

Martínez-Gil N¹, Roca-Ayats N¹, Vilardell M², Civit S², Urreiziti R¹, García-Giralt N³, Mellibovsky L³, Nogués X³, Díez-Pérez A³, Grinberg D¹, Balcells S¹

1 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (IRSJD) - Barcelona (España)

2 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Barcelona (España)

3 Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA) - Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Parque de Salud Mar - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Barcelona (España)

Estudios funcionales de variantes de DKK1 presentes en la población general

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400003>

Correspondencia: Susana Balcells Comas - Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universitat de Barcelona - Avda. Diagonal, 643 - 08028 Barcelona (España)
Correo electrónico: sbalcells@ub.edu

Fecha de recepción: 02/06/2018

Fecha de aceptación: 01/09/2018

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Básica 2015.

Resumen

Objetivo: En las últimas décadas se han identificado genes asociados a la masa ósea y al riesgo de fractura osteoporótica, varios de los cuales pertenecen a la vía de Wnt. En este proyecto se estudió la funcionalidad de 7 mutaciones de cambio de sentido del gen *DKK1* –un inhibidor de la vía de Wnt– presentes en la población general.

Material y métodos: Se realizaron estudios *in vitro* del gen reportero luciferasa para medir la actividad de la vía de Wnt en presencia o ausencia de DKK1 silvestre o mutada, y estudios de *western blot*, para evaluar si las distintas mutaciones afectan a su síntesis y/o a su estabilidad.

Resultados: La proteína DKK1 con la variante p.Ala41Thr presenta menor actividad inhibidora de la vía en comparación con la proteína silvestre. También se observaron diferencias significativas entre los experimentos realizados en ausencia de DKK1 y los que incluyen DKK1 con la mutación p.Ala41Thr. Los *western blots* mostraron que la cantidad de proteína era similar para todas las variantes, tanto las mutadas como la silvestre, por lo que la pérdida de actividad de p.Ala41Thr no parecía deberse a falta de proteína. El resto de las mutaciones no presentaron un comportamiento diferente al de la proteína DKK1 silvestre.

Conclusiones: La variante de cambio de sentido p.Ala41Thr de la proteína DKK1, con una frecuencia poblacional de 0,013%, presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no es debida a la falta de expresión de ésta. Esta variante génica podría conllevar un aumento de la densidad mineral ósea en las personas de la población general portadoras de esta mutación.

Palabras clave: *DKK1, estudios funcionales, variantes de cambio de sentido, luciferasa, vía de Wnt, masa ósea elevada, osteoporosis.*

Functional studies of DKK1 variants present in the general population

Summary

Objective: In recent decades, genes associated with bone mass and osteoporotic fracture risk have been identified, several of which belong to the Wnt pathway. In this project, the functionality of 7 missense mutations of the gene *DKK1*—an inhibitor of the Wnt pathway—present in the general population was studied.

Material and methods: *In vitro* studies of the luciferase reporter gene were carried out to measure Wnt pathway activity in the presence or absence of wild-type or mutated *DKK1*, and western blot studies, to evaluate if the different mutations affect its synthesis and/or stability.

Results: The *DKK1* protein with the p.Ala41Thr variant shows lower pathway inhibitory activity compared to the wild-type protein. Significant differences were also observed between the experiments performed in the absence of *DKK1* and those that include *DKK1* with the p.Ala41Thr mutation. Western blots showed that the amount of protein was similar for all variants, both mutated and "wild-type", so the loss of p.Ala41Thr activity did not seem to be due to a lack of protein. The rest of the mutations did not show different behavior from that of the wild *DKK1* protein.

Conclusions: The missense variant p.Ala41Thr of the *DKK1* protein, with a population frequency of 0.013%, shows a partial loss of its inhibitory function, which is not due to the lack of expression. This gene variant could lead to an increase in bone mineral density in those people in the general population who carry this mutation.

Key words: *DKK1*, functional studies, missense variants, luciferase, Wnt pathway, High Bone Mass (HBM), osteoporosis.

