

# Rola szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białka LRP5 w metabolizmie tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy

The role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and LRP5 protein in metabolism of bone tissue and osteoporosis etiology

Hubert Wolski<sup>1,2</sup>, Natalia Drwęska-Matelska<sup>3</sup>, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz<sup>2,4</sup>, Zdzisław Łowicki<sup>5</sup>, Bogusław Czerny<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup> Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Podhalański Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Nowy Targ, Polska

<sup>2</sup> Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

<sup>3</sup> Zakład Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Polska

<sup>4</sup> Pracownia Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

<sup>5</sup> Zakład Farmakologii i Fitochemii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Polska

<sup>6</sup> Katedra Farmakologii Ogólnej i Farmakoekonomiki Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Polska

## Streszczenie

Osteoporoza jest metaboliczną chorobą szkieletu kostnego, objawiającą się zmniejszeniem gęstości mineralnej kości, zaburzeniami wewnętrznej mikroarchitektury tkanki kostnej i zwiększeniem ryzyka wystąpienia złamań. Z uwagi na olbrzymią skalę zachorowań, szczególnie wśród kobiet po menopauzie, osteoporoza stanowi obecnie istotny problem zdrowotny na całym świecie. Od kilku lat duże zainteresowanie wzbudzają badania dotyczące roli szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białka LRP5 w patomechanizmie osteoporozy, wskazujące również na możliwy udział wariantów polimorficznych genu kandydującego LRP5 w rozwoju tej choroby.

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych badań dotyczących szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz mechanizmu działania białka LRP5 w procesie metabolizmu tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy.

Słowa kluczowe: **osteoporoza / szlak Wnt/ $\beta$ -katenina / białko LRP5 /**

## Abstract

Osteoporosis is a metabolic bone disease, manifested by decreased bone mineral density, microarchitectural disturbances of bone tissue, and increased risk of bone fractures. Owing to large-scale morbidity, particularly among postmenopausal women, nowadays osteoporosis constitutes a significant global health problem. In recent years, much attention has been paid to the role of signaling Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and LRP protein in the pathomechanism of osteoporosis, indicating a possible contribution of polymorphic variants of the candidate LRP5 gene to disease development.

The goal of our study is to present contemporary research on signaling Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and mechanism of LRP protein action in the process of bone tissue metabolism and etiology of osteoporosis.

Key words: **osteoporosis / Wnt/ $\beta$ -catenin pathway / LRP5 protein /**

## Adres do korespondencji:

Hubert Wolski  
Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Podhalański Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II  
Polska, 34-400 Nowy Targ, ul. Szpitalna 14  
tel. 18/263-33-00  
e-mail: sekretariat@pszs.eu

Otrzymano: 15.04.2014  
Zaakceptowano do druku: 17.08.2014

Hubert Wolski et al. Rola szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białka LRP5 w metabolizmie tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy.

## Wstęp

Osteoporoza jest chorobą o podłożu wieloczynnikowym charakteryzującą się zmniejszeniem masy kostnej i zaburzeniem struktury kości. Raporty WHO wskazują, że w związku z wydłużeniem okresu życia osteoporoza przyjmuje obecnie skalę epidemii. Złamania są najgroźniejszą konsekwencją zaawansowanej postaci choroby. Dotyczą one głównie szyjki kości udowej, kręgów odcinka lędźwiowego kręgosłupa, nadgarstka oraz przedramienia. Złamania szyjki kości udowej należą do szczególnie niebezpiecznych gdyż w około 20% przypadków kończą się zgonem pacjenta w ciągu pierwszego roku po urazie [1].

Olbrzymia skala zachorowań, wysoki stopień ryzyka wystąpienia groźnych powikłań oraz istotne koszty związane z ich leczeniem, spowodowały, iż badania dotyczące etiopatogenezy osteoporozy są coraz liczniejsze [2]. W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się roli szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białek z grupy lipoproteinowych białek receptorowych (LRP – *lipoprotein receptor-related proteins*) w rozwoju osteoporozy [3, 4, 5].

