

Wnt 신호전달 - 최근의 연구 동향 및 질병과의 연관성?

서울시립대학교 생명과학과

조 익 훈

Wnt Signal Transduction and Its Involvement in Human Diseases

Eek-Hoon Jho

Department of Life Science, The University of Seoul, Korea

서 론

Wnts는 세포로부터 분비되는 cysteine이 많은 당 단백질로서, 주변세포의 receptor에 결합하여 활성화된 receptor를 통해 여러 가지 단계를 거쳐 많은 유전자의 발현을 조절함으로써, 다양한 생명 현상을 조절한다고 알려져 있다[1~3]. Wnt gene은 처음에 mouse mammary tumor virus (MMTV)의 insertion에 의해서 유도되는 많은 종류의 tumor에서 공통적으로 발견되는 genomic sequence로서, 최초의 cellular oncogene으로 밝혀졌으며 *int*라고 명명되었다[4]. 이 결과는 정상 세포가 암의 원인 유전자(proto-oncogene)를 갖고 있다는 사실을 의미하고, 이 발견으로 1989년에 Michael Bishop 박사와 Harold Varmus 박사가 Nobel상을 공동 수상하게 되었다. 그 후에 Dr. Nusse group에 의해서 *Drosophila*의 morphogenesis 과정에서 segment polarity gene이라고 알려진 *wingless*가 *int-1*의 homolog라는 사실이 밝혀진 후로 *int*가 암의 형성뿐만 아니라, 세포 사이의 communication을 조절하는 signal로서 발생과정에서 중요한 역할을 한다고 제안되었고[5], *Wingless* (*wg*)와 *int-1*이 homolog gene임이 밝혀진 후, *wg*와 *int*를 합쳐서 Wnt라고 부르게 되었다[6].

Wnt signaling의 연구 동향

Wnt signaling의 연구 분야에는 현재 노벨상을 받은 4명의 연구자(Dr. Harold Varmus (1989 수상), Dr. Eric Wieschaus (1995), Dr. Paul Greengard (2000), Dr. David Baltimore (1975) 와 Stanford 대학의 Dr. Roel Nusse를 비롯한 13명의 Howard Hughes Medical Institute (HHMI) investigators 들을 포함한 많은 연구자들이 주 연구 또는 부

연구 주제로서 연구하고 있을 정도로 치열한 경쟁 하에 최첨단의 연구를 수행하고 있다(HHMI investigators의 총 수는 약 300명, www.hhmi.org). 이들은 Wnt signaling연구의 초기 단계부터 거의 20여 년 동안 연구비의 제약 없이 세계 최고 수준의 연구를 수행하고 있다. 이들 연구자들의 공통적인 경향은 초기에는 *Xenopus*나 *Drosophila*를 대상으로 Wnt signaling의 발생 단계에서의 기능 연구를 해 오다가, 최근에는 Wnt signaling을 조절하는 small molecule의 High Throughput Screening (HTS)을 수행하거나 다양한 병인 기전으로서의 Wnt signaling의 역할을 밝히고 치료 방법을 개발하고자 하는 연구를 수행하고 있다는 점이다. 또한 Stanford 대학의 Dr. Roel Nusse는 Wnt gene homepage를 개설하여 Wnt signaling에 관련된 많은 자료를 정리하고 수시로 update하여 Wnt signaling 연구의 진입 장벽을 낮추는 역할도 수행하고 있다(<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.htm>). 지난 20여 년간의 Wnt 신호 전달의 연구 방향을 간단히 요약하면 크게 4가지 방향으로 요약된다.

1. Wnt signaling의 신호전달에 관여하는 새로운 components의 발굴 및 기능 연구

Wnts가 ligands로 작용함으로써 암의 형성 및 발생과정에서 중요한 역할을 하고 있다는 사실이 밝혀진 후, Wnts의 receptor 및 세포 내의 Wnt 신호전달에 관련된 components의 발굴과 Wnt signaling에 의해서 조절되는 target gene의 발굴에 관련된 많은 연구가 이루어졌다. 90년대 초반에는 *Drosophila*를 이용한 유전자 발생의 연구를 통하여 Wnt signaling pathway를 확립하기 위한 많은 연구가 수행되었다. Wnt signaling에 관한 연구는 암의 원인 유전자로서 시작되었지만, 90년대 초반에 국내외 연구자들에게는 비교적 생소한 발생 유전학 분야에서 엄청나게 많은 연구가 이루어

졌기 때문에 국내에서의 연구가 활성화되지 않은 이유라고 생각된다. 하지만, 90년대 후반에는 기본 pathway가 확립된 바탕 위에서 그 signaling을 조절하는 component의 발굴 및 생화학적 연구가 시작됨으로써, 발생 유전학 분야의 경험에 그렇게 많지 않은 신호전달을 연구하는 연구자들이 참여하게 되어서 Wnt signaling의 연구 분야가 더욱 확대되게 되었다. 또한, Wnt signaling이 꼬마 선충 (*C. elegans*), 초파리 (*Drosophila*), 개구리 (*Xenopus*), zebra fish, mouse 및 human에 이르기까지 공통적인 pathway를 통해 전달된다는 사실이 밝혀지고, cancer를 비롯한 다양한 질병과의 연관성이 보고되면서 국내에서도 많은 연구자들이 관심을 갖게 되었다.

2. Wnt signaling의 발생 및 세포 분화에 있어서의 역할 연구

위에서 언급한 바와 같이 Wnt signaling의 연구는 *Drosophila*를 비롯한 다양한 종류의 model system에서 발생과정에서의 역할을 규명하는 연구가 주로 수행되어 왔다. 현재 mouse의 경우는 19가지의 Wnt genes가 알려져 있고, 그 receptor로 알려진 Frizzleds는 10가지가 밝혀져 있다 (<http://www.stanford.edu/~rmusse/wntwindow.htm>). 대부분의 Wnt gene들이 knock-out된 mice가 제작되었고, 특정 Wnt가 knock-out되었을 때 다양한 표현형을 나타내었다. 가령 Wnt1이 Knock-out되었을 때는 midbrain과 cerebellum의 형성이 일어나지 않았고[7, 8], Wnt4가 knock-out된 mice는 kidney defects를 나타내고[9], Wnt5a의 경우는 truncated limbs의 phenotype을 나타내어서[10], Wnt signaling이 발생과정에서 다양한 역할을 수행하고 있다는 사실을 시사하였다.

세포가 특정 fate로 분화하는 과정에서 Wnt signaling이 positive 또는 negative하게 작용한다는 사실을 보이는 실험도 상당히 많이 수행되었으며, 특히 최근에는 stem cell의 분화 조절에 대한 관심이 증대되면서 hematopoietic stem cell의 proliferation이나 embryonic stem cell의 neuronal fate로의 분화에서 Wnt signaling의 역할이 발표되고 있다 [11~13]. 하지만, stem cell의 분화에 관련된 연구 결과는 연구자마다 상반된 결과가 보고되고 있어서, 실제 *in vivo*에서의 역할은 분명치 않다고 생각된다.

