

Wnt SİNYAL MEKANİZMASI VE OMURGA GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ülker SÖNMEZ⁽¹⁾, Bekir Uğur ERGÜR⁽¹⁾

Omurga gelişimi, hücre farklılaşması, apoptoz ve proliferasyon arasındaki dengenin bir sonucudur. Bu sistem son derece koordine ve sıkı embriyonik-genetik kontrol mekanizmaları altında gelişimini tamamlar. Omurgalılarda somitik mezodermin dorsoventral şekillenmesi, komşu dokularda eksprese edilen faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Ventral nöral tüp ve notokord, ventral somit türevi olan sklerotomun oluşumunu indüklerken, dorsal nöral tüp ve yüzey ektodermi somit hücrelerini dorsal dermomyotomal farklılaşma için indükler. İndüklenen bu dokularda bazı sinyal molekülleri aktif hücre farklılaşma döneminde eksprese edilir. Bu sinyal molekülleri içinde Hedgehog, Wnt ve BMP gen ailesinin üyeleri bulunur. Ancak, bu sinyal moleküllerinin fonksiyonlarının dorsoventral somit şekillenmesi üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir⁽⁵⁾.

Omurgalı embriyolarında başlangıçta segmente olmamış paraksiyel mezoderm somit adı verilen yapıların oluşumuna yol açar. Segmental plaktan ilk somitler oluştuğunda, polariteden yoksun basit epiteliyal yapılar olarak gözlenir. Gelişme ilerledikçe, her somitin dorsoventral aksı boyunca morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar açığa çıkar. Ventral somit epiteli sklerotomu oluşturmak üzere değişim göstererek mezenşime farklılaşırken, dorsal somit epiteli dermomyotomu oluşturmak üzere epiteliyal yapısını korur. Dermomyotom daha sonra ikincil bir epiteliyal tabaka olan myotoma farklılaşır. Somitin polarize

olan dorsoventral bölümlerinden farklı oluşumlar meydana gelir. Dorsoventral kısmından (dermomyotom'dan) aksiyal iskelet kasları ve dermis, ventromedial kısmından (sklerotom'dan) kaburgalar, omurlar ve intervertebral disklerin prekürsör hücreleri farklılaşır. Bu gelişim sürecinde somitler daha ileri bölümlenmeye giderek medial ve lateral kompartmanlar oluşturur. Oluşan bu medial kompartman aksiyal kas ve iskelet oluşumuna yol açarken, lateral kompartman ise ekstremiteler ve gövde kaslarının gelişimine yol açar. Somitlerden iskelet sisteminin ve elemanlarının oluşumu farklı gen aileleri tarafından düzenlenir. Farklı gen ailelerinin bu fonksiyonu komşu yapıların sinyalleri ile kontrol edilir. Dorsoventral aks boyunca somitik hücrelerin özelleşmesinin komşu dokular tarafından sağlanan sinyallere bağlı olduğu bilinmektedir. Örneğin sklerotomun farklılaşması ve bölümlenmesi notokord, taban plağı gibi ventral aksiyal yapılar tarafından oluşturulan sinyallere gereksinim duyar⁽⁵⁾. Bu güne kadar omurga gelişimini açıklamak için ortaya konmuş pek çok kontrol mekanizmalarından son dönemde ön plana çıkanlardan birisi Wnt grubu sinyal molekülleri ailesidir^(4,5,9,11,13,14).

