλαστών, αυξημένη ωρίμανση χονδροκυττάρων και κρανιοσυνοστέωση. Η GSK3β είναι μια ενδοκυττάρια κινάση σερίνης-θρεονίνης που εντοπίζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή πολυάριθμων σηματοδοτικών μονοπατιών, περιλαμβανομένων των κυτταρικών αποκρίσεων στις Wnt πρωτεΐνες και σχετίζεται με ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, από τη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου, έως τον κυτταρικό κύκλο. Παρόμοια με την Axin, η ανεπάρκεια της GSK3β στα ποντίκια προκάλεσε αυξημένη οστική παραγωγή και ενεργότητα του παράγοντα Runx2.⁴³ Εν τούτοις, η διαταραχή της πρωτεΐνης APC προάγει και διακόπτει ταυτόχρονα την οστεογένεση, ενώ η διαγραφή APC αυξάνει την οστική μάζα στα ποντίκια μέσω της υπερενεργοποίησης του μονοπατιού της β-κατενίνης.⁴² Άλλη μελέτη έδειξε ότι η ανεπάρκεια της APC προκαλεί σκελετικές ανωμαλίες λόγω αποτυχίας της διαφοροποίησης οστεοβλαστών και χονδροβλαστών.⁴⁴ Τέλος, οι μεταγραφικοί παράγοντες Tcf/Lef-1 που συμμετέχουν στο κανονικό μονοπάτι Wnt έχουν ουσιώδη συμμετοχή στη φυσιολογική οστεογένεση σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι Tcf1 και Tcf4 εκφράζονται σε καλλιέργειες πρόδρομων οστεοβλαστών.³⁶ Όταν το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt μεταβάλλεται σε προγονικά κύτταρα, η φυσιολογική οστεογενετική διαφοροποίηση διακινδυνεύεται, οδηγώντας σε οστεογενετικές παθολογίες. Έτσι, είναι πιθανόν ότι οι μεσολαβητές της Wnt σηματοδότησης μπορεί να είναι ελκυστικοί στόχοι για ενδεχόμενες θεραπευτικές παρεμβάσεις που σκοπό έχουν είτε να αποκατασταθεί η σωστή οστεογενετική σηματοδότηση είτε να χειριστεί η Wnt σηματοδότηση υπέρ του οστικού σχηματισμού.

2.3. Ρύθμιση της σηματοδοτικής οδού Wnt

Οι ενδογενείς ρυθμιστές της κανονικής οδού σηματοδότησης Wnt μπορούν να διαιρεθούν σε εξωκυτταρικούς και σε ενδοκυτταρικούς ανταγωνιστές, που βασίζονται στις περιοχές δράσης τους. Παραδείγματα εξωκυτταρικών αναστολέων είναι η σκληροστίνη, οι Dkks, ο ανασταλτικός παράγοντας Wnt 1/2 (Wnt inhibitory factor-1/2, WIF-1/2) και οι SFRPs. Οι περισσότεροι εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές είναι εκκρινόμενοι παράγοντες που αλληλεπιδρούν είτε με υποδοχείς Wnt είτε με Wnt συνδέτες. Για παράδειγμα, η σκληροστίνη προσδέεται στον συνυποδοχέα LRP5/6 αναστέλλοντας ανταγωνιστικά την πρόσδεση συνδετών Wnt.⁴⁵ Ο παράγοντας Dkk-1 σχηματίζει σύμπλεγμα με την LRP6 και μια άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη (Kremen 1/2), το οποίο οδηγεί στην αποδόμηση της LRP, ελαττώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά της για σύνδεση με τους συνδέτες Wnt.⁴⁶ Ταυτόχρονα, οι SFRPs και ο Wif-1 συνδέονται άμεσα με τους συνδέτες Wnt, εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεσή τους με τους υποδοχείς Fz και LRP5/6.³² Εν τούτοις, οι ενδοκυτταρικοί ανταγωνιστές διαταράσσουν τη σηματοδότηση Wnt στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Η GSK3β, η αξίνη και η πρωτεΐνη APC αποτελούν ένα σύμπλεγμα που σημαίνει τη β-κατενίνη προς υποβάθμιση στην ανενεργή της κατάσταση.⁴⁷ Η πρωτεΐνη Chibby (Cby) δρα εντός του πυρήνα ανταγωνιζόμενη την αλληλεπίδραση μεταξύ β-κατενίνης και Tcf/Lef-1.⁴⁸ Οι εν λόγω ενδογενείς ανταγωνιστές αξίζουν προσοχής, γιατί τονίζουν τα βασικά σημεία της ρύθμισης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt και συνδράμουν στην καλύτερη κατανόηση των ασθενειών που προκαλούνται από τη μη φυσιολογική σηματοδότηση Wnt. Έτσι, οι ενδογενείς ανταγωνιστές έχουν γίνει δημοφιλείς στόχοι των πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων που χειρίζονται τη Wnt σηματοδότηση για τη θεραπεία των οστικών διαταραχών.

3. Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ WNT ΣΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

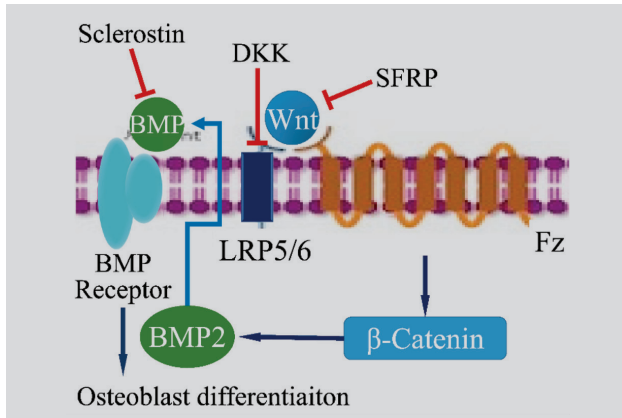
3.1. Η δράση της σηματοδοτικής οδού Wnt στην οστική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων

Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem/stromal cells, MSCs) είναι πολυδύναμα προγονικά κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα οστού, χόνδρου, λίπους, τένοντα και μυός.⁴⁹ Φέρουν τεράστιο θεραπευτικό δυναμικό στην αναγεννητική Ιατρική, καθώς μπορούν να εξαχθούν από πολλά σημεία του σώματος και κυρίως από τον μυελό των οστών.⁵⁰ Επαγωγή των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων προς την οστεογενετική γραμμή πιθανόν να χρησιμεύσει ως μια αποτελεσματική

θεραπεία για την προαγωγή του σχηματισμού οστού σε οστεογενετικές διαταραχές. Μελέτες έχουν δείξει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της οστεογενετικής διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων.^{51,52} Η β-κατενίνη προάγει τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τη διαφοροποίηση προς λιπογενετική και χονδρογενετική οδό.^{53,54} Ειδικά, η κανονική οδός σηματοδότησης Wnt εμποδίζει την έκφραση σημαντικών λιπογενετικών παραγόντων, όπως οι PPARγ και CCAAT/enhancer binding protein α, ενώ προάγει οστεογόνους μεσολαβητές, όπως οι Runx2, Dlx5 και Osterix.⁵⁵ Επιπρόσθετα, η μη κανονική οδός της Wnt σηματοδότησης προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, καθώς ο μη κανονικός συνδέτης Wnt5A ελαττώνει τον PPARγ μέσω της αδρανοποίησης της χρωματίνης.⁵⁶ Γίνεται σαφές λοιπόν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, είτε μέσω της κανονικής είτε μέσω της μη κανονικής οδού, ρυθμίζει την οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων.

3.2. Αλληλεπίδραση της σηματοδοτικής οδού Wnt με άλλες σηματοδοτικές οδούς κατά την οστική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων

Αλληλεπίδραση με οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs). Είναι σημαντική η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και των άλλων σηματοδοτικών οδών στην οστική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Για παράδειγμα, οι BMPs μπορούν είτε να ενισχύουν είτε να ανταγωνίζονται την οστική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, η οποία επάγεται από το μονοπάτι Wnt.^{57,58} Οι BMPs, ειδικά η BMP-2, η BMP-6 και η BMP-9, είναι κύριοι ενεργοποιητικοί παράγοντες της οστικής διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων.⁵⁹ Μελέτες έχουν δείξει ότι η Wnt σηματοδότηση και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των BMPs έχουν κοινούς στόχους, οι οποίοι επάγουν την οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Ένας τέτοιος στόχος είναι ο connective growth tissue factor (CTGF).⁶⁰ Επί πλέον, η λειτουργική σηματοδότηση Wnt δείχθηκε να απαιτείται για την BMP-επαγόμενη οστεογόνο διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Η Wnt3A ενίσχυσε τις οστεογενετικές επιδράσεις του BMP-9, ενώ η υπερέκφραση ενός ανταγωνιστή Fz, του Frz-B, αναστέλλει τα οστεογενετικά αποτελέσματα της BMP-9.^{61,62} Ταυτόχρονα, η υπερέκφραση του Dkk-1 εμποδίζει τον σχηματισμό έκτοπου οστού που επάγεται από την BMP-2 (εικ. 2).⁶³ Θεωρείται ότι η BMP-2



Εικόνα 2. Αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt, BMP και σκληροστίνης στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (από Raisz et al, τροποποιημένο).¹⁰⁰

ενεργοποιεί την έκφραση της LRP-5 και αδρανοποιεί την παραγωγή β-Trcp, οδηγώντας στη σταθεροποίηση της β-κατενίνης και της επαγόμενης σηματοδότησης της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών.⁶⁴ Ο Wnt5A, όντας κλασικός Wnt συνδέτης, συνιστά σημαντικό συστατικό της οστεογενετικής διαφοροποίησης που επάγεται από την BMP-2.⁶⁵ Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι BMPs αδρανοποιούν τη σηματοδότηση Wnt στην οστεογενετική διαφοροποίηση μέσω της σκληροστίνης και του Dkk-1.⁶⁶ Έχει προταθεί ότι ο Smad-1 μπορεί να διαμορφώσει σύμπλεγμα με τον Dvl, διαχωρίζοντας αυτόν από την κανονική οδό σηματοδότησης Wnt.⁶⁷ Εκτός από τις BMPs, το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt αλληλεπιδρά και με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα μονοπάτια Notch και Hedgehog. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch αναστέλλει την οστεογενετική διαφοροποίηση που επάγεται από το μονοπάτι της β-κατενίνης. Υπερέκφραση του ενδοκυττάριου τμήματος της Notch οδηγεί στην αναστολή του μονοπατιού Wnt και σε διαταραχή της οστεοβλαστογένεσης.⁶⁸⁻⁷⁰ Το μονοπάτι Hedgehog επάγει αυξητικά την οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού Wnt.^{71,72}

Αλληλεπίδραση με τον παράγοντα TNF-α. Το μονοπάτι Wnt αλληλεπιδρά με φλεγμονώδη μονοπάτια κατά τη διάρκεια της οστικής ανάπτυξης. Ο TNF-α επάγει τον Dkk-1, έναν ενδογενή ρυθμιστή της σηματοδότησης Wnt, αναστέλλοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.⁷³ Υπερέκφραση του TNF-α σε ποντίκια οδηγεί σε καταστροφή των αρθρώσεων. Εν τούτοις, η εξουδετέρωση του Dkk-1 με αντι-Dkk-1 αντισώματα σε διαγονιδιακά ποντίκια παρεμποδίζει την καταστροφή των αρθρώσεων και προκαλεί σχηματισμό οστεόφυτων, ενδεικτικό οστικής επισκευής.⁷⁴ Γίνεται σαφές ότι η λεπτή ισορροπία μεταξύ οστικής παραγωγής και οστι-

κής απορρόφησης ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και της φλεγμονώδους διαδικασίας που επάγεται από τον TNF-α.