Introducción

El papel de la vía de Wnt sobre la regulación del remodelado óseo se ha demostrado en múltiples estudios. Por un lado, se han descrito polimorfismos en diversos genes de la vía de Wnt que muestran asociación con la densidad mineral ósea (DMO) y el riesgo de fractura¹⁻⁶. También se han descrito mutaciones poco frecuentes o raras en genes de la vía de Wnt, causantes de fenotipos óseos más raros, tales como la osteoporosis-pseudoglioma (OPPG; OMIM 259770)⁷, la osteogénesis imperfecta autosómica recesiva de tipo XV (OMIM 615220)⁸, y la osteosclerosis (OMIM 144750)⁹. La vía de Wnt se inicia con la formación de un complejo heterotrimérico entre el receptor *Frizzled*, el co-receptor LRP5 y el ligando Wnt. Una vez formado este complejo, la β -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo donde puede activar la transcripción de numerosos genes diana. En osteoblastos se ha demostrado que la vía de Wnt activa la transcripción de genes que contribuyen netamente a la formación de hueso¹⁰. Además, esta vía se encuentra finamente regulada por una serie de inhibidores extracelulares, entre los que destacan la proteína esclerostina, codificada por el gen *SOST*, y la proteína *DKK1*, codificada por un gen con el mismo nombre. Estas dos proteínas realizan su función, impidiendo la formación del complejo heterotrimérico. Las proteínas esclerostina y *DKK1* forman así otros complejos heterotriméricos, junto con LRP5 y LRP4 (en el caso de esclerostina)^{11,12} y junto con LRP5 y Kremen (en el caso de *DKK1*)¹³.

La sobreexpresión transgénica del gen *DKK1* en osteoblastos produce una disminución relativa del número de osteoblastos frente al de osteoclastos, produciendo así una disminución en la forma-

ción de hueso. Del mismo modo, en ratones, la delección homocigota del gen *DKK1* es letal, pero la delección en heterocigosis presenta un fenotipo de sobrecrecimiento de hueso (alta masa ósea)^{14,15}.

Gracias al efecto directo sobre la inhibición de la osteoblastogénesis y de la activación indirecta de la osteoclastogénesis¹⁶, en la última década esclerostina y *DKK1* se han convertido en unas dianas interesantes para el tratamiento de la osteoporosis. En cuanto a *DKK1* se refiere, se han desarrollado anticuerpos (BHQ880, DKN-01 y PF-04840082), el primero de los cuales se encuentra en fase de ensayo clínico en mujeres postmenopáusicas con baja densidad mineral ósea (DMO)¹⁷⁻¹⁹.

En un estudio previo de nuestro grupo²⁰ se secuenció *DKK1* para identificar variantes que pudieran explicar el fenotipo de alta masa ósea (HBM, por sus iniciales en inglés), definida por una *Z-score* femoral + lumbar > 4, presente en 15 mujeres. En una de ellas, se encontró una mutación de cambio de sentido (p.Tyr74Phe) que cosegregaba con el fenotipo HBM en la familia. En otro estudio de resecuenciación del gen *DKK1* en mujeres postmenopáusicas de la cohorte BARCOS, hemos encontrado otra mutación de cambio de sentido (p.Arg120Leu) en otra mujer con HBM²¹. Además de estas mutaciones, en la población general existen otras variantes de cambio de sentido en *DKK1* (<http://exac.broadinstitute.org/>), cuyo efecto en términos de masa ósea se desconoce.

En este trabajo, hemos realizado estudios *in vitro* de las mutaciones p.Arg120Leu y p.Tyr74Phe, junto con otras mutaciones de cambio de sentido de *DKK1* frecuentes en la población general (p.Met16Leu, p.Ala41Thr, p.Pro84Leu, p.Ala106Thr, p.Ser157Ile), para valorar su posible implicación en fenotipos óseos.