Wnt gen ailesinin ilk tanımlanması, bu ailenin ilk bulunan üyesi olan Wnt-1'in meme dokusunda proto-onkogenik özelliklerinin bulunmasına dayanır^(1,18). Daha sonraki dönemde, proto-onkogenik özelliklerin yanı sıra Wnt genlerinin hem embriyonik kök hücrelerinin özelleşmelerinde ve

¹ Araştırma Görevlisi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.

değişimlerinde hem de embriyonik dokuların şekillenmelerinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir^(3,4,7,8,14,21). Günümüzde, Wnt gen ailesine ait 16'dan fazla birbirine temel yapı olarak benzeyen fakat özgün nitelikte Wnt geninin varlığı gösterilmiştir. Bu genler reseptörlerine bağlanmada önemli rol oynayan sistein'den zengin bölgeler içeren, glikoprotein yapıda, ekstrasellüler bölgeye salınan sinyal yolu uyarıcılarıdır. Bu genlerin bazılarının gastrulasyon boyunca eksprese edilerek önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle Wnt-3'ün fare embriyosunda mezoderm oluşumu için önemli olduğu bulunmuştur⁽¹³⁾. Yapılan çalışmalarda, Wnt-3a'nın nöral ve paraksiyal mezoderm arasındaki hücrelerin geleceği için gerekli olduğu bulunmuş ayrıca mezodermal ve nöral hücrelerin akibeti arasında bir denge sağladığı gösterilmiştir. Bunlardan anlaşılacağı gibi, Wnt-3a primitif çizgi ektodermi ve kuyruk tomurcuğunda oluşan gelişimsel olaylarda çeşitli roller oynamaktadır^(11,13).

Hem karsinogenezde hem de pek çok dokunun embriyonik gelişiminde önemli rol oynayan Wnt sinyal yolu kaskadının temel mekanizması şu şekilde özetlenebilir^(3,4,7,8,14,21):

A- Wnt sinyal yolu kaskadının fonksiyonel olduğu hücrelerde, bu sinyal yolu aktif değil iken Dsh (Dishevelled) inaktif, "glikojen sentaz kinaz-3B" (GSK-3B) ise aktif durumda olan proteinlerdir. Dolayısıyla bu durumda GSK3B ve beraberiindeki "Aksin" ve bir tümör baskılayıcı faktör olan APC'den oluşan kompleks, 13-katenin' in fosforilasyonunu ve protozomlarda degrade edilmesini sağlar. 13-katenin'in degradasyonu da hücre çekirdeğinde "Tcf/Lef" grubu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak Wnt sinyal yolunun hedefi olan genlerin transkripsiyonlarını baskılamalarına olanak sağlar.

B- Wnt sinyal proteini, reseptörüne bağlanarak hücreyi uyardığında Dsh aktif hale geçer ve GSK-3B'nin aktivitesini baskılayıcı etki gösterir.

Bu durumda GSK-3B-Aksin-APC kompleksinin b-katenin'i fosforile etkisi ortadan kalkar ve hücre içinde b-katenin konsantrasyonu artar. Hücre içinde biriken b-katenin başlıca iki mekanizmayı tetikler⁽¹⁹⁾. Bunlardan birincisi, b-katenin hücre membranındaki N-kadherin'in hücre içi bölümüne bağlanarak, hücreler arasındaki bağlantıyı güçlendirip stabilize eden mekanizmadır. İkincisi ise, hücre çekirdeği içine girerek "Tcf/Lef" transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, Wnt sinyal yolunun hedef aldığı genlerin transkripsiyonlarına olanak sağlayan mekanizmadır. Bu genler arasında hücre proliferasyonu, polarizasyonunu, değişimini direkt olarak etkileyen genlerin varlığı gösterilmiştir^(16,17,20). Hücreler arası bağlantı, hücre proliferasyonu, hücre değişimi ve hedef gen ekspresyonu gibi faktörlerin Wnt sinyal yolunun değişikliğe uğrattığı temel fonksiyonlar arasında yer alması, fonksiyonel olarak farklı Wnt proteinlerinin olduğunu destekler.

Wnt genleri arasında fonksiyonel farklılıklar olduğunu destekleyen 2 bağımsız değerlendirme vardır. Birinci değerlendirmede transformasyon aktiviteleri temeline dayanarak tanımlanabilen 3 kategori Wnt geni bulunmuştur.

