

Historyczny rys badań nad szlakiem sygnałowym Wnt

A brief history of research on the Wnt signaling pathway

Robert Kleszcz¹

Poznań

Streszczenie: Szlak sygnałowy Wnt jest zbiorem ścieżek transdukcji sygnałów, przede wszystkim parakrynnie regulujących zarówno procesy fizjologiczne m.in. embriogenezy i różnicowania, jak również zaangażowanych w nowotworowy potencjał komórek. Początki badań nad ścieżkami Wnt sięgają lat 80-tych XX wieku i związane są z identyfikacją materiału genetycznego pochodzącego z Mysiego Wirusa Raka Sutka, który po integracji z genomem myszy wpływa na aktywację protoonkogenów gospodarza. Dalszy rozwój badań pozwolił na stopniowe rozpoznanie i zrozumienie wielu fizjologicznych i patofizjologicznych funkcji szlaku Wnt, poznanie białek w nim uczestniczących oraz mechanizmów interakcji między nimi. Niniejsza praca ukazuje naukowo-historyczny rys badań nad ścieżkami sygnałowymi Wnt, do których rozwoju przyczynili się w znacznym stopniu Roel Nusse i Harold Varmus, a który to szlak wciąż pozostaje atrakcyjnym obiektem badań dla współczesnej nauki.

Summary: The Wnt signaling cascade is a set of transduction pathways, which regulate physiologic processes of e.g. embryogenesis and proliferation in a paracrine manner, but are also engaged in the tumorigenic potential of cells. The very beginning of research on the Wnt pathway reaches 1980s and was associated with the identification of the genetic material originating from the Mouse Mammary Tumor Virus which in result of integration into mouse genome is able to activate host proto-oncogenes. Further progress in the research allowed a step by step identification and understanding of many physiological and pathophysiological functions of the Wnt pathway, including the identification of involved proteins and mechanisms of their interactions. This article focuses on a historical view on the development of research on Wnt signaling, which was significantly contributed by the work of Roel Nusse and Harold Varmus and which is still an attractive object of research for contemporary science.

Słowa kluczowe: szlak sygnałowy Wnt, wirusy onkogenne, karcynogeneza, historia medycyny

Keywords: Wnt signaling pathway, oncogenic viruses, carcinogenesis, history of medicine

Wstęp

Szlak sygnałowy Wnt jest w rzeczywistości zbiorem ścieżek transdukcji sygnałów, często rozróżnianych jako ścieżka klasyczna (kanoniczna) oraz ścieżki nieklasyczne,

¹ Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, kierownik prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań.

które odpowiedzialne są za regulację embriogenezy, różnicowania i proliferacji komórek, jednocześnie stanowiąc molekularną podstawę patogenezy chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych i metabolicznych². Co ciekawe, pierwsze doniesienia na temat powyższego szlaku wskazywały na jego znaczenie w kancerogenezie, podczas gdy normalne funkcje komórkowe pozostawały nieznanne.

Opis współcześnie znanego szlaku Wnt jest efektem zapoczątkowanych w latach 30-tych XX wieku badań nad onkogennymi retrowirusami. Opisano wówczas zjawisko zwiększonej podatności niektórych szczepów myszy na występowanie raka gruczołu piersiowego, jednocześnie wskazując na przenoszenie tej choroby na potomstwo za pośrednictwem mleka matki³. Późniejszy rozwój wiedzy z obszaru genetyki i biologii molekularnej pozwolił na zidentyfikowanie Mysiego Wirusa Raka Sutka (ang. *Mouse Mammary Tumor Virus*, MMTV) jako „zakaźnego” czynnika obecnego w mleku myszy⁴.

Za rzeczywisty początek badań nad szlakiem sygnałowym, określanym później nazwą Wnt, uznać można rok 1982, kiedy to Roel Nusse i Harold Varmus jako pierwsi określili miejsce integracji (ang. *common integration site*) prowirusa MMTV z genomem komórek gospodarza⁵. Jakie miało to znaczenie dla opisu interesującej nas ścieżki sygnałowej?