Material y método

Vectores de expresión y mutagénesis

Los vectores de expresión *mouse* Wnt1-V5, *mesdc2*, *human wildtype* LRP5, pRL-TK, PGL3-OT y DKK1-FLAG²², fueron cortesía del Dr. Wim van Hul (Amberes, Bélgica). Las mutaciones p.Met16Leu, p.Ala41Tyr, p.Tyr74Phe, p.Pro84Leu, p.Ala106Thr, p.Arg120Leu, p.Ser157Ile se introdujeron en el vector de expresión DKK1-FLAG utilizando el kit *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Se verificó la presencia de las mutaciones y la ausencia de errores mediante secuenciación Sanger.

Cultivo celular, producción de medio condicionado y western blot

Se han utilizado células HEK293, cultivadas con medio DMEM suplementado con FBS (10% V/V, Gibco, LifeTechnologies) y 1% de estreptomycin-penicilina (Gibco, LifeTechnologies) y mantenidas en incubadores a 37°C al 5% en CO₂. Se sembraron 3 x 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos, 24 h antes de la transfección. Se transfectó 2.000 ng/pocillo de los plásmidos DKK1-FLAG mutado o silvestre. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 24 h se cambió el medio, reduciendo de 2 a 1 ml de DMEM, sin FBS (*Fetal Bovine Serum*) ni antibióticos. A las 48 h de la transfección se recogió el sobrenadante de cada condición. Las proteínas del medio condicionado se concentraron utilizando filtros Amicon Ultra (Millipore) y se fueron cuantificadas mediante el ensayo BCA (Pierce). Las proteínas de los medios condicionados concentrados (4,5 µg/carril) se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para los análisis de *western blot* se utilizaron los anticuerpos de Abcam ab109416 contra DKK1 y ab2413 contra la proteína extracelular fibronectina, utilizada como control de carga. Las imágenes se desarrollaron usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Para cada mutante se obtuvo medio condicionado en 2 días diferentes y se realizó el análisis por *western blot* 2 veces con estos medios condicionados.

Ensayos de gen reportero

Se utilizaron células HEK293, cultivadas como se indica en el apartado anterior. Se sembraron 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos, 24 h antes de la transfección. Se cotransfectaron hasta 5 plásmidos en células HEK293: *Mouse* Wnt1-V5 (3,2 ng), *mesdc2* (6,4 ng), *human wildtype* LRP5 (6,4 ng), pRL-TK (8 ng), y pGL3-OT (160 ng). Además, dependiendo del experimento también se cotransfectó el plásmido DKK1-FLAG (0,6 ng) silvestre o mutado. En caso necesario, se utilizó el vector vacío pcDNA3 para igualar la cantidad total de ADN de cada experimento. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 48 h de la transfección, las células se lisaron y se midió la actividad de las luciferasas de *Photinus*

pyrali y *Renilla reniformis* utilizando un luminómetro Glomax Multi+ (Promega) siguiendo las instrucciones del sistema *Dual-luciferase reporter assay* (Promega). Cada experimento incluyó 5 réplicas y se repitió independientemente en 3 experimentos separados.

Análisis estadísticos

Se realizó un modelo *one-way blocked* ANOVA para cada mutante teniendo en cuenta el factor de prueba, el día como factor de bloqueo y la variable de respuesta la relación entre las actividades de las luciferasas (*Photinus pyrali* vs. *Renilla reniformis*). El bloqueo es una técnica para lidiar con el factor de molestia y este puede ser un factor que influya en la respuesta. Para cada proteína mutante, el factor de prueba tiene los siguientes niveles: control (se refiere a la actividad de la luciferasa resultante de la vía de Wnt endógena), el activador (actividad de la luciferasa producida por la vía de Wnt en presencia de Wnt y LRP5 exógenos), el inhibidor (actividad en presencia del inhibidor DKK1 silvestre) y mutante (cada una de las proteínas DKK1 mutantes). Se utilizó el test de TukeyHSD para realizar la prueba *post hoc* para comparaciones múltiples de grupos. Los test ANOVA se realizaron utilizando el programa R estudio v.3.4.0, y valores de p<0,05 fueron considerados significativos. Todos los datos fueron evaluados para la normalidad, la homogeneidad de la varianza y la detección de valores atípicos.