3. 모델 동물을 이용하여 Wnt signaling의 이상에 의해서 유도되는 질병들의 연구

Wnt signaling에 이상이 생기면 cancer 및 기형 발생이 유도 된다는 사실이 많이 알려져 있었기 때문에 다양한 질병의 병인 기전이나 치료제의 독성을 검증하기 위해서 많은 동물 모델이 제작되었고, 현재도 많이 사용되고 있다. 가령 Wnt signaling의 key effector인 β -catenin의 mutation이나

tumor suppressor로 알려진 Adenomatous polyps coli (APC)의 truncation은 사람의 다양한 종류의 cancer에서 발견되는데, 이들과 유사한 mutation을 갖는 동물 모델들은 cancer의 유발 기전이나 항암제의 유효성 및 독성검사를 검증하는데 이용되고 있다[14,15]. 최근에 들어서는 cancer나 발생과정에서의 문제뿐만 아니라 adipogenesis[16,17], osteoporosis[18,19], schizophrenia[20,21] 및 Alzheimer's disease[22~24] 등과 같은 다양한 성인 질환에도 Wnt signaling의 이상과 연관성이 있다는 보고가 많이 나와서, 기존의 cancer나 발생에서의 Wnt signaling의 역할 규명이라는 주제에서 다양한 성인 질환의 병인 요인으로서의 Wnt signaling의 역할 규명이라는 새로운 방향으로 연구가 진행되고 있다.

4. Wnt signaling을 조절할 수 있는 small molecule의 발굴 및 target identification

Chemical genomics 방법을 통하여 Wnt signaling을 조절하는 small molecule을 발굴하려는 시도는 전세계의 유명 제약 회사들에서 모두 수행되고 있다고 보아도 무리가 없을 것이다. Rockefeller 대학의 Dr. Paul Greengard (2000년 Nobel 상 수상)는 HTS를 사용하여 Wnt signaling을 regulation하는 small molecule들을 발굴하여 최근에 Nature medicine에 보고한 바 있다[25]. 특히 Dr. Paul Greengard의 경우는 HTS를 수행하여 Wnt signaling을 조절하는 small molecule들을 발굴하였고, embryonic stem cell에서의 Wnt signaling의 역할을 규명하는 연구를 수행하고 있다.

Wnt 신호전달의 전반적인 개요

본 review에서는 Wnts가 발생과정에서 morphogen으로 작용하여 cell과 cell 간의 interaction을 조절함에 따라 적절한 형태의 발생을 조절하는 현상의 설명보다는, 외부에서 Wnt signaling이 왔을 때 세포 표면으로부터 핵 내부로의 신호 전달의 과정을 중심으로 설명하고자 한다 (See reviews in[26,27] for morphogenic role of Wnt signaling).

세포 내에서의 Wnt 신호전달은 key effector molecule인 β -catenin을 통하여 전달되는 “canonical signaling pathway”와 세포 내 calcium의 농도를 조절하여서 PKC의 활성을 변화시키거나 Rac이나 Rho와 같은 small G protein의 활성화를 통해 JNK activity를 조절하는 “non-canonical signaling pathway”로 나눌 수 있다 (Fig. 1). 유전학적, 생화학적인 방법을 통하여 많은 연구가 canonical pathway의 규명에 집중이 되어 왔지만, 최근에는 “non-canonical pathway”의 생물학적 중요성이 인식되면서 이 분야의 연구가 점차 활성화되는 추세이다.

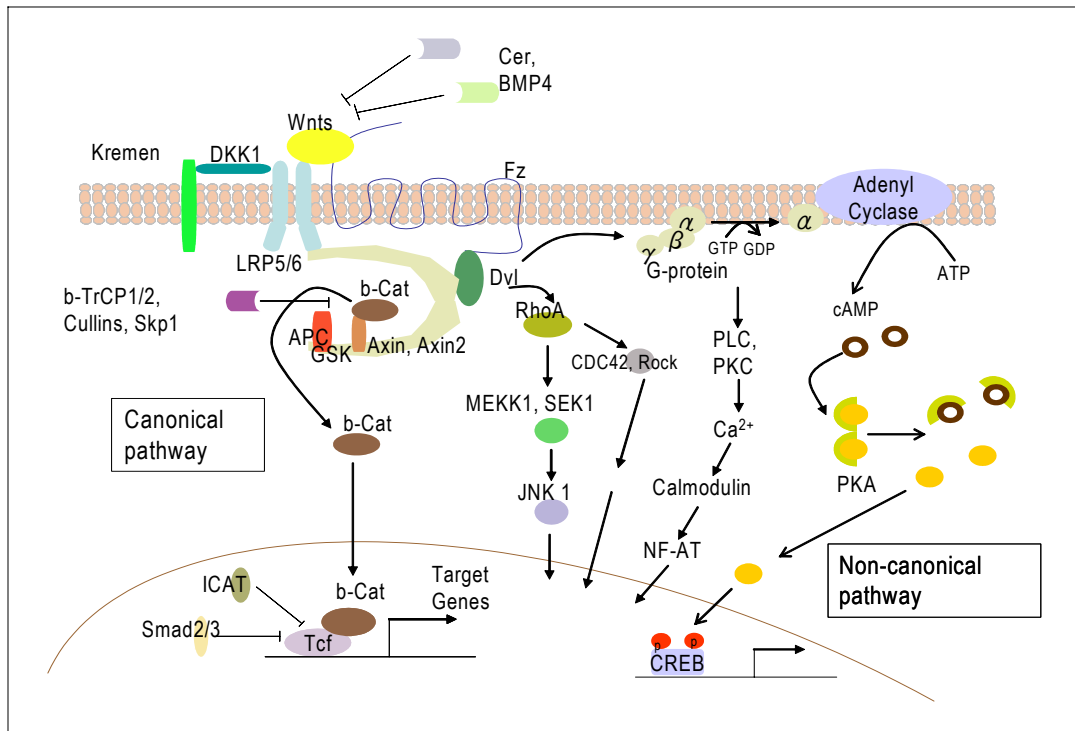


Fig. 1. Schematic diagram for Wnt signaling.

1. Canonical Wnt signaling pathway

세포가 외부로부터 Wnt에 의해 자극이 되지 않을 때, cytoplasmic β -catenin은 Axin과 APC protein complex 내에서 casein kinase I과 GSK3 β 라는 kinase에 의해서 phosphorylation 된다 (Fig. 2). 인산화된 β -catenin은 β -TrCP E3 ubiquitin ligase에 의해 인식되고 ubiquitination/proteasome pathway를 통해서 분해되어 cytoplasm내의 β -catenin level이 낮게 유지된다. 하지만, 외부로부터 Wnt의 자극이 오게 되면 β -catenin의 degradation complex에서 scaffolding protein으로 작용하는 Axin이 degradation complex로부터 빠져나가고, GSK3 β 의 activity가 inhibition 되어서, β -catenin의 phosphorylation이 억제된다. 이 unphosphorylated β -catenin은 분해가 되지 않아서 cytoplasmic β -catenin level이 증가되는데, 이 안정화된 β -catenin은 핵 내로 이동하여 transcription factor인 Tcf (또는 LEF)와 결합하여 다양한 유전자의 발현을 조절하게 된다 (Fig. 2). Wnt signaling의 조절에 이상이 생기면 cancer가 유발되거나 발생에 이상이 생기는 이유는 β -catenin/Tcf signaling에 의해 cell cycle 조절에 관여하는 *c-myc* 또는 *cyclin D1*이나, 발생에서 중요한 transcription factor로 작용하는 *simois*나 *brachury* 등과 같은 유전자의 발현이 조절되기 때문이라고 설명된다.

본 review에서는 canonical Wnt signaling의 전달 과정을 세포 외부, cytoplasm 내부와 핵 내에서 일어나는 과정들로 나누어서, 그 과정에 관여하는 molecule들을 중심으로 설명

하고자 한다.