Geneza, czyli u źródeł Wnt

Określenie „Wnt” lub inaczej *Wingless-related integration site*, jest efektem zestawienia nazw genów *Wg* (*Wingless*) oraz *int1* (*integrase 1*). Odkrycie zależności między *Wg* a *int1* spowodowało, że od roku 1991 stosuje się zunifikowaną nomenklaturę genów rodziny Wnt6. Z czego wynika takie ujednoczenie?

Retrowirusy, w tym MMTV, zdolne są do utworzenia na bazie własnego genomowego RNA kopii w formie DNA, ulegającej integracji z DNA komórek gospodarza. Zgodnie z pierwotnym założeniem najprostszy mechanizm inicjacji kancerogenezy (pochodnej infekcji MMTV) zakładał bezpośrednią aktywność materiału genetycznego wirusa jako onkogenu. W przypadku MMTV nie udowodniono jednak wystarczającego wpływu samej infekcji wirusem na transformację nowotworową

² K. Koziński, A. Dobrzyń, *Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki*, „Postępy Hig. Med. Dośw” 2013, 67, s. 1098-1108. doi: 10.5604/17322693.1077719.

³ J. Bittner, *Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice*, „Science” 1936, 84, s. 162; R. Korteweg, *On the manner in which the disposition to carcinoma of the mammary gland is inherited in mice*, „Genetics” 1936, 18, s. 350-371; R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed*, „The EMBO Journal”, 2012, 31, s. 2670-2684. doi: 10.1038/emboj.2012.146.

⁴ M.J. Lyons, D.H. Moore, *Purification of the mouse mammary tumour virus*, „Nature” 1962, 194, s. 1141-1142.

⁵ R. Nusse, H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*, „Cell” 1982, 31, s. 99-109. doi: 10.1016/0092-8674(82)90409-3.

⁶ R. Nusse, A. Brown, J. Papkoff, P. Scambler, G. Shackleford, A. McMahon, et al, *A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family*, „Cell” 1991, 64, s. 231. doi: 10.1016/0092-8674(91)90633-A.

komórek gospodarza⁷. Lepszym wyjaśnieniem okazał się model aktywacji protoonkogenów gospodarza za pośrednictwem insercji prowirusowego DNA, m.in. przed sekwencją kodującą danego genu. Wówczas zintegrowana sekwencja prowirusa może spełniać rolę promotora ekspresji w komórkach gospodarza⁸. Integracja obcego DNA niewspółmiernie częściej zachodzi w sposób przypadkowy w porównaniu z wymianą homologiczną określonych fragmentów matrycy DNA. Dopiero w wyniku naturalnej selekcji dojść może do utrwalenia i powielenia pokolenia komórek, których integracja dotyczy obszaru protoonkogenu korzystnego dla rozwoju nowotworu⁹.

Nusse i Varmus na początku lat 1980-tych w badaniach nad myszami zainfekowanymi przez MMTV analizowali komórki z pojedynczą kopią prowirusowego DNA. Dzięki dalszej identyfikacji specyficznego dla komórek nowotworowych mRNA dowiedli istnienia w genomie gospodarza protoonkogenu aktywowanego transkrypcyjnie przez sekwencję pochodzącą z MMTV. Gen ten nazwali *int1* (*integrase 1*), wskazując na pierwszy odkryty wspólny dla tych komórek nowotworowych obszar integracji wirusowego DNA¹⁰. Pomimo naukowego sukcesu, sami odkrywcy *int1* wskazują na początkowo ograniczony wpływ ich wyników na rozwój badań nad kancerogenezą, przyćmionych równoległymi odkryciami innych współcześnie dobrze znanych protoonkogenów, takich jak *Ras* lub *cMYC*¹¹. Niemniej jednak dalsze poznawanie sekwencji genu *int1* sugerowało, że transkrypt mRNA powstały na jego bazie powinien być także matrycą dla biosyntezy białka *int1*. Chociaż jego izolacja przez wiele lat nie kończyła się sukcesem, to dowody eksperymentalne wskazywały na bezpośredni wpływ ekspresji *int1* na rozwój nowotworów gruczołu piersiowego w modelach mysiej kancerogenezy¹².