Resultados

Expresión, secreción y estabilidad de las proteínas mutadas

Se ha realizado un ensayo de *western blot* para comprobar si las proteínas DKK1 mutantes se encuentran correctamente en el espacio extracelular, utilizando un cultivo de células HEK293, que expresan elevadas cantidades de DKK1 silvestre o DKK1 mutadas. Los resultados muestran que, en todos los casos, las distintas proteínas DKK1 mutadas se detectan en el espacio extracelular (Figura 1) y a niveles iguales o superiores a los de la proteína silvestre.

Actividad de las proteínas DKK1 mutadas

Con el objetivo de testar la actividad inhibidora de proteínas DKK1 mutantes sobre la vía de Wnt, hemos realizado un ensayo de gen reportero (luciferasa), específico para esta vía (Figura 2).

Los resultados de la condición endógena en la que se han cotransfectado los plásmidos pRLTK y pGL3-OT se muestran en las figuras 2A y 3 que representan la actividad de la vía de Wnt en las células HEK293.

En la condición activa, además de pRLTK y pGL3-OT, se ha cotransfectado los vectores que expresan Wnt1 y LRP5. Wnt1 actúa como ligando activador de la vía y LRP5 como co-receptor, dos elementos indispensables para la activación de la vía. En esta condición (Figura 2B) la actividad de la luciferasa se ha incrementado 3 veces, en promedio, en comparación con la vía endógena (Figura 3, activador).

La vía inhibida contenía los mismos vectores que la condición activa pero además se ha cotransfectado el vector que expresa la proteína DKK1-WT (proteína silvestre). En esta condición, se ha inhibido la vía de Wnt, al secuestrar al co-receptor LRP5 (Figura 2C). En estos experimentos la actividad de la luciferasa se ha aumentado 2,2 veces respecto a la condición endógena y ha resultado significativamente inferior a la de la vía activada (Figura 3, inhibidor).

Cuando se ha comprobado la funcionalidad de los mutantes de DKK1, se han cotransfectado los distintos vectores de la vía inhibida, pero sustituyendo

el de DKK1-WT por los que expresan las distintas DKK1 mutadas. Para las proteínas mutantes DKK1-p.Met16Leu, DKK1-p.Tyr74Phe, DKK1-p.Pro84Leu, DKK1-p.Ala106Thr, DKK1-p.Arg120Leu y DKK1-p.Ser157Ile no se han hallado diferencias significativas en la actividad inhibidora comparada con la proteína DKK1 WT (datos no mostrados).

En cambio, en presencia de la proteína mutante DKK1-p.Ala41Thr se ha observado una actividad de la luciferasa que es significativamente mayor a la de la vía inhibida por la DKK1-WT (Figura 3), y a su vez significativamente inferior a la de la vía activa.

Figura 1. Niveles de expresión de la proteína DKK1 *wild-type* o mutada analizados mediante *western blot*. Se transfectaron células HEK293 con vectores de expresión de las diferentes variantes de DKK1 que se indican en cada carril. Los medios condicionados resultantes, debidamente concentrados se emplearon para este análisis. En cada carril se cargó 4,5 ug de proteína total. Como control de carga se ha utilizado la proteína extracelular fibronectina