1) 세포 외부에서 일어나는 canonical Wnt 신호전달

현재 mouse의 경우는 19가지의 Wnt genes가 알려져 있는데, cytoplasmic β -catenin의 level을 증가시킬 수 있는 Wnt1, Wnt3a 등은 canonical Wnts로 분류되고, Wnt 5a와 같이 β -catenin의 level을 높이지 않고 PKC나 CamKII 등을 활성화시키는 것들을 non-canonical Wnts로 분류한다[28, 29]. 많은 세포들에서 Wnts나 Wnts의 receptor로 알려진 Fz의 발현 양상을 조사해보면, 몇 가지의 Wnts나 Fz만이 발현되고, 그 발현 패턴은 세포마다 차이가 있는데, 어떻게 각 세포마다 특이적으로 Wnts나 Fz의 발현이 조절되는지는 앞으로 더 많은 연구가 필요한 분야이다. 많은 연구자들이 의문을 갖는 분야는 어떻게 특정 Wnts가 specificity를 가지면서 다양한 biological 현상을 조절하는지에 관한 문제이다. 이러한 specificity는 다양한 Wnts의 발현 pattern이 다르고 특정 Wnts와 Fz간의 affinity 차이에 의해서 조절된다는 부분적인 설명이 있긴 하지만[30,31], 실제로 *in vivo*에서 Wnt signaling이 엄격한 specificity를 갖고 전달되는지에 대한 여부도 확실치 않아서, 아직 특정 Wnt와 Fz specificity를 설명하기에는 부족함이 많은 실정이다. 이 문제는 Wnt/Fz interaction을 target으로 Wnt signaling을 조절하는 small molecule을 이용하고자 하는 시도의 성패와 직결된다고 할 수 있다. 가령 chondrogenesis 과정에 관련된 특이적인 Wnt와 Fz가 있다면, 그 Wnt와 Fz의 interaction을 조절하는

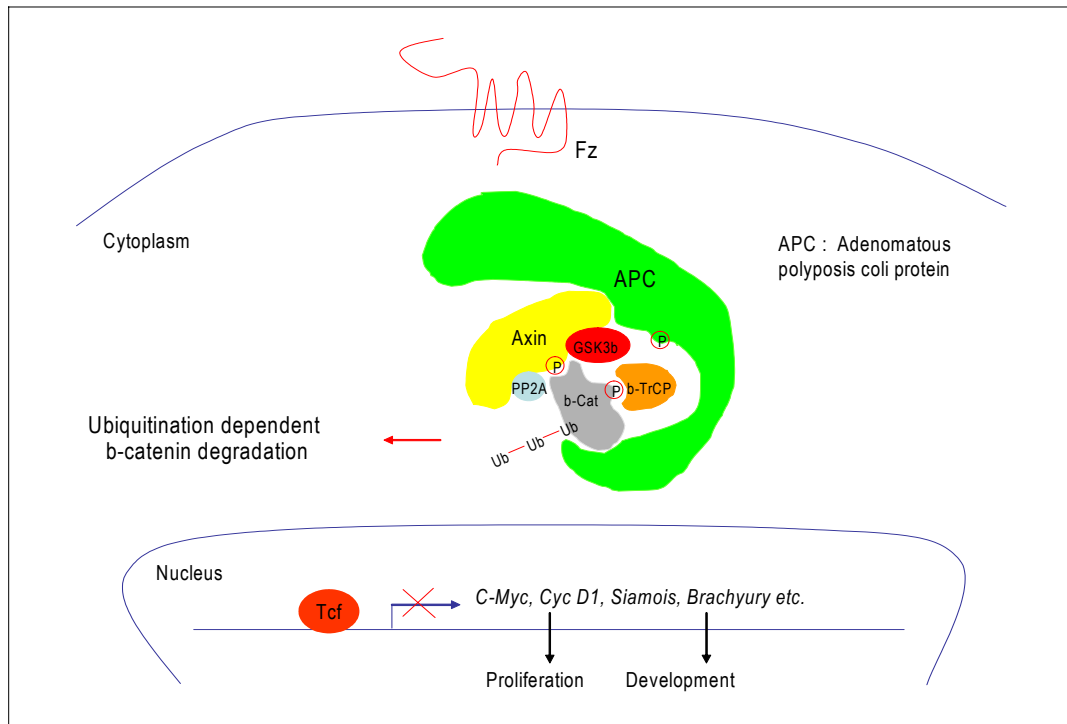


Fig. 2. Simplified version of canonical Wnt signaling.

small molecule은 다른 조직에서 Wnt signaling을 activation 시키는 부작용을 최소로 하면서 골다공증의 약으로 사용할 수 있는 가능성이 있다고 할 수 있다.

Wnts의 co-receptor로 비교적 최근에 밝혀진 Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP-5)의 mutation은 canonical Wnt signaling의 전달에 이상을 유발하여, bone의 형성에 문제를 일으킨다고 알려졌다[18]. Lrp 5/6의 cytoplasmic domain은 Wnt signaling이 존재할 때 Axin의 docking site로 작용하여, β -catenin degradation complex로부터 Axin을 제거함으로써, β -catenin의 degradation을 억제한다고 밝혀졌다[32,33].

Wnt signaling은 Cerberus, FrzB 및 Dickkopf1 등에 의해서 세포 외부에서 inhibition될 수 있다(Fig. 1, reviews in[34]). Cerberus와 FrzB는 Wnt와 Fz이 binding하는 것을 blocking하고 Dickkopf1은 Lrp에 결합함으로써 Wnt signaling을 inhibition한다. 특히 Dickkopf1은 Wnt/ β -catenin signaling의 downstream target gene으로서 negative feedback 작용으로서 Wnt signaling을 조절한다고 밝혀졌다[35,36].

2) Cytoplasm 에서 일어나는 canonical Wnt 신호전달

아직 기전이나 신호전달에 관련된 molecule들이 모두 밝혀진 것은 아니지만, Wnt 신호전달의 연구 분야 중 생화학적으로 가장 많이 연구가 이루어진 부분이다. 위에서 언급한 바와 같이 ligand인 Wnt의 존재 여부에 따른 key effe-

ctor molecule인 cytoplasmic β -catenin의 level을 조절하는 것이 핵심이라고 할 수 있다(Fig. 2). Cytoplasmic β -catenin은 scaffold protein인 Axin, tumor suppressor라고 알려진 APC protein의 complex 내에서 casein kinase I 과 GSK3 β 에 의해 phosphorylation 된다. 이 phosphorylated β -catenin은 ubiquitin-proteasome pathway에서 degradation target을 인식하는 역할을 하는 E3 ligase의 일종인 β -TrCP에 의해 인식되어 degradation이 진행된다.

Axin은 약 100 KDa 되는 protein으로 Axin complex에 있는 거의 모든 protein들 (APC, GSK3 β , β -catenin, protein phosphatase 2A (PP2A), Dvl 등)과 direct하게 interaction 하는 domain을 갖고 있어서, β -catenin의 phosphorylation/dephosphorylation에 관여하는 molecule들을 서로 근접한 거리에 있게 하는 역할을 한다[37,38]. Axin이 없거나 mutation이 일어나서 β -catenin binding domain이 truncation 될 경우, GSK3 β 에 의한 β -catenin의 phosphorylation 일어나지 않아서 β -TrCP가 인식할 수 없게 되어 cytoplasmic β -catenin level의 증가가 유도된다. 이 complex 내에서 APC의 생화학적인 기전은 명확하지 않지만, APC를 coding하는 유전자에 mutation이 일어나서 β -catenin 또는 Axin binding sites가 truncation 되면 β -catenin을 degradation 할 수 없게 된다. 따라서, Axin이나 APC의 mutation은 β -catenin의 signaling을 활성화시키는 결과를 낳게 되어 tumor의 형성을 유도하게 되고, 다양한 human cancer에 있어서 Axin과 APC의 mutation이 발견되기 때문에 이들은 tumor supp-

ressor로 간주된다[39~41].