Bunlar;

I- Wnt i, Wnt 3a ve Wnt 7a oldukça transform edici,

II- Wnt 2, Wnt Sb ve Wnt 7b transformasyon aktivitesi olarak orta dereceli,

III- Wnt 4, Wnt Sa ve Wnt 6 transformasyon yeteneği açısından yetersiz olarak değerlendirilmiş Wnt gen kategorileridir. İkinci değerlendirme; farklı Wnt'lerin overekspresyonları temeline dayanır ve Wnt genlerini hücre transformasyon değerlendirmesi için benzer gruplanmayı takip eden 2 kategoriye ayırır⁽¹⁴⁾.

Son zamanlarda, Wnt sinyal yolunun, çok sayıda hücresel fonksiyonu dört intraselüler yolla düzenlediği gösterilmiştir. Birincisi, çekirdekteki

hedef genleri aktive eden b-katenin yolu, ikincisi JNK ve hücre iskeletinin yeniden düzenlemelerle ilgili olan hücre polaritesini düzenleyici yol, üçüncüsü PLC ve PKC 'nin aktivasyonu ile ilgili olan Wnt/Ca²⁺ yolu, dördüncü yol ise hücrede iğ iplikçiklerinin uyumunu ve asimetric hücre bölünmesini düzenleyen yoldur⁽¹⁰⁾. Wnt sinyalinin, b-catenin yolu veya hücre polaritesini düzenleyici yolu uyarmasının mekanizması son zamanlarda yoğun araştırmalara konu olmuştur. b-katenin ve hücre polaritesini düzenleyici Wnt yolunun diğer bileşenlerinin vücut aksının oluşumunda gerekli olduğu yapılan deneysel araştırmalarla gösterilmiştir. b-katenin'in embriyonun dorso-anterior tarafında birikmesi aksın oluşumunun en erken belirtisidir. İlginçtir ki, Wnt sinyal kaskadının üyelerinin vücut ekseninin kurulmasındaki etkinliği son zamanlarda kabul edilen bir gerçektir. Bu da, Wnt sinyalinin bütün multiselüler canlılarda aksiyal farklılaşmanın gelişiminde hayati rol oynadığını gösterir⁽¹⁰⁾.

Omurgalılarda her bir vertebra antero-posterior aksda kendi pozisyonuna göre karakteristik bir yapıya sahiptir. Vertebra, primitif çizgi ve kuyruk tomurcuğundaki farklılaşmamış hücrelerden köken alır. Bu hücreler paraksiyal mezodermden segmental olarak tekrarlayan birimler olan somitleri şekillendirirken, somitin ventral bölümü olan sklerotom da aksiyal iskeleti şekillendirir^(11,13).

Gelişmekte olan omurgalılarda somitlerin anteroposterior şekillenmesinin oluşumu ile ilgili çok az sayıda gen gösterilmiştir ve bu nedenle gelişimini düzenleyen moleküler mekanizmaları iyi karakterize edilememiştir. Vertebra'nın doğru anteroposterior şekillenmesi için Wnt-3a'nın gerekli olduğu, ayrıca servikal vertebradaki yükselen hücrelerdeki cdx-1'in vertebra'nın anteroposterior şekillenmesini düzenlediğine dair deliller bulunmuştur⁽¹¹⁾.

Bazı bulgular somitik mezodermal hücrelerin anteroposterior belirlenmesinin, bu hücrelerin

somit şeklini almadan önce, muhtemelen gastrulasyon döneminde belirlendiğini savunur. Aşılama (grafting) deneylerinde vertebral hücrelerin somit oluşumundan önce anteroposterior aks boyunca bu özelliklerini kazandıkları gösterilmiştir⁽¹²⁾. Ayrıca, Cdx 1 ve Cdx2'yi içeren birkaç transkripsiyon faktörü, Gdf-1 I, FGF reseptör I (FGFR I)'i içeren hücre sinyal molekülleri ve aktivin reseptör IIB (ActRIIB)'nin primitif çizgi ektoderminde ve/veya kuyruk tomurcuğunda eksprese edildiği ve vertebra'nın doğru anteroposterior konumunun kurulmasında bu yapıların önemli rol oynadıkları bulunmuştur. Bununla birlikte, anteroposterior aks boyunca somitlerin farklılaşması üzerindeki genetik kontrolle ilgili bilgiler tam olarak yeterli değildir^(9,11).