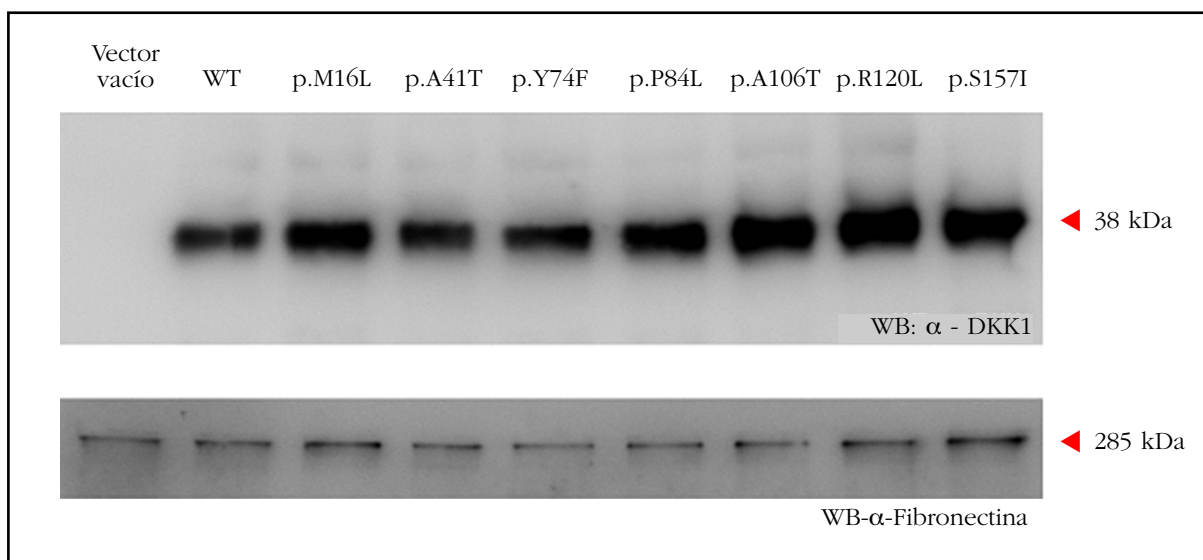
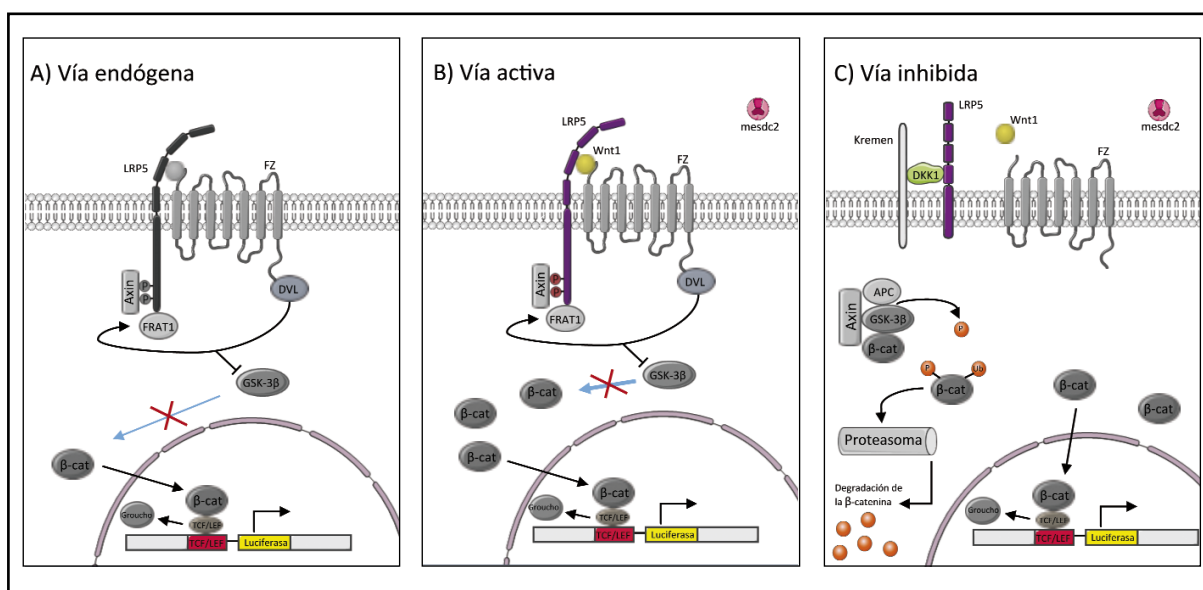