Αλληλεπίδραση με την προκοκκιόκίνη. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ρυθμίζει τον αυξητικό παράγοντα της προκοκκιόκίνης (progranulin) στη μετωποκρατική άνοια.⁷⁵ Η προκοκκιόκίνη, γνωστή και ως προεπιθελίνη, είναι νεοανακαλυφθείς αυξητικός παράγοντας που προάγει τη χονδρογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση.⁷⁶

Αλληλεπίδραση με τα microRNAs. Τα microRNAs (miRNA) αποτελούν άλλη μια κατηγορία στοιχείων που αλληλεπιδρούν με το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στη ρύθμιση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Πληθώρα miRNAs έχουν αναφερθεί είτε να προάγουν είτε να αναστέλλουν την οστεογενετική διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Διαφορετικά miRNAs παρεμβαίνουν σε διαφορετικές θέσεις και στάδια της οστεογενετικής διαφοροποίησης, αλληλεπιδρώντας με εξωκυττάριους αυξητικούς παράγοντες και ενδοκυττάριους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Runx2 και η Osterix.⁷⁷ Διάφορα miRNAs έχουν αναφερθεί ότι αλληλεπιδρούν ειδικά με μόρια του μονοπατιού Wnt, επιδρώντας στην οστεογένεση. Το miR-27 αναστέλλει την πρωτεΐνη APC, ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι της β-κατενίνης και προάγοντας την οστική ανάπτυξη.⁷⁸ Το miR-335-5p καταστέλλει τον παράγοντα Dkk-1, ευνοώντας έτσι την οστεογενετική διαφοροποίηση.⁷⁹ Συνολικά, υπάρχει περίπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο μεταξύ του μονοπατιού Wnt και των άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών κατά την οστεογενετική διαφοροποίηση. Η πληρέστερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι σημαντική στην ανακάλυψη θεραπευτικών παρεμβάσεων, έτσι ώστε να ελεγχθούν τα εν λόγω σηματοδοτικά μονοπάτια και να θεραπευθούν οστικά νοσήματα.

Αλληλεπίδραση με την παραθορμόνη. Η παραθορμόνη (PTH) είναι μια ορμόνη που παράγεται από τους παραθυροειδείς αδένες, με αναβολικές ιδιότητες για τον σκελετό, οι οποίες πρωτοπεριγράφηκαν στο τέλος της δεκαετίας του 1980. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η PTH και ο υποδοχέας της PTH1R ασκούν την αναβολική τους δράση σε συνάρτηση με διάφορα στοιχεία του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, όπως η GSK3-β και η σκληροστίνη.⁸⁰ Σε πειραματικό μοντέλο κλειστού κατάγματος μηριαίου σε αρσενικούς μύς βρέθηκε ότι η PTH αυξάνει την έκφραση πολλών πρωτεϊνών Wnt, όπως των Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt0B, αλλά και των υποδοχέων LRP5 και LRP6 στον καταγματικό πόρο. Επί πλέον, η PTH αύξησε τα επίπεδα β-κατενίνης στον πυρήνα ώριμων χονδροκυττάρων και οστεοβλαστών.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο οστικός σχηματισμός που επάγει η PTH, τουλάχιστον εν μέρει, εξαρτάται από το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης.⁸¹ Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, όπου ερευνηθήκε ο μηχανισμός της αναβολικής δράσης της PTH, βρέθηκε ότι μύες με γονότυπο *SOST*^{-/-} εμφάνισαν μειωμένα αποτελέσματα οστικής παραγωγής από τη διαλείπουσα χορήγηση PTH στο φλοιώδες, αλλά όχι στο σπογγώδες οστό. Η συνεχής χορήγηση PTH επέφερε τα ίδια καταβολικά αποτελέσματα στο ίδιο μοντέλο μυών. Κατά συνέπεια, φάνηκε ότι η σκληροστίνη διαδραματίζει ρόλο στη δράση της PTH στον σκελετό, αλλά με πολύπλοκο μηχανισμό που εξαρτάται από την ανατομική περιοχή.⁸² Σε άλλη μελέτη δείχθηκε ότι η δράση της PTH απαιτεί τη σωστή λειτουργία του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, αλλά ενδέχεται να το ενεργοποιεί ακόμη και σε υπερέκφραση του *Dkk-1*, που είναι αναστολέας του.⁸³

Αλληλεπίδραση με την οδό *Indian hedgehog*. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, η σηματοδότηση *Indian hedgehog* (*Ihh*) δρα ως διακόπτης εντός του εσωτερικού περιχόνδριου μεσεγχύματος για την έναρξη του οστικού σχηματισμού.⁸⁴ Η *Ihh* είναι το μόνο μέλος της οικογένειας *hedgehog* που εκφράζεται από τα χονδροκύτταρα κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Φαίνεται ότι το αποτέλεσμα της *Ihh* οφείλεται στην άμεση δράση της σε μη υπερτροφικά χονδροκύτταρα. Απώλεια της λειτουργίας του *Wnt9* μπορεί να καταστείλει τη σηματοδότηση *Ihh* στον αξονικό σκελετό και να επιβραδύνει την ωρίμανση των χονδροκυττάρων και των οστεοβλαστών.⁸⁵ Ο *Wnt5A* συνεργάζεται με την *Ihh* για την αποικοδόμηση του χονδρογενούς παράγοντα *NKx3.2*, καταστέλλοντας τη χονδρογένεση.⁸⁶ Η β-κατενίνη και ο *LEF1* σχετίζονται με τον υποκινητή του γονιδίου *Ihh in vivo*.