Szlak Wnt stanowi jedną z dróg wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów (nazwa wywodzi się od pierwszych opisanych białek: Wg – *wingless*, Int – *MMTV integration site*) [6]. Rodzina Wnt obejmuje obecnie 19 sekrecyjnych glikoprotein zaangażowanych w niezwykle istotne procesy (różnicowanie i proliferacja komórek, apoptoza, morfogeneza, migracja, polaryzacja komórek) [6, 7, 8].

Dysfunkcję szlaku Wnt obserwowano w różnych typach nowotworów, chorobach neurodegeneracyjnych oraz metabolicznych [6, 9, 10]. Szlak Wnt może przebiegać z aktywacją ścieżki klasycznej (kanonicznej, zależnej od białka  $\beta$ -kateniny) lub kilku ścieżek nieklasycznych (niezależnych od  $\beta$ -kateniny) [8, 11]. Białka Wnt oddziałują na komórki docelową poprzez połączenie ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej - typu Frizzled oraz z rodziny LRP, funkcjonującymi jako koreceptory [12, 13]. Receptory LRP należą do rodziny lipoprotein o niskiej gęstości (LDL – *low density lipoprotein*) pełniących funkcje transportowe i sygnalizacyjne [13]. Receptor zbudowany jest z dużej domeny zewnątrzkomórkowej, pojedynczej domeny transmembranowej oraz cytoplazmatycznego ogona [14, 15, 16].

Białka Wnt po połączeniu z receptorami tworzą trimeryczny kompleks uruchamiający kaskadę transdukcji sygnału z błony komórkowej do jądra komórki docelowej gdzie dochodzi do pobudzenia ekspresji odpowiednich genów [4]. Do wewnątrzkomórkowych części receptorów przyłączone zostaje białko Dvl (Dishevelled) (receptor Frizzled) oraz aksyna (receptor LRP). Heterodimeryzacja białek Dvl oraz aksyny powoduje zmiany kompleksu i dalszą aktywację  $\beta$ -kateniny [17]. Uwolniona z kompleksu aktywna  $\beta$ -katenina ulega kumulacji w cytoplazmie, przemieszczeniu do jądra komórki i wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF (*T-cell transcription factor/lymphocyte enhancer factor*) należącymi do rodziny czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w szlak sygnalizacyjny Wnt [15]. Nieaktywny kompleks TCF/LEF wraz z korepresorami jest czynnikiem hamującym transkrypcję genów docelowych dla ścieżki Wnt [18, 19]. Przyłączenie  $\beta$ -kateniny do TCF wymusza zmianę jego konformacji, odłączenie korepresorów od TCF/LEF i aktywację kompleksu. Powstanie heterodimeru  $\beta$ -katenina – kompleks TCF/LEF jest kluczowym procesem potrzebnym do rozpoczęcia transkrypcji genu. Dochodzi do rekrutacji koaktywatorów (niektóre białka, acetylaza histonów), które powodują

*remodeling* chromatyny w okolicy miejsca wiązania TCF i pobudzają aktywność transkrypcyjną i ekspresję genów docelowych [15, 19, 20].

Zmniejszenie ekspresji białek Wnt lub blokowanie ich przyłączenia do receptorów powoduje degradację  $\beta$ -kateniny i inaktywację kaskady sygnałowej. Brak zewnątrzkomórkowej domeny receptora LRP5 odpowiedzialnej za wiązanie liganda powoduje stałą aktywację szlaku Wnt [3], a brak domeny wewnątrzkomórkowej zahamowanie aktywności tego szlaku [13].

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych badań dotyczących udziału szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz mechanizmu działania białka LRP5 w procesie metabolizmu tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy.

### Szlak sygnałowy Wnt/LRP5 a metabolizm tkanki kostnej

Kaskada transdukcji sygnału szlaku Wnt powoduje zwiększenie zaangażowania i różnicowania komórek macierzystych szpiku kostnego w kierunku stymulacji linii osteoblastów, jednocześnie zmniejszając stymulację w kierunku linii chondrogennych czy adipogennych [21]. Aktywacja szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina zapobiega również apoptozie dojrzałych osteoblastów i tym samym przedłuża ich żywotność [22]. Dodatkowo szlak sygnałowy Wnt/ $\beta$ -katenina zmniejsza różnicowanie osteoklastów poprzez stymulację syntezy oraz wydzielania osteoprotegeryny (OPG – *osteoprotegerin*), której zasadniczą funkcją jest regulacja resorpcji kości poprzez zahamowanie różnicowania osteoklastów w formy dojrzałe [23, 24].