Figura 2. Diseño de ensayo de gen reportero. A) Condición endógena: transfectamos los plásmidos pRLTK y pGL3OT. B) Condición activa: transfectamos los plásmidos pRLTK, pGL3OT, Wnt1, LRP5 y mesdc2. C) Condición inhibida: transfectamos los plásmidos pRLTK, pGL3OT, Wnt1, LRP5, mesdc2 y DKK1-WT. En gris los elementos endógenos de las células HEK293 de la vía de Wnt, en color los elementos transfectados en cada condición

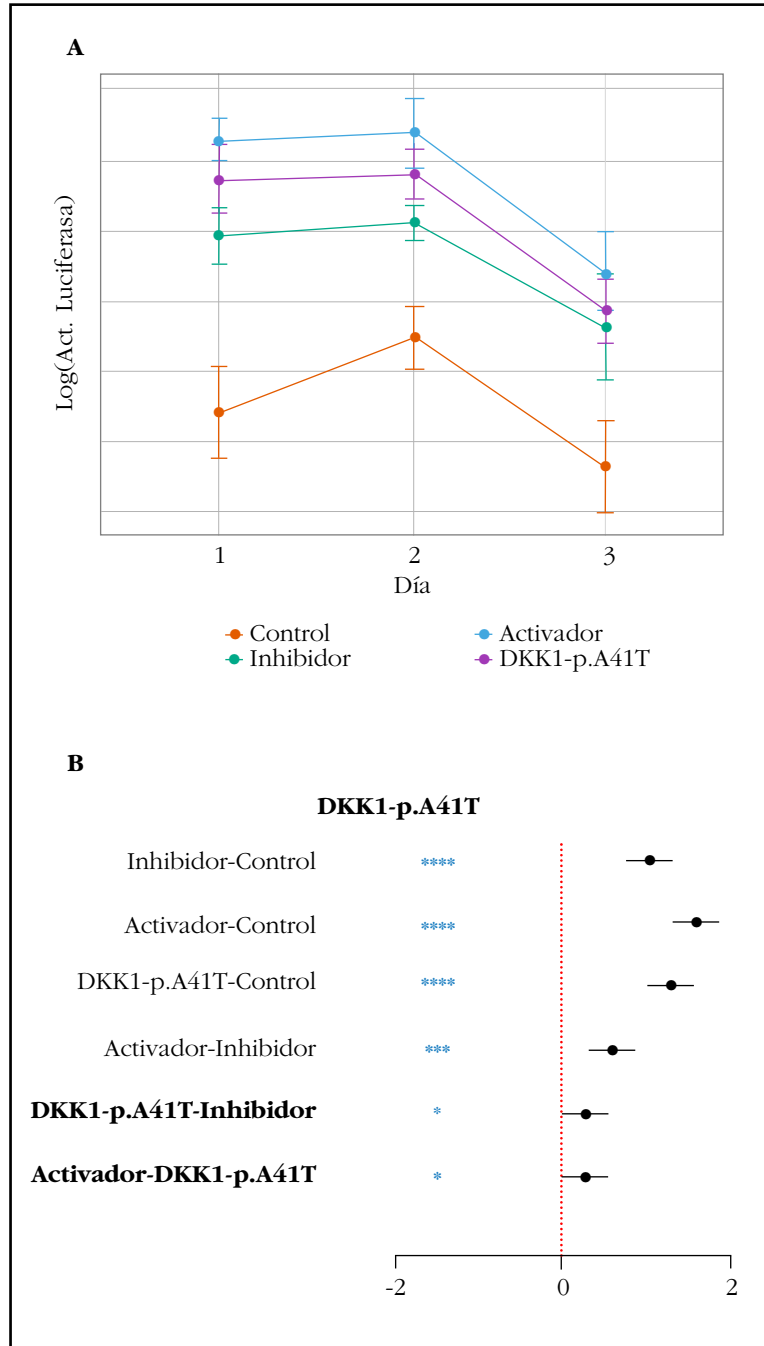


Discusión

El gen *DKK1* codifica una proteína del mismo nombre, que actúa en el espacio extracelular como inhibidor de la vía de señalización de Wnt. Numerosos estudios han asociado la vía de Wnt con la formación ósea, mientras que su bloqueo mediante esclerostina o DKK1 se ha asociado con mayor pérdida de masa ósea y riesgo de fractura. La búsqueda de variantes génicas que puedan explicar la regulación de la vía Wnt en la población general puede abrir un campo de investigación muy relevante para el estudio de la osteoporosis. En este trabajo hemos estudiado la función inhibidora de 7 proteínas DKK1 mutantes sobre la vía de Wnt y hemos observado que la proteína mutante DKK1-p.Ala41Thr presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no es debida a la pérdida de su expresión. La actividad de la proteína DKK1-p.A41T se reduce aproximadamente un 50% en comparación con la proteína DKK1-WT. La mutación, en el aminoácido 41 no se encuentra en el dominio de unión a LRP5 (aminoácidos 189-263), pero sí que afecta el motivo NAIKN (aminoácidos 40-44), crucial para la unión a las proteínas LRP5 y LRP6 y que se encuentra conservado en todos los inhibidores de la vía de Wnt²³.

Según la base de datos ExAC, la frecuencia poblacional de la variante p.Ala41Thr es de 15 heterocigotos en 60.000 individuos adultos exentos de patologías graves. Dado nuestro resultado de pérdida de actividad inhibidora de esta variante de DKK1, podríamos inferir que el fenotipo asociado sería de una mayor densidad ósea no patológica. A partir de esta frecuencia, estimamos que en España hay unos 6.000 portadores de esta variante en heterocigosis. Por otra parte, hay una única referencia a la mutación p.Ala41Thr que la asocia a patología, concretamente a la malformación de Chiari tipo I (CMI)²⁴. Esta enfermedad se caracteriza por un defecto del desarrollo del hueso occipital y la fosa posterior (PF) y la consiguiente hernia de la amígdala cerebelosa. Será interesante estudiar la posible relación entre mutaciones en *DKK1* y esta patología, que en muchos casos es asintomática y no diagnosticada.