Rozwój badań nad *int1* w znacznej mierze wynikał z jego wysokiej homologii między gatunkami, w tym również obecności w genomie *Drosophila melanogaster*, potocznie zwanej muszką owocową. Wśród genów odpowiedzialnych za biegunowość segmentów ciała owada opisano m.in. rodzinę genów *Wingless*. Regulują one proces segmentacji ciała podczas embriogenezy¹³ oraz, jak dowiedziono później – powsta-

⁷ R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts...*

⁸ W.S. Hayward, B.G. Neel, S.M. Astrin, *Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis*, "Nature" 1981, 290, s. 475-80; R. Nusse, H. Theunissen, E. Wagenaar, F. Rijsewijk, A. Gennissen, A. Otte, et al, *The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus*, "Mol. Cell. Biol." 1990, 10, s. 4170-4179. doi: 10.1128/MCB.10.8.4170.

⁹ R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts...*

¹⁰ R. Nusse, A. van Ooyen, D. Cox, Y.K. Fung, H. Varmus, *Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15*, "Nature" 1984, 307, s. 131-6; R. Nusse, H.E. Varmus. *Many tumors induced...*

¹¹ J.M. Bishop, *Cellular oncogenes and retroviruses*, "Ann. Rev. Biochem." 1983, 52, s. 301-54; R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts...*

¹² A.S. Tsukamoto, R. Grosschedl, R.C. Guzman, T. Parslow, H.E. Varmus, *Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice*, "Cell" 1988, 55, s. 619-25. doi: 10.1016/0092-8674(88)90220-6.

¹³ C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*, "Nature" 1981, 287, s. 795-801.

nie odnóży w okresie przepoczwarczenia¹⁴. Charakterystyczna nazwa *Wingless* wynika z cech fenotypowych muszek obarczonych mutacją wspomnianych genów (bezskrzydłe mutanty)¹⁵.

Zależność między genami *Wingless* muszki owocowej oraz *int1* u myszy odkryta została dzięki wykorzystaniu techniki tworzenia map restrykcyjnych, udowadniając homologię ich sekwencji¹⁶. Jednorodność odmiennie identyfikowanych do tej pory genów przyczyniła się do stworzenia nowego pojęcia „genów *Wnt*”, których kolejne białkowe odpowiedniki były w dalszym ciągu skutecznie odkrywane. Od tamtej pory według nowej nomenklatury opisany w 1982 roku gen *int1* nazywany jest *Wnt1*¹⁷.

Droga od niewielkiej rodziny genów do szlaku sygnałowego Wnt

Jak wspomniano we wstępie, początki badań nad współcześnie znanym szlakiem *Wnt* wynikały z zainteresowania onkogennym działaniem infekcji wirusem MMTV. Dopiero identyfikacja homologii między genami *Drosophila melanogaster* a mysim protoonkogenem *int1* pozwoliły na zrozumienie fizjologicznych funkcji białek *Wnt* również w komórkach ssaków. Począwszy od roku 1990 wskazano na znaczenie białek z rodziny *Wnt* dla kontroli rozwoju organizmu, nie tylko w fazie embrionalnej i podczas życia płodowego, ale również dorosłych osobników¹⁸. Istotność ekspresji *Wnt* podkreślono m.in. poprzez zaangażowanie w prawidłowy rozwój ośrodkowego układu nerwowego, płuc, twarzoczaszki, kręgosłupa czy serca¹⁹.

Kluczową cechą genów *Wnt* niespotykaną dotychczas było ich jednoczesne zaangażowanie w rozwój zdrowego organizmu, a zarazem znaczenie dla potencjału wzrostowego komórek nowotworowych²⁰. Badania nad różnymi typami nowotworów

¹⁴ J. Wu, S.M. Cohen, *Repression of Teashirt marks the initiation of wing development*, "Development" 2002, 129, s. 2411-2418.

¹⁵ R.P. Sharma, V.L. Chopra, *Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster*, "Dev Biol." 1976, 48, s. 461-465. doi: 10.1016/0012-1606(76)90108-1.