Αλληλεπίδραση με την οδό *TGF-β/BMP*. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (*bone morphogenetic proteins*, *BMPs*) συμμετέχουν σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής σκελετικής ανάπτυξης, από τον σχηματισμό συμπακνώσεων πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων έως τη ρύθμιση της χονδρογένεσης και του οστικού σχηματισμού μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Σε πειραματόζωα βρέθηκε ότι χορήγηση ανασυνδυασμένων *BMPs* βελτίωσε την πύρωση σκελετικού τραύματος, διεγείροντας τη χονδρογένεση, μέσω του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης.⁸⁷ Οι ανασυνδυασμένες *BMPs* αναστέλλουν το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, οδηγώντας σε αύξηση του παράγοντα *SOX9* στο τραυματισμένο περίοστεο. Κατά συνέπεια, κύτταρα στη συγκεκριμένη περιοχή στρέφονται προς τη σειρά των χονδροκυττάρων. Στο τραυματισμένο ενδόστυο οι *rBMPs* επίσης αναστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω της Wnt/β-κατενίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του *RUNX-2* και του κολλαγόνου τύπου I.⁸⁸ Εξάλειψη του υπο-

δοχέα των *BMPs* τύπου IA (*BMPR-1a*) στους οστεοβλάστες μυών είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη οστική μάζα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπου η μειωμένη έκφραση του γονιδίου *Sost*, συνεπεία της έλλειψης του *BMPR-1a*, προκάλεσε αυξημένη σηματοδότηση μέσω Wnt/β-κατενίνης.⁶⁶ Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η κατάργηση του γονιδίου *BMPR-1a* σε μύς προκαλεί αυξημένη οστική μάζα σε μικρή ηλικία, με ενδείξεις αυξημένης σηματοδότησης μέσω Wnt/β-κατενίνης. Επί πλέον, η έκφραση ενεργού γονιδίου *BMPR-1a* σε γενετικά τροποποιημένους μύς οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης των *Dkk-1* και *Sost*.⁸⁹

4. ΠΙΘΑΝΟΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΙΧΟΙ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ WNT

Δεδομένης της πληθώρας ευρημάτων που δείχνουν τη συμμετοχή του μονοπατιού Wnt στη ρύθμιση της οστεογένεσης, το μονοπάτι αυτό συνιστά ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία οστικών νοσημάτων, όπως η οστεοπόρωση και οι διαταραχές της επούλωσης καταγμάτων. Οι εν λόγω διαταραχές αντιπροσωπεύουν είτε συστηματική είτε τοπική αστοχία στον σωστό σχηματισμό οστού. Έτσι, η επαγωγή της σηματοδότησης Wnt για την προαγωγή του σχηματισμού των οστών είναι μια θεραπευτική προσέγγιση όσον αφορά στη θεραπεία αυτών των διαταραχών. Όπως αναφέρθηκε, η Wnt σηματοδότηση περιέχει πολλαπλά επίπεδα ρύθμισης που ενδέχεται να επηρεάζουν την οδό της οστεογένεσης: οι Wnt υποδοχείς, οι εκκρινόμενοι ανταγωνιστές Wnt και οι ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές.

4.1. Στόχευση των εξωκυττάρων ανταγωνιστών

Σκληροστίνη. Η αναστολή των εξωκυττάρων ανταγωνιστών με μονοκλωνικά αντισώματα συνιστά δημοφιλή προσέγγιση για την τροποποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και την προαγωγή της οστικής παραγωγής. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της σκληροστίνης, η δράση των οποίων αναμένεται να ενισχύσει την ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt υπέρ της οστικής παραγωγής. Η υποδόρια ένεση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της σκληροστίνης αύξησε σημαντικά την οστική παραγωγή σε αρουραίους μετά από 5 εβδομάδες θεραπείας.⁹⁰ Παρουσία της σκληροστίνης ή των παραγόντων *Dickkopf*, οι συνδέτες δεν μπορούν να συνδεθούν στους υποδοχείς τους και να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι Wnt. Οι ανασταλτικές δράσεις της σκληροστίνης και των παραγόντων *Dickkopf* μπορούν να εξουδετερωθούν από αντισώματα, ενεργοποιώντας έτσι τον καταρράκτη Wnt. Οι *SFRPs* και ο *Wif* αναστέλλουν τη σηματοδότηση προδεδόμενοι στους συνδέτες Wnt, αλλά οι αναστολείς *SFRP*, όπως η *diphenylsulfonil sulfonamide*,

εμποδίζουν τη σύνδεση των SFRPs με τους συνδέτες Wnt. Η GSK3β φυσιολογικά αποικοδομεί τη β-κατενίνη. Το λίθιο ή άλλοι αναστολείς της GSK3β μπορούν να αναστέλλουν την GSK3β, επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και την πυρηνική έκφραση των γονιδίων-στόχων. Ο Chibby είναι ένας ενδογενής ανταγωνιστής που διακόπτει τη σύνδεση της β-κατενίνης με τους Tcf/Lef-1.

Παράγοντας DKK-1. Η εξουδετέρωση του παράγοντα Dkk-1 με μονοκλωνικά αντισώματα συνιστά θεραπευτική προσέγγιση υπό διερεύνηση. Η χρήση αντι-Dkk-1 αντισωμάτων εμποδίζει την ελάττωση των οστεοβλαστών σε μοντέλα πολλαπλού μυελώματος σε ποντίκια, μειώνοντας ταυτόχρονα τους οστεοκλάστες και ελαττώνοντας τις οστεολυτικές περιοχές, ενώ αναστέλλει την παραγωγή των παθολογικών πλασματοκυττάρων.^{91,92} Επί πλέον, η χορήγηση αντι-Dkk-1 αντισωμάτων ενεργοποιεί την πύρωση μετά από κατάγματα ή και οστεοσύνθεση.

4.2. Στόχευση των ενδοκυττάρων ανταγωνιστών

GSK3B. Ο απ' ευθείας χειρισμός των ενδοκυττάρων ρυθμιστών του μονοπατιού Wnt συνιστά άλλον έναν στόχο στην προαγωγή της οστεογένεσης. Η παρεμπόδιση της GSK3β από τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης θα σταθεροποιήσει τα κυτταροπλασματικά επίπεδα της β-κατενίνης, επιδρώντας στο μονοπάτι του Wnt. Το λίθιο, κλασικό φάρμακο για τη διπολική διαταραχή, ενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης μέσω αναστολής του ενζύμου GSK3-β. Επί πλέον, η χορήγηση λιθίου ενεργοποίησε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και εμπόδισε την ανάπτυξη του όγκου σε μύς με πολλαπλούν μυέλωμα.⁹³ Ένας άλλος αναστολέας του παράγοντα GSK3β, ο 603281-31-8, επάγει την οστεοβλαστογένεση *in vitro*, αυξάνοντας την οστική παραγωγή, την οστική πυκνότητα και την οστική αντοχή *in vivo*.⁹⁴ Ο ίδιος αναστολέας είναι ικανός να αναστρέψει την οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό λόγω ωθητικής ανεπάρκειας σε αρουραίους και να αποκαταστήσει την ικανότητα του μυελού των οστών για λιπογένεση.⁹⁴ Το μειονέκτημα των αναστολέων GSK3β είναι ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας εμπλέκεται σε πολλές ενδοκυττάρια διαδικασίες. Επομένως, η υπερβολική αναστολή της λειτουργίας του ενέχει κινδύνους, κυρίως ογκογένεσης.