Kanoniczny szlak sygnałowy Wnt w osteoblastach odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu powstawania kości, stąd zaburzenia jego aktywności mogą powodować poważne konsekwencje dla metabolizmu tkanki kostnej. Szlak Wnt/ $\beta$ -katenina podlega regulacji przez działanie antagonistów szlaku Wnt [25], do których należą sklerostyna, białka Dkk1 i Dkk2 (*Dickkopf-related protein-1, -2*) oraz białka Wise. Czynniki te przyłączając się do receptorów LRP5 blokują ich dostępność dla białek Wnt, inhibują w ten sposób klasyczną ścieżkę sygnalizacyjną i tym samym prowadzą do zahamowania osteoblastogenezy indukowanej szlakiem Wnt/ $\beta$ -katenina [5].

Liczne badania *in vivo* i *in vitro* na modelach zwierzęcych wskazują również na niezwykle istotny wpływ szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina na regulację metabolizmu tkanki kostnej. U myszy transgenicznych delecja genu *LRP5* (*LRP5<sup>-/-</sup>*) (*knock-out*) powodowała zahamowanie funkcji osteoblastów. U zwierząt tych obserwowano redukcję masy kostnej już w 2 tygodniu życia, obniżoną objętość gąbczastej struktury kręgow o 40%, złamania piszczeli z powodu małej masy kostnej w 8 tygodniu życia oraz wady w fenotypie kostnym. Dodatkowo analiza kręgow wykazała obniżony o 50% wskaźnik przylegania mineralnego (MAR – *mineral apposition rate*) [26, 27].

Myszy (*LRP5<sup>-/-</sup>*) wykazywały redukcję liczby osteoblastów w kościach długich o 50%, co korelowało z 50% spadkiem proliferacji osteoblastów. Natomiast brak genu *LRP5* nie miał wpływu na apoptozę czy różnicowanie osteoblastów, nie wpływał także na osteoklastogenezę i resorpcję kości, zmiany dotyczyły jedynie obniżenia aktywności i proliferacji osteoblastów [26]. Również sygnalizacja  $\beta$ -kateniny jest konieczna do zakończenia różnicowania osteoblastów i właściwego formowania kości [28]. Transgeniczne embryony myszy z delecją genu dla  $\beta$ -kateniny ( $\beta$ -cat c/c) pomimo uformowania chrząstki, pozbawione były kości.

Hubert Wolski et al. Rola szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białka LRP5 w metabolizmie tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy.

Różnicowanie osteoblastów zostało zatrzymane na etapie wczesnych prekursorów i ekspresji ulegały jedynie geny kolagenu typu I oraz fosfatazy alkalicznej [29].

U myszy transgenicznych (LRP5<sup>+/-</sup>) w 24 tygodniu życia wykazano pośrednie wartości objętości gąbczastej struktury kości kręgow. Z kolei u myszy o wzmocnionej funkcji genu *LRP5* (LRP5<sup>+/+</sup>) zaobserwowano zwiększenie masy kostnej. Myszy (LRP5<sup>+/+</sup>) w 8 tygodniu życia osiągały szczytową wartość masy kostnej, charakteryzowały się zwiększoną o 100% gęstością mineralną kości gąbczastej dystalnej części kości udowej [27]. Dodatkowo zwierzęta te wykazywały zwiększoną wytrzymałość kości kręgosłupa i biodra, przy zachowaniu normalnego kształtu i wielkości kości [30].