¹⁶ F. Rijsewijk, M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel, R. Nusse, *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*, "Cell" 1987, 50, s. 649-657. doi: 10.1016/0092-8674(87)90038-9.

¹⁷ R. Nusse, A. Brown, J. Papkoff, P. Scambler, G. Shackleford, A. McMahon, et al, *A new nomenclature for...*

¹⁸ B.J. Gavin, J.A. McMahon, A.P. McMahon, *Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development*, "Genes Dev." 1990, 4, s. 2319-2332. doi: 10.1101/gad.4.12b.2319.

¹⁹ K. Augustine, E.T. Liu, T.W. Sadler, *Antisense attenuation of Wnt-1 and Wnt-3a expression in whole embryo culture reveals roles for these genes in craniofacial, spinal cord, and cardiac morphogenesis*, "Dev. Genet." 1993, 14, s. 500-520; A.P. McMahon, A. Bradley, *The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain*, "Cell" 1990, 62, s. 1073-1085, doi: 10.1016/0092-8674(90)90385-R; H. Roelink, R. Nusse, *Expression of two members of the Wnt family during mouse development-restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube*, "Genes Dev." 1991, 5, s. 381-388, doi: 10.1101/gad.5.3.381.

²⁰ F. Rijsewijk, M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel, R. Nusse, *The Drosophila homo-*

nie przyniosły potwierdzenia hipotezy zakładającej znaczenie mutacji genów *Wnt* w promowaniu kancerogenezy. Zmiany w ich sekwencji nie zostały zidentyfikowane. Rozwiązaniem stała się zmiana postrzegania genów *Wnt* jako niezależnych czynników pronowotworowych na rzecz znaczenia nadmiernej aktywności całego szlaku sygnałowego, który białka *Wnt* inicjują²¹.

Produktem ekspresji genu *Wnt1* jest glikoproteina bogata w cysteiny, podlegająca sekrecji poza komórkę. Białka *Wnt* pozostają zasocjowane z komórką, z której zostały wydzielone lub znajdują się w niedalekiej przestrzeni od niej. Chociaż niewiele było wiadomo, w jaki sposób dochodzi do odpowiedzi komórek na obecność białek *Wnt*, już wtedy obserwowano oddziaływanie autokrynne i parakrynne (*cell to cell*) *Wnt*, regulujące przykładowo zdolność komórek do adhezji i wzrostu²².

Aby mówić o szlaku sygnałowym *Wnt*, poza inicjującymi cząsteczkami białek niezbędne stało się zidentyfikowanie zarówno pośrednich elementów transdukcji swoistych komunikatów komórkowych jak i właściwych efektorów. Odnośnie zdolności białek *Wnt* do ingerowania w procesy adhezji komórkowej nieocenioną rolę odgrywa β -katenina. Wykazuje ona ścisłą interakcję z E-kadheryną, nabłonkowym białkiem adhezyjnym, regulując wspólnie międzykomórkową adhezję. Jednocześnie β -katenina została zidentyfikowana jako homolog produktu ekspresji genu *Armadillo* zaangażowanego w kontrolę biegunowości segmentów ciała kręgowców²³. Oddziaływanie białka *Wnt1* w komórkach ssaków przyczynia się do kumulacji β -kateniny i promowania dalszego oddziaływania z kadherynami²⁴. Inną cząsteczką o pewnej, choć wówczas nieznannej szczegółowo roli w utrzymaniu homeostazy komórkowej, było białko APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). Mutacje genu kodującego APC skutkujące ekspresją białka o skróconym łańcuchu aminokwasowym przyczyniają się do występowania rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego²⁵. Białko APC tworzy kompleks z opisaną wcześniej β -kateniną. W wyniku aktywności białek *Wnt* zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu β -kateniny, jednakże występującej w formie monomerycznej. Z kolei zwiększone ilości cząsteczek APC doprowadzały do redukcji jej wolnej formy. Powyższe obserwacje wskazały na protekcyjną rolę białek *Wnt* wobec komórkowych stężeń β -kateniny obserwowanej