Anteroposterior aks boyunca vertebra'nın doğru şekillenmesinde Wnt-3a sinyalinin etkili olup olmadığını anlamak için, Wnt-3a geni ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Wnt-3a mutant embriyolarda bütün vücut aksı boyunca vertebralarda defektler gözlemlenmiştir. Ayrıca, vertebra'nın doğru anteroposterior şekillenmesi için gerekli olan cdx-1'in Wnt-3a mutantlarında, kuyruk tomurcuğu ve primitif çizgi ektodermindeki etkinliği gösterilmiştir. Bu bilgi Wnt3a'nın, cdx-1'in aktivasyonu aracılığı ile vertebra'nın doğru anteroposterior belirlenmesi için önemli olduğuna işaret eder. Wnt-3a ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda vertebrada midtorasik bölgeden lumbal bölgeye kadar posterior homeotik değişim ve posterior sakral bölgede anterior homeotik değişim gözlemlenmiştir. Özellikle, torasik vertebralardan T9, T10, T13'ün, lumbal vertebralardan L1 ve L6'nın, sakral vertebralardan S1'in posterior değişimi, S4 ve S3'ün anterior değişimi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar açık bir şekilde, anteroposterior aks boyunca vertebra'nın doğru belirlenmesi için Wnt-3a sinyalinin gerekli olduğunu göstermektedir^(11,13).

Wnt-3a sinyalinin posterior somitlerin şekillenmesini nasıl düzenlediği incelenmiştir. Servikal seviyedeki anterior transformasyona ek olarak, Wnt-3a mutantları, midtorasik bölgeden, lumbal bölgeye posterior homeotik değişim ve posterior sakral bölgede diğer anterior değişimleri gösterir. Wnt-3a'nın posterior somitler şekillendiği zaman kuyruk tomurcuğu aşamasında da eksprese edilmesine rağmen cdx-1'in özellikle servikal seviyede somitlerin anteroposterior şekillenmesini düzenleme yeteneğinde olduğu gösterilmiştir. Alternatif olarak, bazı diğer genlerin posterior bölgedeki cdx-1'deki kaybı kompanse edebileceğini ileri sürülmektedir. Aksine, Wnt-3a mutantlarındaki defektler yalnızca servikal vertebrada değil aynı zamanda torasik, lumbal ve sakral vertebralarda da gözlenmiştir⁽¹¹⁾.

Günümüzde yapılan çalışmalarda henüz posterior şekillenmedeki mediatörler belirlenememiştir. Yapılan genetik analizlerde, cdx-2 ve cdx-4 geninin anteroposterior aks boyunca vertebra'nın doğru şekillenmesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir⁽⁶⁾. Primitif çizgi ektoderminde ve kuyruk tomurcuğunda eksprese edilen bu iki gen Wnt-3a ekspresyonu ile beraberdir⁽²⁾. Bu genlerin belirlenmesi ve karakterizasyonları Wnt-3a'nın bütün beden boyunca vertebra'nın anteroposterior şekillenmesini nasıl düzenlediğini ortaya çıkaracaktır⁽¹¹⁾.