TCF/LEF-1. Παρεμβάσεις σε άλλους ενδοκυττάρους ρυθμιστές έχουν θεραπευτικό δυναμικό για οστικά νοσήματα. Για παράδειγμα, η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της β-κατενίνης και των Tcf/Lef-1 είναι μια θεωρητικά εφικτή προσέγγιση για τον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Έχει βρεθεί ότι το δεοξυχολικό οξύ αυξάνει την ενεργότητα της β-κατενίνης και την έκφρασή της στα γονίδια-στόχους.⁹⁵ Η πυρηνική πρωτεΐνη Cby ανταγωνίζε-

ται τη β-κατενίνη προδεδεμένη στον Lef-1 και θεωρείται σημαντικός παράγοντας που προάγει τη λιπογενετική διαφοροποίηση, εμποδίζοντας τη σηματοδότηση της β-κατενίνης.⁴⁸ Έτσι, η χρήση των λιπογόνων ιδιοτήτων είτε η ανάπτυξη παρέμβασης που ανταγωνίζεται τη Cby μπορεί να αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση για τον χειρισμό του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt.

4.3. Ογκογενετικοί κίνδυνοι συνδεόμενοι με τη θεραπευτική στόχευση της σηματοδοτικής οδού Wnt

Παρά τη θεραπευτική δυναμική, πρέπει να δίνεται προσοχή στον χειρισμό της σηματοδότησης του μονοπατιού Wnt για οστεογενετικές διαταραχές. Δεδομένου ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt δεν είναι ειδικό για τον οστίτη ιστό, η οποιαδήποτε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού έχει εξωοστικές συνέπειες. Πιο συγκεκριμένα, η προώθηση της διάδοσης και της ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης Wnt ενέχει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου. Οι συγκεκριμένοι κίνδυνοι καρκινογένεσης έχουν επαρκώς τεκμηριωθεί με μεταλλάξεις στους μεσολαβητές της Wnt σηματοδότησης, όπως APC, Axin, GSK3β, β-κατενίνη και LRP.⁹⁶

Σε σχέση με τον οστίτη ιστό, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην ανάπτυξη οστεοσαρκώματος. Στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα β-κατενίνης τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, ενδεικτικά υψηλής ενεργότητας σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt.⁹⁷ Αντίστοιχα, είναι ευνόητο ότι οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση αναστέλλει τη σηματοδότηση Wnt πιθανόν να έχει αντικαρκινική εφαρμογή. Πρόσφατα, ένα αντίσωμα έναντι των υποδοχέων Fz, το OMP-18R5, αναφέρθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη καρκίνων μαστού, εντέρου, παγκρέατος και πνεύμονα σε πειραματόζωα.⁹⁸ Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt για την προαγωγή της οστικής παραγωγής. Μελλοντικές έρευνες πρέπει να προσδιορίσουν το κατάλληλο επίπεδο ενεργοποίησης του μονοπατιού ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι καρκινογένεσης.

Επιπρόσθετα των κινδύνων καρκινογένεσης, η θεραπευτική χρήση του μονοπατιού Wnt πρέπει να λάβει υπ' όψιν και άλλες παραμέτρους. Μια τέτοια παράμετρος είναι η πιθανή ανάπτυξη οστεοαρθριτικών συμπτωμάτων. Η παρατεταμένη εξωγενής ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt φαίνεται να οδηγεί σε συμπτώματα οστεοαρθρίτιδας. Για παράδειγμα, τα αντι-Dkk-1 αντισώματα, παρά την ελάττωση της οστικής απώλειας σε πειραματικά μοντέλα ρευματοειδούς αρθρίτιδας, προκάλεσαν οστεόφυ-

τα χαρακτηριστικά οστεοαρθρίτιδας.⁷⁴ Προκύπτει λοιπόν ότι η χορήγηση αντι-Dkk-1 αντισωμάτων για την πρόληψη της οστικής απώλειας χρειάζεται προσεκτική ρύθμιση της δόσης και της διάρκειας της θεραπείας για την πρόληψη οστεοαρθρικών ανεπιθύμητων ενεργειών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η τρέχουσα κατανόηση του ρόλου του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στα οστικά νοσήματα έχει διευρυνθεί αξιόσημα τα τελευταία έτη. Σήμερα, όχι μόνο διαθέτουμε καλύτερη κατανόηση της παθογένειας των παθήσεων των οστών που προκαλούνται από τη μη φυσιολογική σηματοδότηση Wnt, αλλά υπάρχουν πολυάριθμες θεραπευτικές κατευθύνσεις για τη θεραπεία των διαταραχών των οστών μέσω παρεμβολής στη σηματοδότηση Wnt. Τα αντισώματα έναντι της σκληροστίνης αποτελούν ένα παράδειγμα για την κλινική εφαρμογή του μονοπατιού Wnt. Άλλα φαρμακευτικά προϊόντα, όπως τα αντι-Dkk-1 αντισώματα και οι αναστολείς SFRPs, είναι υπό διερεύνηση και μπορούν σύντομα να τύχουν κλινικής χρήσης. Εν τούτοις, θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπ' όψιν ο κίνδυνος καρκινογένεσης κατά τον προγραμματισμό θεραπειών που

βασίζονται στη σηματοδότηση Wnt. Η εύρεση της βέλτιστης ισορροπίας μεταξύ των οστεογενών επιδράσεων και των ογκογενετικών κινδύνων της Wnt θεραπείας είναι κρίσιμη και απαιτεί προσεκτική και διεξοδική διερεύνηση. Επί πλέον, η σηματοδότηση Wnt δεν περιορίζεται στον οστικό ιστό. Η ανακάλυψη μιας μεθόδου για την απ' ευθείας στόχευση στον οστίτη ιστό χωρίς να επηρεάζει άλλους ιστούς πιθανόν να είναι ιδανική για τη μεγιστοποίηση των θεραπευτικών οφελών, με παράλληλη ελαχιστοποίηση των κινδύνων καρκινογένεσης. Περαιτέρω έρευνες για τον καθορισμό των βέλτιστων θεραπευτικών στόχων στο μονοπάτι Wnt θα είναι σημαντικές για την ανάπτυξη νέων θεραπειών.