Figura 3. Ensayo de actividad de la proteína DKK1-p.Ala41Thr. A) Gráfico de interacciones siguiendo el modelo, $Y_{ij} = \mu + \text{día} + \text{test} + \text{día:test} + \epsilon_{ijk}$. En el eje de las Y se muestra el logaritmo de la media de la *ratio* de actividades de las luciferasas (*Photinus pyralis/Renilla reniformis*) con su intervalo de confianza; en el eje de las X se muestran los tres días en los que se ha testado el experimento. B) Test Tukey de comparaciones múltiples entre las diferentes condiciones testadas. Se muestran los niveles de significación mediante el código: (****)<0,00001, (***)<0,0001, (**)<0,01, (*)<0,05



No se han encontrado diferencias en la actividad del resto proteínas mutantes y la proteína DKK1 WT. Estos resultados coinciden con los resultados encontrados por Korvala *et al.*²⁵ para la mutación p.Arg120Leu. Estos autores encontraron dicha mutación en un paciente con osteoporosis primaria, un fenotipo diametralmente opuesto al fenotipo de la mujer HBM donde nosotros encontramos la muta-

ción. Esta misma mutación se encuentra en pacientes con enfermedad de Paget (PDB)²⁶ y su frecuencia en pacientes es el doble que en controles, aunque la diferencia no resulta significativa.

Ninguna de las siete mutaciones testadas se encuentra en el dominio que afecta a la vía de señalización de Wnt (dominio de unión a LRP5: aminoácidos 189-263), y solo la p.Ala41Thr afecta al motivo NAIKN. Esto podría ser una razón por la que no se han observado diferencias de actividad inhibidora en 6 de las 7 DKK1 mutadas. Alternativamente, estas DKK1 mutantes mostrarían diferencias de actividad inhibidora menores a las que se puedan detectar con la sensibilidad del ensayo de gen reportero que se ha utilizado. Una limitación del estudio sería que el ensayo realizado conlleva la cotransfección de varios vectores para tener unos valores altos de actividad de la luciferasa, lo que le confiere una elevada variabilidad. Otra limitación sería que el efecto que se espera de estas mutaciones es pequeño, ya que son variantes presentes en la población general. Esta cuestión solo podrá resolverse cuando se disponga de algún ensayo con una mayor sensibilidad.