### LRP5 a osteoporoza

W trakcie wieloletnich badań nad genetycznym podłożem osteoporozy wskazano na istnienie w genomie regionów sprzężonych z fenotypem osteoporotycznym. Wyniki tych analiz sugerują obecność przynajmniej jednego ważnego *locus* dla regulacji masy kostnej w lokalizacji 11q12-13, w której zlokalizowany jest gen *LRP5*. Mutacje w tym *locus* związane są z występowaniem 3 jednostek chorobowych dotyczących szkieletu kostnego: *osteoporosis pseudoglioma*, autosomalnego dominującego fenotypu zwiększonej masy kostnej (HBM – *high bone mass*) oraz autosomalnej dominującej osteoporozy typu I [31]. Jednocześnie zasugerowano również wpływ bardziej subtelnych zmian w genie *LRP5*, jak warianty polimorficzne pojedynczego nukleotydu, na gęstość mineralną kości (BMD – *bone mineral density*) czy ryzyko występowania złamań w populacji [14]. Liczne badania wskazują również na związek genu *LRP5* z etiologią osteoporozy u kobiet po menopauzie.

Sassi i wsp. badali związek polimorfizmów Ala1330Val w eksonie 18 oraz Val667Met w eksonie 9 genu *LRP5* z etiologią osteoporozy u 566 kobiet po menopauzie w populacji tunezyjskiej. Nie wskazano związku polimorfizmu Val667Met z etiologią osteoporozy natomiast zmutowany wariant polimorfizmu Ala1330Val (1330Val, allel T) związany był z obniżeniem wartości T-score BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa ( $p=0,047$ ). Obserwacji takiej nie potwierdzono dla T-score BMD szyjki kości udowej i polimorfizmu Ala1330Val [32].

Również Xuan i wsp. badali związek polimorfizmu Ala1330Val *LRP5* z markerami obrotu kostnego u kobiet po menopauzie z osteoporozą i cukrzycą typu 2 w populacji szanghajskiej (354 kobiet, 4 grupy: z osteoporozą, cukrzycą typu 2, z cukrzycą typu 2 oraz osteoporozą oraz grupa kontrolna). Oszacowano, że w grupie z osteoporozą wartość BMD L2-L4 była wyższa u pacjentów z genotypem CC w porównaniu do pacjentów z genotypem heterozygotycznym CT oraz zmutowanym TT ( $p<0,05$ ). Obserwacje te potwierdzono również po uwzględnieniu wieku oraz wskaźnika masy ciała (BMI – *body mass index*) ( $p<0,01$ ) [33]. Podobnie, w badaniu obejmującym 1012 Chinek wykazano, że zmutowany allel T polimorfizmu Ala1330Val koreluje z niższą wartością BMD w szyjce kości udowej [34].

Analiza 4 polimorfizmów genu *LRP5*: rs1784235, rs491347, rs4988321 (Val667Met) oraz rs4988330 w grupie 578 zdrowych kobiet po menopauzie z populacji greckiej wykazała silny związek polimorfizmów rs1784235, rs491347, rs4988321 z nieskorygowaną surową wartością BMD kręgosłupa. Ponadto wskazano na związek polimorfizmu Val667Met ze skorygowaną wartością

BMD L2-L4, gdzie nosicielstwo genotypów zawierających allel A wiązało się z istotnie niższą wartością BMD kręgosłupa w porównaniu z genotypem GG ( $p=0,002$ ). Co ciekawe w badaniu tym wykazano interakcję polimorfizmu Val667Met z przyjmowaniem wapnia - spożywanie wapnia w większych dawkach zmniejszało negatywny efekt tego polimorfizmu na wartość BMD [35].

W grupie kobiet po menopauzie z osteoporozą z populacji meksykańskiej wśród czterech analizowanych polimorfizmów genu *LRP5* (C/T rs3736228 - Ala1330Val, G/A rs4988321 - Val667Met, T/C rs627174 and T/C rs901824) wykazano istotne różnice ( $p=0,039$ ) w częstości występowania genotypów jedynie dla polimorfizmu Val667Met. Dodatkowo analiza haplotypów pokazała znaczący związek haplotypu TACT z wyższym ryzykiem rozwoju osteoporozy ( $p=0,006$ ), podczas gdy haplotyp CGTT wykazywał istotny związek z niskim ryzykiem wystąpienia tej choroby ( $p=0,007$ ) [36].