Μετά από δεκαετίες μελέτης της σηματοδότησης Wnt έχει σχηματιστεί μια εικόνα για το πώς οι Wnt συνδέτες δεσμεύονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και προκαλούν ενδοκυτταρικές απαντήσεις και γονιδιακή μεταγραφή. Ωστόσο, πολλά σημαντικά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα, όπως π.χ. η μοριακή δομή των εξαρτημάτων της σηματοδότησης Wnt και ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ του περίπλοκου δικτύου της κανονικής οδού σηματοδότησης Wnt, της μη κανονικής οδού σηματοδότησης, και των άλλων οδών σηματοδότησης στα οστά.

ABSTRACT

The Wnt signaling pathway in bone metabolism: Biology and therapeutic interventions

A. ADAMOPOULOS,¹ G.I. LAMBROU^{1,2}

¹Postgraduate Program "Metabolic diseases of bones", Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ²First Department of Pediatrics, Choremio Research Laboratory, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2022, 39(4):469–481

Wnt signaling has been shown to be an important regulatory pathway in the osteogenetic differentiation of mesenchymal stem cells. Induction of the Wnt signaling pathway promotes bone formation, bone renewal and differentiation of osteoblasts and osteoclasts, while inactivation of the Wnt pathway leads to osteopenia. Activation and inactivation of Wnt signaling deviations during osteogenesis lead to sclerosis and osteoporosis, respectively. Study of the Wnt signaling mechanism and its interactions with other signaling pathways in bones provides potential therapeutic targets for the treatment of bone diseases. Although modification of the Wnt signal pathway has a variety of therapeutic possibilities, careful handling is required, because of the risk of oncogenesis. This paper reports on the role of Wnt signaling in bone metabolism, the potential therapeutic targets, and the risks arising from intervention in Wnt signaling.

Key words: Bone metabolism, Gene regulations, Therapeutic interventions, Wnt

Βιβλιογραφία

1. SOLTANOFF CS, YANG S, CHEN W, LI YP. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009, 19:1–46
2. BERENDSEN AD, OLSEN BR. Bone development. *Bone* 2015,

- 80:14–18
3. FLORENCIO-SILVA R, DA SILVA SASSO GR, SASSO-CERRI E, SIMÕES MJ, CERRI PS. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015, 2015:421746
 4. WAGNER ER, ZHU G, ZHANG BQ, LUO Q, SHI Q, HUANG E ET AL. The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders. *Curr Mol Pharmacol* 2011, 4:14–25
 5. HERR P, HAUSMANN G, BASLER K. Wnt secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med* 2012, 18:483–493
 6. NUSSE R, VARMUS HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982, 31:99–109
 7. MORVAN F, BOULUKOS K, CLÉMENT-LACROIX P, ROMAN-ROMAN S, SUC-ROYER I, VAYSSIÈRE B ET AL. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 2006, 21:934–945
 8. RUBINFELD B, SOUZA B, ALBERT I, MÜLLER O, CHAMBERLAIN SH, MASIARZ FR ET AL. Association of the *APC* gene product with beta-catenin. *Science* 1993, 262:1731–1734
 9. SU LK, JOHNSON KA, SMITH KJ, HILL DE, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Association between wild type and mutant *APC* gene products. *Cancer Res* 1993, 53:2728–2731
 10. CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 2012, 149:1192–1205
 11. MONROE DG, MCGEE-LAWRENCE ME, OURSLER MJ, WESTENDORF JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012, 492:1–18
 12. RACHNER TD, KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis: Now and the future. *Lancet* 2011, 377:1276–1287
 13. RAO TP, KÜHL M. An updated overview on Wnt signaling pathways: A prelude for more. *Circ Res* 2010, 106:1798–1806
 14. DE A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: A brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011, 43:745–756
 15. VLADAR EK, ANTIC D, AXELROD JD. Planar cell polarity signaling: The developing cell's compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1:a002964
 16. HOEPPNER LH, SECRETO FJ, WESTENDORF JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2009, 13:485–496
 17. LEVASSEUR R, LACOMBE D, DE VERNEJOU MC. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint Bone Spine* 2005, 72:207–214
 18. GONG Y, SLEE RB, FUKAI N, RAWADI G, ROMAN-ROMAN S, REGINATO AM ET AL. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001, 107:513–523
 19. KOMATSU DE, MARY MN, SCHROEDER RJ, ROBLING AG, TURNER CH, WARDEN SJ. Modulation of Wnt signaling influences fracture repair. *J Orthop Res* 2010, 28:928–936
 20. LITTLE RD, CARULLI JP, DEL MASTRO RG, DUPUIS J, OSBORNE M, FOLZ C ET AL. A mutation in the *LDL* receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 2002, 70:11–19
 21. MANI A, RADHAKRISHNAN J, WANG H, MANI A, MANI MA, NELSON-WILLIAMS C ET AL. *LRP6* mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 2007, 315:1278–1282
 22. RIANCHO JA, OLMOS JM, PINEDA B, GARCÍA-IBARBIA C, PÉREZ-NÚÑEZ MI, NAN DN ET AL. Wnt receptors, bone mass, and fractures: Gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol* 2011, 164:123–131
 23. PINSON KI, BRENNAN J, MONKLEY S, AVERY BJ, SKARNES WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000, 407:535–538
 24. KOKUBU C, HEINZMANN U, KOKUBU T, SAKAI N, KUBOTA T, KAWAI M ET AL. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that *Lrp6* is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* 2004, 131:5469–5480
 25. VAN BEZOOIJEN RL, TEN DIJKE P, PAPAPOULOS SE, LÖWIK CWGM. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16:319–327
 26. LOOTS GG, KNEISSEL M, KELLER H, BAPTIST M, CHANG J, COLLETTE NM ET AL. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 2005, 15:928–935
 27. LI X, OMINSKY MS, NIU QT, SUN N, DAUGHERTY B, D'AGOSTIN D ET AL. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008, 23:860–869
 28. WINKLER DG, SUTHERLAND MK, GEOGHEGAN JC, YU C, HAYES T, SKONIER JE ET AL. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003, 22:6267–6276
 29. ELLIES DL, VIVIANO B, MCCARTHY J, REY JP, ITASAKI N, SAUNDERS S ET AL. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res* 2006, 21:1738–1749
 30. MAO B, WU W, DAVIDSON G, MARHOLD J, LI M, MECHLER BM ET AL. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature* 2002, 417:664–667
 31. LI J, SAROSI I, CATTLEY RC, PRETORIUS J, ASUNCION F, GRISANTI M ET AL. *Dkk1*-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006, 39:754–766
 32. KAWANO Y, KYPTA R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* 2003, 116:2627–2634
 33. BODINE PVN, ZHAO W, KHARODE YP, BEX FJ, LAMBERT AJ, GOAD MB ET AL. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 2004, 18:1222–1237
 34. GAURT, WIXTED JJ, HUSSAIN S, O'CONNELL SL, MORGAN EF, AYERS DC ET AL. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improve fracture healing. *J Cell Physiol* 2009, 220:174–181
 35. LOUGHLIN J, DOWLING B, CHAPMAN K, MARCELLINE L, MUSTAFA Z, SOUTHAM L ET AL. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:9757–9762
 36. McDONALD BT, TAMAI K, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009, 17:9–26
 37. TU X, JOENG KS, NAKAYAMA KI, NAKAYAMA K, RAJAGOPAL J, CARROLL TJ ET AL. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation. *Dev Cell* 2007, 12:113–127
 38. DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L, YANG Y. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005, 8:739–750
 39. RODDA SJ, McMAHON AP. Distinct roles for Hedgehog and ca-

- nonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 2006, 133:3231–3244
40. BARON R, RAWADI G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007, 148:2635–2643
 41. GLASS DA 2nd, KARSENTY G. *In vivo* analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 2007, 148:2630–2634
 42. HOLMEN SL, ZYLSTRA CR, MUKHERJEE A, SIGLER RE, FAUGERE MC, BOUXSEIN ML ET AL. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem* 2005, 280:21162–21168
 43. KUGIMIYA F, KAWAGUCHI H, OHBA S, KAWAMURA N, HIRATA M, CHIKUDA H ET AL. GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity. *PLoS One* 2007, 2:e837
 44. MICLEA RL, KARPERIEN M, BOSCH CA, VAN DER HORST G, VAN DER VALK MA, KOBAYASHI T ET AL. Adenomatous polyposis coli-mediated control of beta-catenin is essential for both chondrogenic and osteogenic differentiation of skeletal precursors. *BMC Dev Biol* 2009, 9:26
 45. LI X, ZHANG Y, KANG H, LIU W, LIU P, ZHANG J ET AL. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005, 280:19883–19887
 46. MAO B, NIEHRS C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 2003, 302:179–183
 47. KIMELMAN D, XU W. Beta-catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 2006, 25:7482–7491
 48. TAKEMARU KI, YAMAGUCHI S, LEEYS, ZHANG Y, CARTHEW RW, MOON RT. Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 2003, 422:905–909
 49. BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008, 2:313–319
 50. ZHANG Y, KHAN D, DELLING J, TOBIASCH E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Scientific World Journal* 2012, 2012:793823
 51. CAWTHORN WP, BREE AJ, YAO Y, DU B, HEMATI N, MARTINEZ-SANTIBANEZ G ET AL. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. *Bone* 2012, 50:477–489
 52. KRISHNAN V, BRYANT HU, McDOUGALD OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006, 116:1202–1209
 53. CASE N, RUBIN J. Beta-catenin – a supporting role in the skeleton. *J Cell Biochem* 2010, 110:545–553
 54. GLASS DA 2nd, BIALEK P, AHN JD, STARBUCK M, PATEL MS, CLEVERS H ET AL. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005, 8:751–764
 55. KANG S, BENNETT CN, GERIN I, RAPP LA, HANKENSON KD, McDOUGALD OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2007, 282:14515–14524
 56. TAKADA I, MIHARA M, SUZAWA M, OHTAKE F, KOBAYASHI S, IGARASHI M ET AL. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 2007, 9:1273–1285
 57. CHEN G, DENG C, LI YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012, 8:272–288
 58. LIN GL, HANKENSON KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2011, 112:3491–3501
 59. LUU HH, SONG WX, LUO X, MANNING D, LUO J, DENG ZL ET AL. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007, 25:665–677
 60. LUO Q, KANG Q, SI W, JIANG W, PARK JK, PENG Y ET AL. Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2004, 279:55958–55968
 61. LUTHER G, WAGNER ER, ZHU G, KANG Q, LUO Q, LAMPLLOT J ET AL. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Curr Gene Ther* 2011, 11:229–240
 62. TANG N, SONG WX, LUO J, LUO X, CHEN J, SHARFF KA ET AL. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling. *J Cell Mol Med* 2009, 13:2448–2464
 63. CHEN Y, WHETSTONE HC, LIN AC, NADESAN P, WEI Q, POON R ET AL. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: Implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 2007, 4:e249
 64. ZHANG M, YAN Y, LIM YB, TANG D, XIE R, CHEN A ET AL. BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2009, 108:896–905
 65. NEMOTO E, EBE Y, KANAYA S, TSUCHIYA M, NAKAMURA T, TAMURA M ET AL. Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 422:627–632
 66. KAMIYA N, YE L, KOBAYASHI T, MOCHIDA Y, YAMAUCHI M, KRONENBERG HM ET AL. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development* 2008, 135:3801–3811
 67. LIU Z, TANG Y, QIU T, CAO X, CLEMENS TL. A dishevelled-1/Smad1 interaction couples Wnt and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 2006, 281:17156–17163
 68. DEREGOWSKI V, GAZZERRO E, PRIEST L, RYDZIEL S, CANALIS E. Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 2006, 281:6203–6210
 69. SCIAUDONE M, GAZZERRO E, PRIEST L, DELANY AM, CANALIS E. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* 2003, 144:5631–5639
 70. ZANOTTI S, SMERDEL-RAMOYA A, STADMEYER L, DURANT D, RADTKE F, CANALIS E. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology* 2008, 149:3890–3899
 71. RAWADI G, VAYSSIÈRE B, DUNN F, BARON R, ROMAN-ROMAN S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003, 18:1842–1853
 72. MAK KK, CHEN MH, DAY TF, CHUANG PT, YANG Y. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in control-