²¹ R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts...*

²² R.T. Moon, A. DeMarais, D.J. Olson, *Responses to Wnt signals in vertebrate embryos may involve changes in cell adhesion and cell movement*, "J. Cell Sci. Suppl". 1993, 17, s. 183-188; N.T. Parkin, J. Kitajewski, H.E. Varmus, *Activity of Wnt-1 as a transmembrane protein*, "Genes Dev." 1993, 7, s. 2181-2193, doi: 10.1101/gad.7.11.2181; B.D. Smolich, J.A. McMahon, A.P. McMahon, J. Papkoff, *Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface*, "Mol. Biol. Cell." 1993, 4, s. 1267-1275, doi:10.1091/mbc.4.12.1267.

²³ M. Peifer, P.D. McCrea, K.J. Green, E. Wieschaus, B.M. Gumbiner, *The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties*, "J. Cell Biol." 1992, 118, s. 681-691.

²⁴ L. Hinck, W.J. Nelson, J. Papkoff, *Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin*, "J. Cell Biol." 1994, 124, s. 729-741.

²⁵ J. Groden, A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, et al, *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*, "Cell." 1991, 66, s. 589-600, doi: 10.1016/0092-8674(81)90021-0.

w różnych obszarach, w tym wewnątrz jądra komórkowego oraz na powierzchni błony komórkowej²⁶.

W połowie lat 1990-tych znajomość składowych szlaku sygnałowego *Wnt* obejmowała zaledwie kilka białek. Poza wymienionymi już *Wnt* oraz β -kateniną, występująca w wolnej monomerycznej formie lub w postaci kompleksu z białkiem APC, znane były również: kinaza syntazy glikogenu GSK3 β (ang. *Glycogen Synthase kinase 3 β*) wskazująca na zaangażowanie stanu ufosforylowania odpowiednich molekuł w regulację aktywności szlaku, białka Dishevelled o domniemanej inhibicyjnej aktywności wobec GSK3 β oraz porcupina – acylotransferaza prowadząca palmitoilację cysteiny w pozycji 77 w łańcuchu polipeptydowym białek *Wnt*, co jest niezbędną modyfikacją ich struktury dla prawidłowej sekrecji do przestrzeni międzykomórkowej²⁷. Pomimo dostrzegania wzajemnych relacji wymienionych wyżej elementów szlaku sygnałowego, wciąż nieznane pozostawały zarówno receptory odpowiedzialne za przekazywanie odpowiedzi na krążące w przestrzeni międzykomórkowej białka *Wnt* do wnętrza komórki efektorowej, jak i precyzyjny mechanizm docelowej odpowiedzi na aktywację tej ścieżki sygnałowej (kontrola transkrypcji odpowiednich genów docelowych w jądrowym DNA).

Kolejne lata pozwoliły na uzupełnienie brakujących elementów ścieżki sygnałowej *Wnt*, by na przełomie XX i XXI wieku opisywany model był już wystarczający do zrozumienia roli tego szlaku m.in. w promowaniu onkogennego potencjału komórek. Błonowe receptory dla ligandów *Wnt* po raz pierwszy rozpoznane zostały w roku 1996 jako rodzina białek Frizzled zidentyfikowanych w organizmie muszki owocowej²⁸. Stwierdzenie „rozpoznane” nie jest tu przypadkowe, gdyż geny *Frizzled* znane były już blisko dziesięć lat wcześniej jako odpowiedzialne za właściwą orientację przestrzenną komórek w obrębie powstającej tkanki²⁹. Wśród produktów ekspresji genów związanych z biegunowością ciała zidentyfikowano także białka LRP 5/6 (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*), które okazały się być niezbędnymi koreceptorami dla kompleksu *Wnt*-Frizzled³⁰. Znajomość wiodącej roli β -kateniny doprowadziła do wyjaśnienia sposobu regulacji jej cytozolowych stężeń. Udowodniono, że zwiększone ilości β -kateniny nie wynikają z kontroli syntezy tego białka, lecz są

²⁶ N. Funayama, F. Fagotto, P. McCrea, B.M. Gumbiner, *Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling*, "J. Cell Biol." 1995, 128, s. 959-968; J. Papkoff, B. Rubinfeld, B. Schryver, P. Polakis, *Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes*, "Mol. Cell Biol." 1996, 16, s. 2128-2134.