Obszerne badanie obejmujące około 38 tysięcy osób z 18 jednostek badawczych w Europie i Ameryce Północnej dotyczące polimorfizmów Val667Met i Ala1330Val genu *LRP5* wykazało, że zmutowane allele 667Met oraz 1330Val były skorelowane z obniżoną wartością BMD L2-L4 i szyjki kości udowej. Obydwa zmutowane allele były również związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia złamań [37].

Odmienne wyniki otrzymano dla populacji słoweńskiej gdzie w przypadku polimorfizmu Ala1330Val genu *LRP5* nie wykazano istotnej korelacji zarówno z wartością BMD L2-L4, jak również w szyjce kości udowej [38].

W populacji zdrowych 647 Chinek analizowano 3 polimorfizmy genu *LRP5* (Gln89Arg, Asn740Asn, Ala1330Val). Wykazano, iż polimorfizmy Gln89Arg oraz Asn740Asn były skorelowane z wartością BMD szyjki kości udowej. U nosicieli genotypów homozygotycznych Gln89Gln polimorfizmu Gln89Arg oraz TT polimorfizmu Asn740Asn odnotowano istotnie większą wartość BMD w szyjce kości udowej w porównaniu z nosicielami innych genotypów [39].

Panach i wsp. przeprowadził analizę asocjacji polimorfizmu rs312009 zlokalizowanego w miejscu przyłączenia czynnika transkrypcyjnego RUNX2 w genie *LRP5* z BMD w grupie 721 kobiet hiszpańskich po menopauzie. Wykazano istotny związek badanego polimorfizmu z mniejszą wartością BMD L2-L4 u kobiet z genotypem CC. Kobiety te wykazywały większe ryzyko wystąpienia osteoporozy ( $p=0,001$ ) w porównaniu do kobiet nosicielek genotypów TT oraz TC [40].

### Podsumowanie

Prezentowane powyżej badania pokazują na związek polimorfizmów genu *LRP5* z etiologią osteoporozy. Pozytywny związek polimorfizmów z fenotypowymi cechami charakterystycznymi dla osteoporozy sugeruje istotny wpływ wariantów genetycznych na rozwój choroby. Wydaje się, że otrzymane rezultaty pozostają w zależności od badanych populacji, liczebności grup badanych, czy wpływu czynników środowiskowych. Jednocześnie wyniki analizy haplotypów pokazują na konieczność uwzględnienia analizy wielu polimorfizmów genu *LRP5* w genetycznej diagnostyce osteoporozy.

Silne zaangażowanie wariantów genu *LRP5* w patomechanizm zmian osteoporotycznych oraz niewątpliwy wpływ aktywności receptora LRP5 na metabolizm tkanki kostnej kostny wskazują na ścieżkę sygnałową Wnt w rozwoju osteoporozy.

Hubert Wolski et al. Rola szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina oraz białka LRP5 w metabolizmie tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy.

Szczegółowe poznanie procesów mających wpływ na funkcję kaskady szlaku Wnt może pozwolić w przyszłości na pozyskanie nowych celów terapeutycznych w patomechanizmie osteoporozy.

#### Oświadczenie autorów:

1. Hubert Wolski – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Natalia Drwęska-Matelska – współautor tekstu pracy, zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu.
3. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz – współautor tekstu pracy, zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu.
4. Zdzisław Łowicki – współautor tekstu pracy, aktualizacja literatury.
5. Bogusław Czerny – ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu, korekta i aktualizacja literatury.

#### Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

#### Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

#### Piśmiennictwo

1. Bryl N, Horst-Sikorska W, Ignaszak-Szczepaniak M, [et al.]. Influence of social competence of physicians on patient compliance with osteoporosis medications - a study on Polish postmenopausal women. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 511-516.
2. Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. *J Womens Health (Larchmt)*. 2014, 23, 563-572. doi:10.1089/jwh.2013.4611.
3. Liu G, Bafico A, Harris VK, Aaronson SA. A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol Cell Biol.* 2003, 23, 5825-5835.
4. Li Y, Bu G. LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future Oncol.* 2005, 1, 673-681.
5. Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis; *Maturitas.* 2014, 78, 233-237.
6. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004, 20, 781-810.
7. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 2009, 19, 119-129.
8. Kozłowski K, Dobrzyń A. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. *Postępy Hig Med Dosw.* 2013, 67, 1098-1108.
9. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1653, 1-24.
10. Sethi JK, Vidal-Puig A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J.* 2010, 427, 1-17.
11. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008, 4, 68-75.
12. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, [et al.]. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.* 2000, 407, 535-538.
13. Tamai K, Semenov M, Kato Y, [et al.]. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000, 407, 530-535.
14. Balemans W, van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology.* 2007, 148, 2622-2629.
15. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones.* 2007, 6, 279-294.
16. Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, [et al.]. Insights into Wnt binding and signaling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature.* 2001, 412, 86-90.
17. Cliffe A, Hamada F, Bienz M. A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol* 2003, 13, 960-966.
18. Chen CM, Struhl G. Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of Drosophila. *Development.* 1999, 126, 5441-5452.
19. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, [et al.]. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of  $\beta$ -catenin in vertebrates. *EMBO J.* 2000, 19, 1839-1850.
20. Lévy L, Wei Y, Labalette C, [et al.]. Acetylation of  $\beta$ -catenin by p300 regulates  $\beta$ -catenin-Tcf-4 interaction. *Mol Cell Biol.* 2004, 24, 3404-3414.
21. Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast pro-genitors. *Development.* 2006, 133, 3231-3244.
22. Almeida M, Han L, Bellido T, [et al.]. 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.* 2005, 280, 41342-41351.
23. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, [et al.]. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005, 8, 751-764.
24. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9, (Suppl 1), S1. doi:10.1186/ar2165.
25. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013, 5, 15081.
26. Kato M, Patel MS, Levasseur R, [et al.]. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 2002, 157, 303-314.
27. Babij P, Zhao W, Small C, [et al.]. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res.* 2003, 18, 960-974.
28. Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006, 7, 33-39.
29. Hu H, Hilton MJ, Tu X, [et al.]. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development.* 2005, 132, 49-60.
30. Akhter MP, Wells DJ, Short SJ, [et al.]. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone.* 2004, 35, 162-169.
31. van Hul E, Gram J, Bollerslev J, [et al.]. Localization of the gene causing autosomal dominant osteopetrosis type I to chromosome 11q12-13. *J Bone Miner Res.* 2002, 17, 1111-1117.
32. Sassi R, Sahli H, Souissi C, [et al.]. Association of LRP5 genotypes with osteoporosis in Tunisian post-menopausal women. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2014, 15, 144. doi:10.1186/1471-2474-15-144.
33. Xuan M, Wang Y, Wang W, [et al.]. Association of LRP5 gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus and osteoporosis in postmenopausal women. *Int J Clin Exp Med.* 2014, 7, 247-254.
34. Liu JM, Zhang MJ, Zhao L, [et al.]. Analysis of recently identified osteoporosis susceptibility genes in Han Chinese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, 95, 112-120.
35. Stathopoulou MG, Dedoussis GV, Trovas G, [et al.]. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms are associated with bone mineral density in Greek postmenopausal women: an interaction with calcium intake. *J Am Diet Assoc.* 2010, 110, 1078-1083.
36. Falcón-Ramírez E, Casas-Avila L, Cerda-Flores RM, [et al.]. Association of LRP5 haplotypes with osteoporosis in Mexican women. *Mol Biol Rep.* 2013, 40, 2705-2710.
37. van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, [et al.]. GENOMOS Study. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA.* 2008, 299, 1277-1290.
38. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, [et al.]. Analysis of association of LRP5, LRP6, SOST, DKK1, and CTNBB1 genes with bone mineral density in a Slovenian population. *Calcif Tissue Int.* 2009, 85, 501-506.
39. Zhang ZL, Qin YJ, He JW, [et al.]. Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin.* 2005, 26, 1111-1116.
40. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, [et al.]. Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women. *J Bone Miner Metab.* 2013 Dec 14. doi:10.1007/s00774-013-0539-5.