Wnt가 receptor인 Fz에 binding하게 되면 cytoplasm에 존재하는 Dishevelled (Dvl or Dsh)가 casein kinase II에 의해 phosphorylation되면서 membrane에 있는 Frizzled로 이동하게 된다. 어떻게 Wnt와 Fz의 결합이 CKII에 의한 Dvl의 phosphorylation을 유발하고 membrane으로 이동하게 하는지는 밝혀지지 않았지만, 이 결과로 Dvl가 직접 또는 간접적으로 GSK3 β 의 활성을 억제하게 된다[42~43]. 따라서 GSK3 β 는 더 이상 β -catenin을 phosphorylation시킬 수 없어서 cytoplasmic β -catenin의 level이 증가하게 된다.

Wnt/Fz의 결합에 의한 cytoplasmic β -catenin의 level을 증가시키는 또 다른 기전은 β -catenin의 down-regulation에 필수적인 Axin이 Wnt의 co-receptor인 LRP5/6로 이동되어 degradation되는 것으로 설명된다[32~33]. 이때 Axin complex 전체가 이동하는지 아니면 Axin만이 complex로부터 분리되어 이동하는지 분명치 않다. 또한 어떤 기전에 의해서 Wnt/Fz signaling이 Axin complex로 전달되며, Axin이 이동되고 분해되는지도 상당히 중요한 문제라고 여겨진다. 아마도 PP2A에 의한 dephosphorylation이 Axin의 이동 및 degradation에서 중요한 역할을 하리라고 생각되며, 또한 Axin complex 내에 있는 새로운 단백질의 발굴이 예상된다고 할 수 있다.

3) 핵 내에서 일어나는 canonical Wnt 신호전달

Wnt/ β -catenin signaling에 의해서 발현이 조절되는 대부분의 유전자는 promoter 부위에 Groucho라는 단백질과 Tcf/LEF라는 단백질이 결합하여 transcription을 억제한다. Wnt signaling이 존재하는 상태에서 증가된 cytoplasmic β -catenin이 핵 내로 이동하게 되면, Groucho를 밀어내고 Tcf/LEF와 결합하여 transcription을 활성화시킴으로써 많은 유전자의 발현을 조절하게 된다. 하지만, 실제로는 이 과정을 negative 또는 positive 하게 조절하는 많은 단백질이 존재하여 in vivo에서는 Wnt signaling의 전달을 정교하게 조절하는 것이 가능하다고 여겨진다. 가령 ICAT라는 단백질은 β -catenin과 Tcf/LEF와의 결합을 방해함으로써 Wnt signaling의 전달을 억제하고[45], p300/CBP의 histone acetyl transferase activity는 Tcf/LEF가 결합한 부위의 chromosomal remodeling을 유발함으로써 Tcf/ β -catenin에 의한 transcription에 positive하게 작용한다고 알려져 있다[46~47].

현재까지 약 80여 가지의 유전자의 발현이 조절된다고 알려져 있으며, 그 중 많은 유전자가 cancer의 형성 및 진행과 관련이 있거나, 발생 및 분화의 조절과 연관이 되어있다 (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.htm>). 발현이 증가되는 대표적인 유전자인 c-myc과 cyclin D1 등은 cell proliferation에 관여하고, transcription factor로 알려진 siamois나 brachyury 등은 배아 발생이나 세포 분화에서 중요

한 역할을 하고 있다.

핵 내로 들어간 β -catenin은 transcription을 활성화시킨 후, Wnt signaling 존재 하에 level이 증가되고 핵 내로 같이 들어오는 APC에 의해서 cytoplasm으로 export된다고 제안되었다[48,49]. 아직도 정확한 기전에 관해서는 논란의 여부가 있지만, APC의 tumor suppressor로서의 역할은 직접적인 β -catenin의 degradation이 아니라, 핵 내의 β -catenin을 degradation이 일어나는 cytoplasm의 Axin complex로 이동시키는 shuttle vector로 여겨진다. 따라서 Wnt signaling이 존재할 때 핵 내로 들어온 β -catenin은 APC가 truncate된 경우 계속해서 핵 내에 존재하게 되어 비정상적인 target 유전자의 발현을 유도하여 tumor를 형성한다고 이해되고 있다.

2. Non-canonical Wnt signaling pathway

위에서 설명한 canonical Wnt 신호전달 방법 외에 전달되는 Wnt 신호전달을 총칭하는 것으로 지금까지는 이 신호전달 과정에 관여하는 components들이 밝혀지지 않았거나 기능이 잘 밝혀지지 않아서 알려진 것이 많지 않다. 하지만, 최근 들어서는 새로운 components가 발굴되고 canonical Wnt signaling의 상호 조절에 의한 다양한 생물학적 현상에서 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀져서 향후 몇 년 이내에 많은 연구 결과가 기대되는 분야이다.

간단히 non-canonical Wnt signaling을 요약하면, 1) 특정 Wnt/Fz의 결합에 의한 intracellular Ca^{+2} level 증가의 결과로 protein kinase C 및 Ca^{+2} /calmodulin dependent kinase (CamKII) 및 Ca^{+2} dependent phosphatase인 calcineurin과 같은 Ca^{+2} -sensitive enzyme이 활성화되어 신호가 전달되는 것과 2) small GTPase의 일종인 rho나 cdc42를 통해서 JNK의 활성이 이루어지거나, 3) focal adhesion kinase (FAK)를 통해서 cell motility를 조절하는 경우로 나눌 수 있다 (Fig. 3, [50~51]).

Wnt signaling에 의해서 다양한 Ca^{+2} -sensitive enzyme이 활성화 될 수 있기 때문에 지금까지 밝혀졌던 PKC나 CamKII 외에 활성이 조절되는 enzyme의 발굴이 예상되고, 다양한 enzyme 활성의 결과가 어떤 방법에 의해서 특정 생물학적 현상조절로 이어질 수 있는지에 관한 해답은 상당히 많은 연구가 필요하다고 할 수 있다. 한 예를 들면 JNK도 in vitro에서 Ca^{+2} signaling에 의해서 조절될 수 있고 Ca^{+2} dependent phosphatase인 calcineurin도 동일한 signaling에 의해 조절될 수 있는데[52], cell의 입장에서 본다면 발생과정에서 일어나는 JNK에 의한 morphogenetic movement와 calcineurin의 활성화에 의한 등축과 배축으로의 분화의 결정 (determination of dorsal-ventral axis differentiation, [53])을 구별하는 것이 상당히 중요하다고 할 수 있다. 이 구별은 calcium signal의 frequency와 amplitude에 의해서

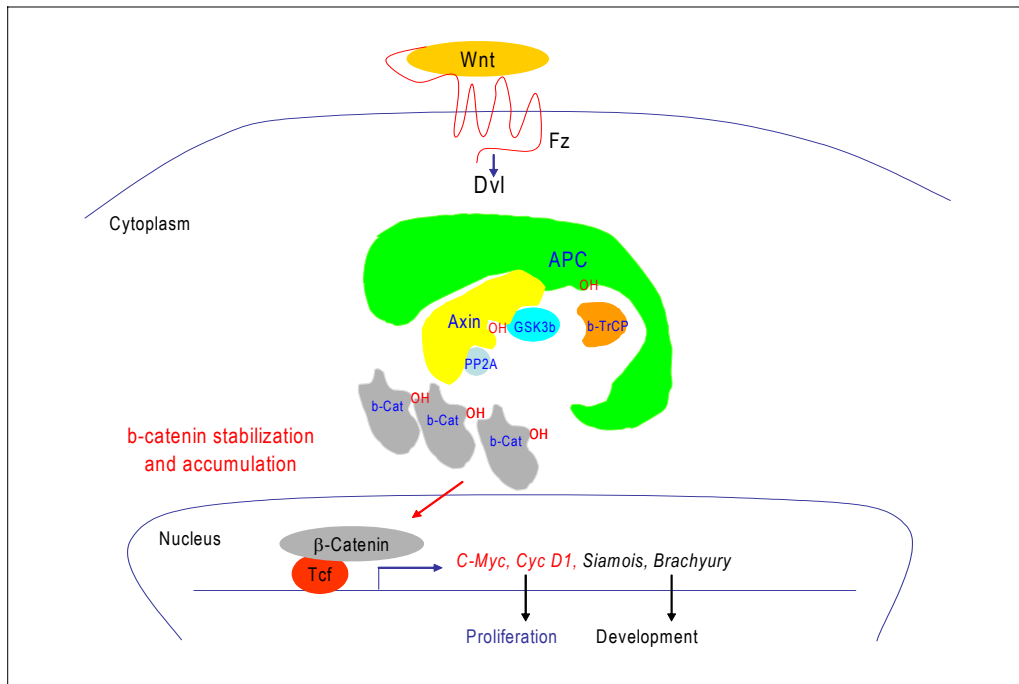


Fig. 3. Simplified version of non-canonical Wnt signaling.