²⁷ T. Kadowaki, E. Wilder, J. Klingensmith, K. Zachary, N. Perrimon, *The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing*, "Genes Dev." 1996, 10, s. 3116-3128, doi: 10.1101/gad.10.24.3116; R. Nusse, H. Varmus, *Three decades of Wnts...*; S.A. Steitz, M. Tsang, D.J. Sussman, *Wnt-mediated relocalization of dishevelled proteins*, "In Vitro Cell Dev. Biol. Anim." 1996, 32, s. 441-445.

²⁸ P. Bhanot, M. Brink, C.H. Samos, J.C. Hsieh, Y. Wang, J.P. Macke, et al, *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*, "Nature" 1996, 382 s. 225-230, doi: 10.1038/382225a0.

²⁹ C.R. Vinson, P.N. Adler, *Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of Drosophila*, "Nature" 1987, 329, s. 549-551, doi: 10.1038/329549a0.

³⁰ M. Wehrli, S.T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Vaizel-Ohayon, et al. *Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling*, "Nature" 2000, 407, s. 527-530, doi: 10.1038/35035110.

efektem regulacji procesu jego destrukcji. Co więcej, aksyna będąca negatywnym regulatorem szlaku *Wnt*, tworząc kompleks z GSK3 β oraz β -kateniną przyczynia się do promowania GSK3 β -zależnej fosforylacji β -kateniny i jej dalszej degradacji w wyniku naznaczenia ubikwityną i przekierowania do lizy w proteasomach³¹. Wreszcie, czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za efekt pobudzenia szlaku Wnt w postaci promowania ekspresji odpowiednich genów w jądrowym DNA, zdolnymi jednocześnie do interakcji z β -kateniną, okazała się być rodzina białek TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*)³². Podobnie jak w przypadku receptorów Frizzled – były one znane już kilka lat wcześniej, jednak wówczas przypisywano im jedynie funkcję czynników transkrypcyjnych w komórkach T układu odpornościowego³³. W kontekście szlaku Wnt, TCF/LEF spełniają dwojaką rolę. W przypadku braku pobudzenia szlaku dochodzi do opisanej wcześniej proteasomalnej degradacji β -kateniny, przez co nie może ona dotrzeć do jądra komórkowego. Wówczas dany kompleks TCF/LEF w wyniku asocjacji m.in. z białkiem Groucho przyjmuje funkcję represora transkrypcji. W przypadku pobudzenia szlaku Wnt i wzrostu cytozolowych stężeń β -kateniny, jej znaczne ilości przedostają się do jądra komórkowego. Powoduje ona wówczas wypieranie białka Groucho na rzecz utworzenia aktywnego kompleksu z czynnikiem TCF/LEF³⁴. Dzięki temu dojść może do promowania ekspresji różnorodnych genów związanych z kontrolą komórkowej homeostazy, w tym czynników transkrypcyjnych (np. cMYC, TCF, LEF), cyklin regulujących cykl komórkowy (np. cyklina D1), prozapalnych cytokin (np. IL-8) oraz metaloproteinaz (np. MMP-7)³⁵.

Wiek XXI zamienia ścieżkę Wnt w rozbudowaną sieć sygnalizacyjnych zależności

Wzbogacenie stanu wiedzy o wymienione wcześniej elementy składowe szlaku sygnałowego Wnt jednoznacznie przyczyniło się do postępu w zrozumieniu jego funkcji, zarówno fizjologicznych jak i związanych z procesami chorobowymi. Stopniowe po-

³¹ S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, A. Kikuchi, *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." 1998, 17, s. 1371-1384, doi: 10.1093/emboj/17.5.1371; K. Orford, C. Crockett, J.P. Jensen, A.M. Weissman, S.W. Byers, *Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin*, "J. Biol. Chem." 1997, 272, s. 24735-24738, doi: 10.1074/jbc.272.40.24735.

³² M. Molenaar, M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, et al, *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*, "Cell." 1996, 86, s. 391-399, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80112-9.