- ling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* 2006, 133:3695–3707
73. HEILAND GR, ZWERINA K, BAUM W, KIREVA T, DISTLER JH, GRISANTI M ET AL. Neutralisation of *Dkk-1* protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis* 2010, 69:2152–2159
 74. DIARRA D, STOLINA M, POLZER K, ZWERINA J, OMINSKY MS, DWYER D ET AL. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007, 13:156–163
 75. ROSEN EY, WEXLER EM, VERSANO R, COPPOLA G, GAO F, WINDEN KD ET AL. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron* 2011, 71:1030–1042
 76. WU S, ZANG W, LI X, SUN H. Proepithelin stimulates growth plate chondrogenesis via nuclear factor-kappaB-p65-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2011, 286:24057–24067
 77. VIMALRAJ S, SELVAMURUGAN N. MicroRNAs: Synthesis, gene regulation and osteoblast differentiation. *Curr Issues Mol Biol* 2013, 15:7–18
 78. WANG T, XU Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 402:186–189
 79. ZHANG J, TU Q, BONEWALD LF, HE X, STEIN G, LIAN J ET AL. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res* 2011, 26:1953–1963
 80. SECRETO FJ, HOEPPNER LH, WESTENDORF JJ. Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep* 2009, 7:64–69
 81. KAKAR S, EINHORN TA, VORA S, MIARA LJ, HON G, WIGNER NA ET AL. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res* 2007, 22:1903–1912
 82. ROBLING AG, KEDLAYA R, ELLIS SN, CHILDRESS PJ, BIDWELL JP, BELLIDOT ET AL. Anabolic and catabolic regimens of human parathyroid hormone 1–34 elicit bone- and envelope-specific attenuation of skeletal effects in *Sost*-deficient mice. *Endocrinology* 2011, 152:2963–2975
 83. GUO J, LIU M, YANG D, BOUXSEIN ML, SAITO H, GALVIN RJS ET AL. Suppression of Wnt signaling by *Dkk1* attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab* 2010, 11:161–171
 84. LONG F, CHUNG UI, OHBA S, McMAHON J, KRONENBERG HM, McMAHON AP. *Ihh* signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 2004, 131:1309–1318
 85. SPÄTER D, HILL TP, O'SULLIVAN RJ, GRUBER M, CONNER DA, HARTMANN C. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of *Ihh* during chondrogenesis. *Development* 2006, 133:3039–3049
 86. CHOI SW, JEONG DU, KIM JA, LEE B, JOENG KS, LONG F ET AL. Indian Hedgehog signalling triggers Nkx3.2 protein degradation during chondrocyte maturation. *Biochem J* 2012, 443:789–798
 87. AI M, HEEGER S, BARTELS CF, SCHELLING DK, OSTEOPOROSIS-PSEUDOGLIOMA COLLABORATIVE GROUP. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 2005, 77:741–753
 88. MINEAR S, LEUCHT P, MILLER S, HELMS JA. rBMP represses Wnt signaling and influences skeletal progenitor cell fate specification during bone repair. *J Bone Miner Res* 2010, 25:1196–1207
 89. KAMIYA N, KOBAYASHI T, MOCHIDA Y, YU PB, YAMAUCHI M, KRONENBERG HM ET AL. Wnt inhibitors *Dkk1* and *Sost* are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2010, 25:200–210
 90. LI X, OMINSKY MS, WARMINGTON KS, MORONY S, GONG J, CAO J ET AL. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2009, 24:578–588
 91. FULCINITI M, TASSONE P, HIDESHIMA T, VALLET S, NANJAPPA P, ETTEMBERG SA ET AL. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 2009, 114:371–379
 92. HEATH DJ, CHANTRY AD, BUCKLE CH, COULTON L, SHAUGHNESSY JD Jr, EVANS HR ET AL. Inhibiting Dickkopf-1 (*Dkk1*) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 2009, 24:425–436
 93. EDWARDS CM, EDWARDS JR, LWIN ST, ESPARZA J, OYAJOBIBO, McCLUSKEY B ET AL. Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone *in vivo*. *Blood* 2008, 111:2833–2842
 94. KULKARNI NH, ONYIA JE, ZENG Q, TIAN X, LIU M, HALLADAY DL ET AL. Orally bioavailable GSK-3alpha/beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation *in vitro* and bone mass *in vivo*. *J Bone Miner Res* 2006, 21:910–920
 95. PAI R, TARNAWSKI AS, TRAN T. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* 2004, 15:2156–2163
 96. POLAKIS P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007, 17:45–51
 97. IWAYA K, OGAWA H, KURODA M, IZUMI M, ISHIDA T, MUKAI K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003, 20:525–529
 98. GURNEY A, AXELROD F, BOND CJ, CAIN J, CHARTIER C, DONIGAN L ET AL. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109:11717–11722
 99. ANONYMOUS. Wnt signaling pathway. Wikipedia, 2021. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Wnt_signaling_pathway (accessed 18.6.2021)
 100. RAISZ LG. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005, 115:3318–3325

Corresponding author:

G.I. Lambrou, First Department of Pediatrics, Choremeio Research Laboratory, National and Kapodistrian University of Athens, 8 Thivon & Levadeias street, 115 27 Athens, Greece
e-mail: glamprou@med.uoa.gr