결정된다고 해석되는데, Cacineurin의 경우는 낮은 level의 calcium signaling이 지속적으로 존재 할 때 활성화되고, JNK는 단기간에 높은 level의 calcium spike를 필요로 한다 [54~55]. 다른 경우도 동일한 방법에 의해서 조절되는지는 명확하지 않으므로 각각의 경우에 따른 조절 기전은 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 여겨지며, 어떤 방법에 의해서 Calcium signaling의 frequency와 amplitude가 조절되는지도 밝혀져야 할 부분이라고 생각된다.

Rho/JNK에 의한 Wnt signaling은 *Drosophila*의 wing에 붙어있는 가는 털이나 홀눈의 내부에 있는 photoreceptor의 방향성을 결정짓는 planar cell polarity (PCP)에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[56]. Vertebrate의 경우는 *Drosophila*와 동일한 PCP 현상은 볼 수 없지만, 그와 유사한 현상인 convergent extension (배아 발생 단계의 gastrulation 시기에 일어나는 세포들이 방향성을 갖고 걸어지면서 서로가 intercalation이 일어나는 현상) 과정에서 중요하다고 밝혀져 있다[57].

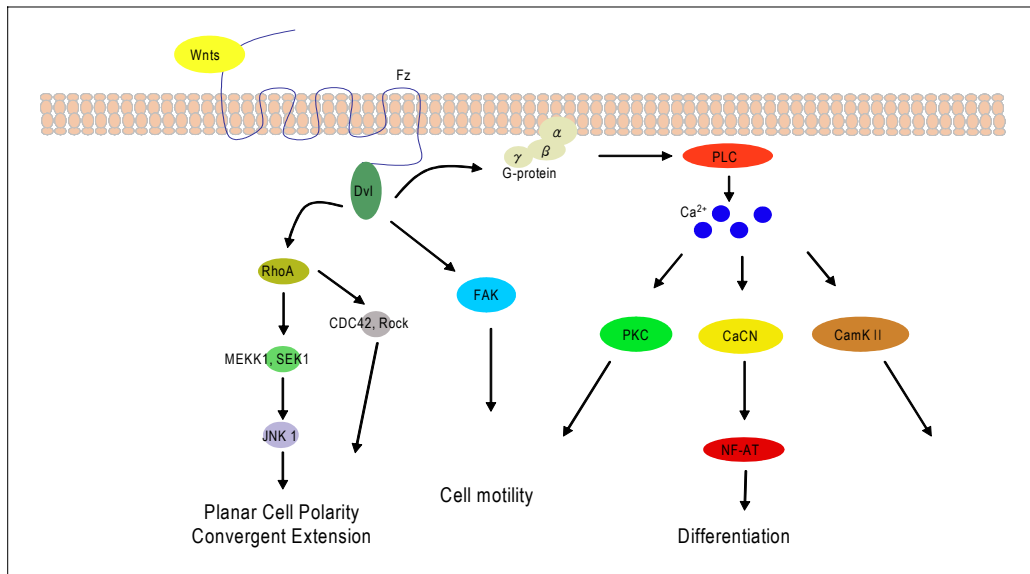
Drosophila Wnt-4에 mutation이 일어나면 발생과정 동안 cell의 migration이 억제되는데 이때 세포 내의 cytoskeleton과 extracellular matrix 사이에서 anchor 역할을 하는 focal adhesion의 형성에 이상이 있고, 조절에 관여하는 focal adhesion kinase (FAK)의 activity가 낮다는 사실이 밝혀짐으로써 non-canonical Wnt signaling이 cell adhesion을 조절하는 역할을 한다고 알려졌다[58].

Non-canonical Wnt signaling은 다양한 경로로 신호가 전달되지만, 어떤 유전자의 발현이 조절되는지 밝혀진 바는

그리 많지 않고, 어떤 transcription factor가 그 과정에서 중요한 역할을 하는지에 대한 연구도 미진하다. 그 이유는 canonical Wnt signaling의 경우는 Wnt conditioned media (최근에는 purified Wnt도 사용) 또는 Wnt 유전자의 transfection에 하면 β-catenin의 증가 여부가 Wnt signaling 전달의 marker로 사용되어 연구를 수행할 수 있지만, non-canonical Wnt signaling의 경우는 Wnt signaling이 실제로 전달되고 있는지를 쉽게 확인할 수 있는 공통적인 marker가 존재하지 않아서라고 여겨진다. 또한 non-canonical Wnt signaling에서는 canonical signaling 과 같이 Tcf/LEF라는 공통적인 transcription factor가 존재하지 않고 각각의 다른 pathway마다 특이적인 transcription factor들이 사용되기 때문에 아닌가 생각된다. 앞으로 더 많은 non-canonical Wnt signaling의 target gene들이 밝혀지면, 그 target gene들로부터 non-canonical Wnt signaling의 역할을 구명하는 연구가 예상된다.

Wnt 신호전달과 인간 질병과의 연관성

Wnt signaling의 이상에 의한 cancer가 유발되는 사실은 Wnt가 밝혀진 때부터 알려져 왔고 Wnt signaling을 조절함에 의해서 암을 치료하고자 하는 시도는 많은 제약 회사들에 의해서 경쟁적으로 진행되고 있다. 하지만, 최근 들어서 Wnt signaling이 adipogenesis, polycystic kidney disease, schizophrenia, osteoporosis 및 Alzheimer's disease를 비롯한 많은 질병과의 연관성이 밝혀지거나 예상되어서 각각의



질병의 연구에 전문성을 가진 의학자들과 Wnt signaling을 연구하는 과학자들간의 긴밀한 협동 연구의 필요성이 증대되고 있다. 또한 stem cell의 분화에도 cellular context에 따라 Wnt signaling이 positive 또는 negative하게 작용한다는 사실이 밝혀지고 있어서, stem cell을 이용하여 질병을 치료하고자 하는 많은 연구자들의 관심이 고조되고 있다.

본 강좌에서는 다양한 질병 중 내분비학을 연구하시는 분들이 관심이 있을 adipogenesis, osteoporosis 및 stem cell의 분화조절에서 Wnt signaling의 연관성을 중심으로 설명하고자 한다.

1. Wnt와 adipogenesis

지방 조직(adipose tissue)을 이루는 지방세포(adipocyte)는 지방(fat)을 포함하고 있는 세포로써 체내 지방 대사를 조절 하는 것뿐 아니라 당 대사에도 관여하여 전반적인 에너지 항상성 유지를 담당하고 또한 지방을 태움으로써 열을 발생(thermogenesis)시켜 체온을 유지하는 등의 중요한 기능을 담당하고 있다. 하지만 과다한 지방세포의 형성(adipogenesis)과 불균형적인 에너지의 공급과잉에 의해 비만(obesity)이라는 새로운 문제가 현대의 사회적 이슈로 부각되고 있다.