³³ M. van de Wetering, M. Oosterwegel, F. Holstege, D. Dooyes, R. Suijkerbuijk, A. Geurts van Kessel, et al, *The human T cell transcription factor-1 gene. Structure, localization, and promoter characterization*, "J. Biol. Chem." 1992, 267, s. 8530-8536.

³⁴ D.L. Daniels, W.I. Weis, *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*, "Nat Struct Mol Biol." 2005, 12, s. 364-371, doi: 10.1038/nsmb912; Q. Eastman, R. Grosschedl, *Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals*, "Curr. Opin. Cell Biol." 1999, 11, s. 233-240, doi: 10.1016/S0955-0674(99)80031-3.

³⁵ H.A. Baarsma, M. Königshoff, R. Gosens, *The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets*, "Pharmacol. Ther." 2013, 138, s. 66-83, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.002.

znawanie ścieżki sygnałowej Wnt, którą w ogólnym chronologicznym zarysie przedstawiono w poprzedniej części artykułu, zaczęto określać mianem ścieżki klasycznej/kanonicznej, podkreślając tym samym kluczowe znaczenie stabilizowanej β -kateniny i aktywowanego przez nią czynnika transkrypcyjnego TCF/LEF³⁶. W przeciwieństwie do niej wyróżnia się obecnie szereg nieklasycznych/niekanonicznych ścieżek, których wspólną cechą jest niezależność od β -kateniny i TCF/LEF, a jednocześnie inicjowanie kaskady sygnałów także poprzez obecność białek Wnt. Rola tych ścieżek pozostaje wciąż w znacznym stopniu nieznaną, choć już teraz wskazuje się na ich zdolność do negatywnej regulacji funkcji β -kateniny i TCF/LEF oraz udział w rearanżacji cytoszkieletu i migracji neuronów³⁷.

Kolejnym obszernym zagadnieniem dotyczącym sygnalizacji Wnt jest regulacja tego szlaku za pośrednictwem odpowiednich białkowych inhibitorów. Wśród nich zidentyfikowano zewnątrzkomórkowe inhibitory białek Wnt, takie jak białka sFRP (ang. *secreted Frizzled-related proteins*) wykazujące homologię w stosunku do receptorów Frizzled ze względu na obecność bogatej w cysteinę domeny wiążącej ligandy Wnt³⁸. Innym czynnikiem hamującym okazał się być WIF (ang. *Wnt inhibitory factor*), którego interakcja z białkami Wnt wynikać może z rozpoznawania przez WIF reszt palmitoilowych obecnych na powierzchni ligandów³⁹. Podobny obszar działania z nieco odmiennym punktem uchwytu wykazują białka Dickkopf i Wise, tworzące kompleksy z koreceptorem LRP, co uniemożliwia powstanie aktywnej formy receptora dla ligandów Wnt⁴⁰.

Podsumowując fizjologiczne znaczenie szlaku Wnt, poza wcześniej wspomnianą rolą w embriogenezie, różnicowaniu, proliferacji i zdolności do migracji komórek oraz oczywiście nadmiernej aktywności tego szlaku podczas kancerogenezy, szczególnie w nowotworach jelita grubego, aktualnie podkreśla się rolę sygnalizacji Wnt w chorobach metabolicznych i neurodegeneracyjnych. W drugim przypadku jest to przede wszystkim związane z funkcją, jaką szlak Wnt pełni dla rozwoju układu nerwowego. Z kolei znaczenie dla metabolizmu komórki wynika z nasilenia ekspresji wielu genów szlaku glikolizy i lipolizy⁴¹. Precyzyjne mechanizmy i molekularne skutki tej aktywności np. dla rozwoju fenotypu nowotworowego komórki, wymagają ciągle

³⁶ B.T. MacDonald, K. Tamai, X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*, "Dev. Cell." 2009, 17, s. 9-26, doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.

³⁷ Y. Komiya, R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*, "Organogenesis" 2008, 4, s. 68-75; K. Koziński, A. Dobrzyń. *Szlak sygnałowy Wnt...*

³⁸ A. Rattner, J.C. Hsieh, P.M. Smallwood, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, et al, *A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors*, "Proc Natl Acad Sci U S A." 1997, 94, s. 2859-2863.