En conclusión, en este estudio se ha visto que la proteína DKK1-p.Ala41Thr presenta una pérdida parcial de su función inhibidora, que no se debe a su falta de expresión. Esto podría conllevar un aumento de la densidad mineral ósea en las personas de la población general portadoras de dicha mutación.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Financiación: Este estudio ha sido cofinanciado con fondos del proyecto SAF2016-75948R.

Bibliografía

- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008;371(9623):1505-12.
- Rivadeneira F, Styrkarsdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone mineral density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2010;41(11):1199-206.
- Styrkarsdóttir U, Halldórsson BV, Gudbjartsson DF, Tang NL, Koh JM, Xiao SM, et al. European bone mineral density loci are also associated with BMD in East-Asian populations. *PLoS One*. 2010;5(10):e13217.
- Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1001372.
- Estrada K, Styrkarsdóttir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012;44(5):491-501.
- Zheng HF, Forgetta V, Hsu YH, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature*. 2015;526(7571):112-7.
- Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet*. 1996;59(1):146-51.
- Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, et al. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*. 2013;92(4):565-74.
- Piters E, Culha C, Moester M, Van Bezooijen R, Adriaensen D, Mueller T, et al. First missense mutation in the SOST gene causing sclerosteosis by loss of sclerostin function. *Hum Mutat*. 2010;31(7):E1526-43.
- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19(2):179-92.
- Choi HY, Dieckmann MH, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One*. 2009;4(11):e7930.
- Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem*. 2011;286(22):19489-500.
- 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(6889):664-7.
- Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. 2001;1(3):423-34.
- Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*. 2006;39(4):754-66.
- Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e25900.
- Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Entenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(2):371-9.
- Bendell JC, Murphy JE, Mahalingam D, Halmos B, Sirard CA, Landau SB, et al. A Phase 1 study of DKN-01, an anti-DKK1 antibody, in combination with paclitaxel (pac) in patients with DKK1 relapsed or refractory esophageal cancer (EC) or gastro-esophageal junction tumors (GEJ). *J Clin Oncol*. 2016; 34, Abstract 111.
- Betts AM, Clark TH, Yang J, Treadway JL, Li M, Giovanelli MA, et al. The Application of Target Information and Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Predicting Clinical Doses of a Dickkopf-1 Antibody for Osteoporosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(1):2-13.
- Sarrion P, Mellibovsky L, Urreiziti R, Civit S, Cols N, García-Giralt N, et al. Genetic analysis of high bone mass cases from the BARCOS cohort of spanish postmenopausal women. *PLoS One*. 2014;9(4):e94607.
- Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep*. 2018;8:10951.
- Balemans W, Piters E, Cleiren E, Ai M, Van Wesenbeeck L, Warman ML, et al. The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(6):445-53.
- Bourhis E, Wang W, Tam C, Hwang J, Zhang Y, Spittler D, et al. Wnt antagonists bind through a short peptide to the first b-propeller domain of LRP5/6. *Structure*. 2011;19(10):1433-42.
- Merello E, Tattini L, Magi A, Accogli A, Piatelli G, Pavanello M, et al. Exome sequencing of two Italian pedigrees with non-isolated Chiari malformation type i reveals candidate genes for cranio-facial development. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(8):952-9.
- Korvala J, Löija M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med*. 2012;55(10):515-9.
- Beauregard M, Gagnon E, Guay-Bélanger S, Siris ES, Morissette J, Brown JP, et al. Genetic association study of dickkopf-1 and sclerostin genes with paget disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(5):405-12.