2000년 Science에 처음으로 adipogenesis가 Wnt signaling에 의해서 억제된다고 보고된 후부터 지방세포 형성의 조절 target으로서 Wnt signaling에 대한 연구가 주목받게 되었다[16]. Adipogenesis는 myocytes, osteoblasts 또는 adipocytes를 형성할 수 있는 mesenchymal stem cells에서 시작하는 multistage process이다. Pluripotent mesenchymal stem cell의 운명을 결정짓는 요인으로 BMP가 관여한다고 알려져 있으며, 이는 어떠한 수용체와 결합을 하느냐에 따라 지방세포로 분화하기도 하고 골세포로 분화하기도 한다

[59]. 지방전구세포(preadipocyte)가 지방세포(adipocyte)로 분화하는 데에는 여러가지 전사인자들이 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 이에 대한 연구는 많이 진행되어왔다. 간단히 요약하면, 지방전구세포가 분비하는 IGF-I, Glucocorticoid 와 같은 adipogenic inducers들에 의해 분화가 유도되면 분화 초기 전사인자로 C/EBPβ와 C/EBPδ가 발현되고 이는 cascade 반응으로 C/EBPα와 PPARγ를 발현시킨다. 이 두 전사인자는 지방세포 분화를 이끄는 주된 전사인자로서 서로가 서로의 발현을 증가시키게 되고 이렇게 과량 발현된 C/EBPα와 PPARγ는 aP2나 adiponectin과 같은 adipocyte specific genes을 발현시켜 형태학적으로나 세포의 기능적으로 변화된 adipocyte를 형성한다[60].

지방전구세포에서 발현되는 Wnt10b는 세포 내 조절인자로서 지방세포 분화에 중요 전사인자인 C/EBPα와 PPARγ의 발현을 억제함으로써 지방세포 특이 유전자가 발현되지 못해 지방세포 형성을 막는다[16,61]. 또한 Wnt10b가 증가시키는 세포 내 β-catenin양과 PPARγ간의 균형 조절이 지방 세포 분화에 중요하다고 알려져 있으며 이 두 단백질간의 균형은 GSK3β에 의한 β-catenin의 인산화를 통한 단백질 분해에 의존적으로 조절되고 있음이 확인되었다[16, 61, 62].

In vitro에서 뿐 아니라 transgenic mice를 통한 in vivo 결과에서도 Wnt10b가 지방세포 형성에 억제역할을 담당하고 있음이 최근 확인되었다[63]. Ormond A. MacDougall 팀에 의해 제작된 FABP4/Wnt10b transgenic mice는 adipose tissue에서만 발현되는 FABP4 promoter를 이용하여 Wnt10b를 adipose tissue에 과량 발현시켰을 때 고지방식이법에도 불구하고 body fat의 양과 fat cell의 수가 정상 쥐보다 50% 미만임을 보여줬다. 이는 또한 비만과 함께 주의를 요하게 되는 당뇨병의 원인인 insulin sensitivity와 glu-

cose tolerance에 있어서도 저지방 식이법을 한 정상 쥐에 비해 더 좋은 결과를 보여줬다[63]. 아직은 형질전환 쥐에서 보여지는 특징들이 어떠한 mechanism에 의한 조절인지 더 연구가 필요하지만 이번 결과는 Wnt10b가 fat cell development에서 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 보여준다.

2. Wnt와 osteoporosis

Bone은 osteoblastic bone formation과 osteoclastic bone resorption 사이의 균형에 의해 유지되는 dynamic tissue이다. 사람이 태어나서 성장하는 동안 bone mass는 꾸준히 증가 하여 skeletal maturation을 형성하게 되지만, 나이가 들어감에 따라 점차적으로 bone mass를 손실하여 결국 osteoporosis와 같은 bone disease가 나타나게 된다. 또한, autosomal-recessive OPPG (osteoporosis-pseudoglioma syndrome)의 경우에는 어린 환자들 경우도 bone mass가 매우 낮아서 골절 유발 빈도가 매우 높다. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome collaborative group에서는 OPPG 질병에 걸린 가계 리스트를 확보한 후 그 원인 유전자로서 LRP5를 찾아내어 Wnt signaling이 bone formation에 중요하다는 것을 처음으로 확인시켰다[18,64].

LRP5는 osteoblast에서 특이적으로 발현되는 유전자와 multiple abnormality bone phenotype에 관련된 chromosome 11q13를 mapping하는 과정에서 처음 cloning이 되었다[65]. 이러한 LRP5는 거의 모든 조직에서 낮은 레벨로 발현이 되며 세포 분화 과정 동안 발현 정도가 크게 변하지 않으며 또한 그것의 ligand가 밝혀지지 않아 관심을 받지 못한 유전자였다. 하지만, 발생과 암을 비롯한 다양한 질병의 형성에 관여하는 Wnts에 대한 co-receptor임이 확인이 됨에 따라 LRP5를 통한 Wnt signaling의 bone formation의 역할에 대한 연구가 본격적으로 시작되었다[66,67].

LRP5는 Wnts subfamily (Wnt1, Wnt3a등)와 결합하여 Frizzled receptor와 함께 ternary complex를 형성한다. 이것은 canonical Wnt signaling pathway를 활성화시켜 osteoblast의 분화를 촉진하게 되어 bone formation을 증가시키게 된다[66]. 정상적인 상황에서 이러한 signaling activation은 Dickkopf에 의해 억제되어 균형적으로 조절이 되지만, OPPG환자들의 대다수는 LRP5 extracellular domain에서의 다양한 mutation으로 인해 LRP5의 기능이 상실되어 bone formation 과정이 제대로 이루어지지 않고, 그 결과 균형적인 조절이 깨지게 된다[18,68].

Bone formation과 bone mass에서의 LRP5의 역할은 mouse에서 유전적으로 검증되었다. Osteoblast differentiation의 주요 조절자인 Cbfa1 유전자의 발현이 정상적임에도 불구하고, LRP5가 null mutation된 mouse는 osteoblast proliferation과 기능이 감소하여 postnatal bone loss를 일으켰다[69]. 이와는 반대로, osteoblast에서 constitutive active

form인 LRP5 (G171V)를 발현하는 transgenic mouse는 bone formation과 bone mass가 증가하였다[70]. 그리고, bone 밀도가 높은 개인에게서 G171 근처의 아미노 말단에 여섯 개의 추가적인 mutation이 최근에 확인이 되었다[68]. 또 하나의 흥미로운 사실은 하나의 LRP5 유전자만 mutation이 일어나 하나의 정상적인 유전자를 가지고 있는 사람의 경우에도 정상인에 비해 bone mass가 낮다는 점이다. 이는 LRP5 단백질이 bone mass를 조절하는 조절장치임을 의미한다. 따라서, LRP5 경로의 활성을 조절함으로써 bone 밀도를 증가시키는 것이 가능하게 될 것으로 생각된다.

3. Wnt와 stem cell differentiation

Stem cell 분화의 조절에 관한 연구는 그 기초 연구뿐만 아니라 당뇨병, 심장병, 관절염, 퇴행성 뇌질환, 뇌신경 손상 등과 같은 여러 난치병에 대한 배아줄기 세포를 이용한 세포치료방법으로서 많은 연구가 이루어지고 있다. 여러 가지 해결해야 할 문제가 많지만, 가까운 장래에 stem cell을 이용한 질병의 치료 방법이 보편화된다고 여겨짐으로 전 세계적으로 치열한 경쟁 속에 연구가 진행되고 있다. 특히, 1) stem cell의 maintenance/self-renewal capacity 유지에 대한 mechanism과 2) 원하는 특정 조직으로의 differentiation을 유도할 수 있는 방법의 개발 등이 주요 연구 분야이다. 본 강좌에서는 최근에 밝혀진 결과를 중심으로 배아 줄기세포와 성체 줄기 세포에서의 Wnt signaling의 역할을 나누어서 설명하고자 한다.