³⁹ J.C. Hsieh, L. Kodjabachian, M.L. Rebbert, A. Rattner, P.M. Smallwood, C.H. Samos, et al, *A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities*, "Nature". 1999, 398, s. 431-436, doi: 10.1038/18899; K. Koziński, A. Dobrzyń. *Szlak sygnałowy Wnt...*

⁴⁰ N. Itasaki, C.M. Jones, S. Mercurio, A. Rowe, P.M. Domingos, J.C. Smith, *Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signaling*, "Development" 2003, 130, s. 4295-4305, doi: 10.1242/dev.00674; V.E. Krupnik, J.D. Sharp, C. Jiang, K. Robison, T.W. Chikering, L. Amaravadi, et al, *Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family*, "Gene" 1999, 238, s. 301-313.

⁴¹ K. Koziński, A. Dobrzyń. *Szlak sygnałowy Wnt...*

dokładnego wyjaśnienia, podobnie jak i wiele wątków dotyczących samego szlaku Wnt⁴².

Wnioski

Krótki rys naukowo-historyczny szlaku sygnałowego Wnt, jaki zaprezentowany został w przedstawionej pracy ukazuje, jak często do wielkich odkryć naukowych dojść może dzięki intensywnej pracy, uporowi i pasji osób, takich jak Roel Nusse i Harold Varmus. Dzięki rozwikłaniu zagadki dziedzicznych nowotworów gruczołu piersiowego u myszy i identyfikacji genu *int1*, „przemianowanego” później w gen *Wnt1*, doszło do odkrycia i opisanego wielu mechanizmów odpowiedzialnych za fizjologiczne i patologiczne funkcje także organizmu człowieka. Ponad trzydziestoletnia historia badań nad Wnt jest też doskonałym przykładem stopniowego odkrywania i dopasowywania elementów „układanki” tworzącej współcześnie opisane zależności. Jak ważne są to badania wskazywać może choćby ranga czasopism, w których badacze szlaku *Wnt* dzielili się swoimi odkryciami.

W kontekście zaangażowania ścieżek Wnt w procesy nowotworowe wiele już wiadomo. Znana jest rola aktywacji przede wszystkim kanonicznej ścieżki Wnt wraz ze znaczeniem β -kateniny dla jej promowania, często za pośrednictwem mechanizmów zwiększania jej cytoplazmatycznych stężeń. Do nadekspresji szlaku Wnt dochodzić może na bardzo wielu etapach, w tym także na drodze epigenetycznego wyciszenia inhibitorów klasycznej ścieżki⁴³. Obecna mnogość informacji dotyczących „Wnt” powodować może, że coraz trudniej jest zidentyfikować wiedzę najistotniejszą chociażby dla projektowania terapii przeciwnowotworowej opartej o inhibicję wspomnianego szlaku. Dlatego też współcześnie istotnym celem badań nad sygnalizacją Wnt będzie wskazanie molekularnych punktów uchwytu (ang. *molecular targets*) dla jej efektywnej inhibicji w komórkach nowotworowych. Jednocześnie należy pamiętać o fizjologicznych funkcjach jakie szlak Wnt pełni w prawidłowych komórkach i o ryzyku potencjalnych działań niepożądanych wynikających z ingerencji w jego aktywność. W niedalekiej perspektywie należy mieć nadzieję, że ścieżki sygnałowe Wnt, interesujące pod względem naukowym, staną się również istotne dla medycyny w codziennej praktyce klinicznej.

⁴² J. Yu, D.M. Virshup, *Updating the Wnt pathways*, „Biosci. Rep.” 2014, 34, s. e00142, doi: 10.1042/BSR20140119.

⁴³ J. Paluszczak, J. Sarbak, M. Kostrzevska-Poczekaj, K. Kiwerska, M. Jarmuż-Szymczak, R. Grenman, et al., *The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival*, „Tumour Biol.” 07.12.2014 (on-line), doi: 10.1007/s13277-014-2913-x.