1) 배아 줄기세포 (Embryonic Stem Cell, ESC)

Embryonic stem cell은 어떤 세포로도 분화할 수 있는 능력을 (totipotency) 갖고 있어서 특정 조직으로 분화하는 능력만을 (pluripotency) 갖고 있는 adult stem cell과 구분될 수 있다. 2000년에 Nobel상을 수상한 Rockefeller 대학의 Paul Greengard박사 그룹은 '6-bromindirubin-3'-oxime (BIO)'라는 GSK3 β inhibitor를 이용해서 activation된 Wnt/ β -catenin signaling이 human과 mouse ESC의 pluripotency와 self-renewal capacity를 유지시킨다고 보고하였다[25]. 또한, β -catenin의 level을 조절하는 APC의 다양한 mutant form들을 이용하여, 증가된 β -catenin에 의해 mouse ESC의 differentiation이 억제된다고 보고된 바 있다[71]. 위 결과들에서 보이는 Wnt signaling의 영향은 ESC에서 differentiation을 억제하여 pluripotency를 유지하고, self-renewal 즉 proliferation을 촉진시키는데 관여하는 것으로 보인다. 하지만, 본인의 연구 결과에 의하면, mouse ESC이 다양한 경로로 분화하는 동안 여러 가지 종류의 Wnt 및 Fz의 발현이 변화하는 것을 볼 수 있어서 한두 가지 components의 과발현과 inhibitor의 처리에 의한 실험은 원하는 방향으로 ESC의 분화를 유도할 수 있을지는 모르지만, 그 결과로부

터 *in vivo*에서 ESC의 분화의 조절에 있어서 Wnt signaling의 역할을 일반화시키는 것은 문제가 있다고 여겨진다.

2) 성체 줄기세포 (Adult Stem Cell)

앞에서 언급한 것과 같이 Wnt signaling은 embryonic stem cell에서 뿐만 아니라, 각종 tissue-specific adult stem cell에서도 proliferation에 관여한다. 그러나 cell lineage determination과 같은 differentiation과정에도 관여한다는 보고들이 있다. 이와 같이 동일한 Wnt signaling이 상이한 역할을 한다는 결과는 mouse embryonic, neural, hematopoietic stem cells의 gene information을 비교한 결과로 미루어 특정 cellular context에 따라 유전자 발현 패턴의 상이성에 기인한다고 추측된다[72].

*In vitro*에서 purification한 Wnt3a protein을 처리함에 의해서 hematopoietic stem cell의 self-renewal에 Wnt/ β -catenin signaling이 관여한다는 것이 밝혀졌다[73]. 또한, 지속적인 activated β -catenin의 발현과 inhibitor인 Axin과 mutant Fz9 (CRD domain)의 발현을 통하여 hematopoietic stem cell에서 Wnt/ β -catenin signaling이 self-renewal capacity를 유지시킨다는 *in vivo/in vitro* 결과들을 보고하였다 [12]. 현재 β -catenin을 통하지 않는 non-canonical Wnt signaling의 stem cell에 대한 연구는 활발히 진행 중인 것으로 보인다. Murdoch *et al.*에 의하면, Wnt5a-conditioned media를 human hematopoietic progenitor cell을 engraft한 mice에 injection한 결과, reconstitution이 증가한 것을 관찰하였고, 이는 Wnt-5a signaling이 hematopoietic stem cell expansion, engraftment 또는 survival을 촉진한다는 것을 시사한다[74].

Secreted Wnt inhibitor인 DKK-1을 skin specific K-14 promoter를 이용하여 epidermis basal cell에서 발현시킨 *in vivo* 실험 결과, skin appendage에 속하는 hair follicle, teeth, mammary gland의 형성이 억제된 결과를 얻었다[75]. 또한 Eaine Fuchs박사 그룹의 연구 결과는 β -catenin의 증가가 skin stem cell의 population의 증가 및 multipotency를 유지시키고, TCF-3과 Lef-1와의 complex를 통하여 skin stem cell의 lineage differentiation에도 관여한다는 결과 등도 최근에 밝혀졌다[76].

TCF-4-deficient mice에서 fetal development 동안에 intestinal progenitor cell이 관찰되지 않는 결과들이 밝혀졌다 [77]. 더욱이, adult에서 Wnt signaling이 gut progenitor cell에서 activation된 상태이고, Wnt signaling inhibitor로 알려진 Dickkopf-1(Dkk1)를 처리했을 때, small intestine과 colon의 proliferation이 억제되는 결과들로 보아, Wnt signaling은 intestinal stem cell의 self-renewal에 관여한다고 보여진다[78]. 이러한 결과들은 Wnt signaling activator를 이용하여 gut epithelium의 재생, 즉 homeostasis를 유지하고,

inflammatory bowel disease같은 질환의 치료에 이용될 수 있을 것이다[79].

Wnt 신호전달의 연구 방향 및 결론

전체적으로 볼 때 Wnt signaling에 관련된 생화학적 또는 유전학적인 연구는 많은 부분이 밝혀졌지만, 아직도 더 많은 연구가 필요하다. 다른 생물학의 연구 분야에서와 마찬가지로 Wnt signaling 분야에서 가장 어려운 점은 동일한 molecule이 cellular context에 따라서 다른 역할을 하는 것이다. 따라서, 단순히 특정 유전자의 overexpression이나 inhibitor의 사용에 의한 결론은 실제로 *in vivo*에서 일어나는 사실과 다를 가능성이 있다.

최근 들어 여러 가지 인간 질환에 Wnt signaling의 이상이 관련되었다는 사실이 밝혀지고 있으며, 그러한 질병의 치료 방법으로 Wnt signaling을 조절하려는 시도가 많아지고 있다. 따라서 정확한 질환 치료의 작용점을 설정하기 위해서는 Wnt signaling의 조절에 관련되는 더 많은 molecule들의 발굴과 기전의 이해가 필수적이다. Wnt signaling의 조절을 이용하여 질병을 치료하고자 할 때, Wnt signaling에 관련된 molecule들이 다른 발생 단계나 cell type에서 상반되는 기능을 수행하는 경우는 단순한 drug의 투여에 의한 질병의 치료 방법으로는 부적절하다고 여겨진다. 또한 많은 cell signaling의 경우에서 볼 수 있는 바와 같이 Wnt 신호 전달의 경우도 TGF- β signaling을 비롯한 다른 signaling과의 cross regulation을 하고 있다고 밝혀지고 있어서, Wnt signaling을 target으로 하는 drug의 사용은 많은 주위와 문헌의 참고가 필요하다.

Wnt signaling의 조절에 의한 질병의 치료 방법의 개발은 그 상업적인 가치 때문에 그 중요성이 더해질 것이라고 예상된다. Wnt가 밝혀진 이후 약 20여 년 동안 세계적으로도 최고의 연구자들이 극심한 경쟁 하에 연구가 진행되어 왔고 현재도 그 상황은 계속되고 있다. 하지만, 새로 발견되는 질병과 Wnt signaling과의 연관성의 연구는 시작점이 동일하기 때문에 국내의 임상 연구자들과 기초 연구자들간의 긴밀한 공동연구가 이루어지면 충분히 국제적인 경쟁력이 있다고 여겨진다. 따라서, Harvard대학의 Dr. Xi He가 말한 대로 Wnt signaling의 기초 연구자와 다양한 질병의 전문성을 가진 임상 전문가들이 서로를 돕는 Wnt-Wnt (win-win으로 발음 됨) 전략이 사용되면, Wnt 신호 전달을 조절하는 신약의 개발을 통한 바이오 산업의 진흥에도 크게 기여를 하리라고 예상된다.

감사의 글

본 저자는 2004년도 서울 시립 대학교 학술 연구 조성

사업으로부터 연구비를 지원받아 연구를 수행하였습니다.

참 고 문 헌

1. Reya T, Clevers H: *Wnt signalling in stem cells and cancer*. *Nature* 434:843-850, 2005
2. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A: *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. *Nat Rev Genet* 5:691-701, 2004
3. Logan CY, Nusse R: *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810, 2004
4. 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* 31:99-109, 1982
5. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. *Cell* 50:649-657, 1987
6. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackelford G, McMahon A, Moon R, Varmus H: *A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family*. *Cell* 64:231, 1991
7. McMahon AP, Bradley A: *The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain*. *Cell* 62:1073-1085, 1990
8. Thomas KR, Capecchi MR: *Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development*. *Nature* 346:847-850, 1990
9. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP: *Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4*. *Nature* 372:679-683, 1994
10. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S: *A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo*. *Development* 126:1211-1223, 1999
11. Staal FJ, Clevers HC: *WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation*. *Nat Rev Immunol* 5:21-30, 2005
12. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL: *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. *Nature* 423:409-414, 2003
13. Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, Kessler JA: *Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells*. *Development* 131:3545-3557, 2004
14. Gregorieff A, Clevers H: *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. *Genes Dev* 19:877-890, 2005
15. Meniel V, Hay T, Douglas-Jones A, Sansom OJ, Clarke AR: *Mutations in Apc and p53 synergize to promote mammary neoplasia*. *Cancer Res* 65:410-416, 2005
16. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA: *Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling*. *Science* 289:950-953, 2000
17. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA: *Regulation of Wnt signaling during adipogenesis*. *J Biol Chem* 277:30998-31004, 2002
18. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakis G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML: *LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development*. *Cell* 107:513-523, 2001
19. Patel MS, Karsenty G: *Regulation of bone formation and vision by LRP5*. *N Engl J Med* 346:1572-1574, 2002
20. Miyaoka T, Seno H, Ishino H: *Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains*. *Schizophr Res* 38:1-6, 1999
21. Svenningsson P, Tzavara ET, Carruthers R, Rachleff I, Wattler S, Nehls M, McKinzie DL, Fienberg AA, Nomikos GG, Greengard P: *Diverse psychotomimetics*

- act through a common signaling pathway. Science* 302:1412-1415, 2003
22. Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, Koo EH: *Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. Cell* 110:751-762, 2002
23. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS: *GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. Nature* 423:435-439, 2003
24. Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Roze-muller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F: *Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. J Neurosci* 24:6021-6027, 2004
25. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH: *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med* 10:55-63, 2004
26. Cadigan KM, Nusse R: *Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev* 11:3286-3305, 1997
27. Wodarz A, Nusse R: *Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88, 1998
28. Nelson WJ, Nusse R: *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science* 303:1483-1487, 2004
29. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: *A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. Dev Cell* 5:367-377, 2003
30. Holmen SL, Salic A, Zylstra CR, Kirschner MW, Williams BO: *A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta-catenin-dependent signaling. J Biol Chem* 277:34727-34735, 2002
31. Karasawa T, Yokokura H, Kitajewski J, Lombroso PJ: *Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/beta-catenin signaling. J Biol Chem* 277:37479-37486, 2002
32. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D: *Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. Mol Cell* 7:801-809, 2001
33. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X: *A mechanism for Wnt coreceptor activation. Mol Cell* 13:149-156, 2004
34. Kawano Y, Kypta R: *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci* 116:2627-2634, 2003
35. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T: *DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. Oncogene* 23:8520-8526, 2004
36. Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A: *The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. Oncogene* 24:1098-1103, 2005
37. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A: *Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. Embo J* 17:1371-1384, 1998
38. Fagotto F, Jho E, Zeng L, Kurth T, Joos T, Kaufmann C, Costantini F: *Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. J Cell Biol* 145:741-756, 1999
39. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y: *AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. Nat Genet* 24:245-250, 2000
40. Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T: *Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. Cancer Res* 61:7039-7043, 2001
41. Polakis P: *Wnt signaling and cancer. Genes Dev* 14:1837-1851, 2000
42. Willert K, Brink M, Wodarz A, Varmus H, Nusse R: *Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. Embo J* 16:3089-3096, 1997
43. Rothbacher U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW, Fraser SE: *Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate*

- its role in early embryogenesis. *Embo J* 19:1010-1022, 2000
44. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A: *Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. Nature* 395:604-608, 1998
 45. Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T: *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. Genes Dev* 14:1741-1749, 2000
 46. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R: *The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. Embo J* 19:1839-1850, 2000
 47. Takamaru KI, Moon RT: *The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. J Cell Biol* 149:249-254, 2000
 48. Henderson BR: *Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. Nat Cell Biol* 2:653-660, 2000
 49. Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M: *The APC tumour suppressor has a nuclear export function. Nature* 406:1009-1012, 2000
 50. Pandur P, Maurus D, Kuhl M: *Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. Bioessays* 24:881-884, 2002
 51. Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT: *Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. J Cell Biol* 161:769-777, 2003
 52. Zohn IE, Yu H, Li X, Cox AD, Earp HS: *Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase. Mol Cell Biol* 15:6160-6168, 1995
 53. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K: *The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. Nature* 417:295-299, 2002
 54. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS: *Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. Nature* 392:933-936, 1998
 55. Dupont G, Goldbeter A: *CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations. Bioessays* 20:607-610, 1998
 56. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M: *Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. Cell* 94:109-118, 1998
 57. Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E: *JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. EMBO Rep* 3:69-75, 2002
 58. Cohen ED, Mariol MC, Wallace RM, Weyers J, Kamberov YG, Pradel J, Wilder EL: *DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during Drosophila ovarian morphogenesis. Dev Cell* 2:437-448, 2002
 59. Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE: *Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol* 142:295-305, 1998
 60. Grimaldi PA: *The roles of PPARs in adipocyte differentiation. Prog Lipid Res* 40:269-281, 2001
 61. Liu J, Farmer SR: *Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. J Biol Chem* 279: 45020-45027, 2004
 62. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR: *Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. Biochem J* 376:607-613, 2003
 63. Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, Opp MR, MacDougald OA: *Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. J Biol Chem* 279:35503-35509, 2004
 64. Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, Peltonen L, Somer H, Hirose T, Dallapiccola B, De Paepe A, Swoboda W, Zabel B, Superti-Furga A, Steinmann B, Brunner HG, Jans A, Boles RG, Adkins W, van den Boogaard MJ, Olsen BR, Warman ML: *Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. Am J Hum Genet* 59:146-151, 1996
 65. Dong Y, Lathrop W, Weaver D, Qiu Q, Cini J, Bertolini D, Chen D: *Molecular cloning and charac-*

- terization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 251:784-790, 1998
66. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC: An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407:535-538, 2000
67. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-535, 2000
68. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W: Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 72:763-771, 2003
69. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L: *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, 2002
70. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F: High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 18:960-974, 2003
71. Kielman MF, Rindapaa M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R: *Apc* modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet* 32:594-605, 2002
72. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA: "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298:597-600, 2002
73. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R: Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448-452, 2003
74. Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, Bhatia M: Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3422-3427, 2003
75. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE: WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell* 2:643-653, 2002
76. Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E: *Tcf3* and *Lef1* regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15:1688-1705, 2001
77. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H: Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking *Tcf-4*. *Nat Genet* 19:379-383, 1998
78. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, Kuo CJ: Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of *Dickkopf-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:266-271, 2004
79. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H: The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111:241-250, 2002