Bugüne kadar anteroposterior aks boyunca doğru somit şekillenmesinin kurulmasında birkaç sinyal molekülünün ve transkripsiyon faktörünün önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca yukarıda bahsedilen cdx-1 ve cdx-2, gen aksama deneyleri Fgfr I, Gdfr II ve ActRIIB'nin bu işlem için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu deneyler somitlerin embriyonik anteroposterior şekillenmesinde FGFR'nin rolü olduğunu ileri sürer. Bununla birlikte cdx-1 mRNA ekspresyon seviyesinde, Fgfr i mutant embriyolarda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Dolayısıyla, FGF sinyali muhtemelen Wnt-3a sinyalinin yaptığından

farklı mekanizmalar aracılığı ile anteroposterior şekillenmeyi regüle etmektedir. Gen bozma çalışmaları ile ActRIIB'nin kaybı bulunmuştur ki bu somitlerde anterior homeotik değişim için, genlerin TGF-G ailesi üyelerinin reseptör komponentlerinden birini şifrelemektedir. Ayrıca, TGF-G ailesinin bir üyesi olan Gdf- II 'in yokluğunda anterior transformasyon da gözlenir. Bu aktivin reseptör IIB'nin somitlerin anteroposterior şekillenmesinde, Gdf-I i için bir reseptör olarak davranabileceğini gösterir. Cdx-1 ekspresyonun bu genlerin kaybından etkilenip etkilenmediği henüz belli değildir. Bununla birlikte, son zamanlarda TGF-G sinyalinin sitosolik aracısı ile Wnt sinyalinin aracısının kompleks olarak birleştiği ve hedef genleri sinerjistik olarak aktive ettiği gösterilmiştir. Bu etkileşim TGF-G ve Wnt sinyali arasında karşılıklı etkileşim olduğunu işaret eder^(11,15). Böylece, TGF-G ve Wnt sinyali ortak hedef genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek, somitlerin anteroposterior şekillenmesini işbirliği içinde düzenlediği olasılığı kuvvetlidir.

Omurga şekillenmesi sırasında Wnt, Hedgehog ve BMP gen ailelerinin üyelerini de içeren çok sayıda pozitif ve negatif sinyal mekanizmaları ve faktörler etkili olmaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmalar omurga gelişiminin ne kadar kompleks bir yapıya sahip olduğunu ve Wnt sinyal yollarının bu kompleks yapı içinde ne denli önemli roller üstlendiklerini ortaya koymaktadır. Somitik hücrelerin bu ekstrasellüler sinyallerle olan etkileşimleri ve sinyalleri alış mekanizmalarının moleküler olarak incelenmesi gelişim sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alberts B. Molecular biology of the cell. New York. NY, Garland Publishing, Inc, 1994.
2. Beck F, Erler T, Russel A, James R. Expression of cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extraembryonic membranes. Dev Dyn 1995; 204: 219-227.

3. Brown JD, Moon RT. Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 182-7.
4. Cadigan KM, Nusse RS. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11: 3286-3205.
5. Capdevila J, Tabin CJ, Johnson RL. Control of dorsoventral somite patterning by Wnt-1 and β -catenin. *Dev Biol* 1998; 193: 182-194.
6. Chawengsaksophak K, James R, Hammond VD, Kontgen F. Homeosis and intestinal tumours in *cdx-2* mutant mice. *Nature* 1997; 386: 84-87.
7. Dierick H, Bejsovec A. Cellular mechanisms of wingless/ wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol* 1999; 43: 153-90.
8. Giarre M, Semenov MV, Brown AM. Wnt signaling stabilizes the dual-function protein β catenin in diverse cell types. *Ann NY Acad Sci* 1998; 857: 43-55.
9. Greco TL, Takada S, Newhouse MM, McMahon AP, Camper SA. Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that *wnt-3a* gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev* 1996; 10(3): 313-324.
10. Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin* 2001; 11(5): 547-553.
11. Ikeya M, Takada S. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech Dev* 2001; 103: 27-33.
12. Kieney M, Mauger A, Segal P. Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of the axial skeleton of the chick embryo. *Dev Biol* 1972; 28: 142-161.
13. Liu P, Wakamiya M, Shea Mj, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Requirement for *wnt 3* in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 1999; 22: 361-365.
14. Maan RT, Brown JD, Torres M. Wnt's modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 1997; 13: 157-62.
15. Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho KW. Interaction between wnt and TGF- β signaling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 2000; 403: 781-785.
16. Shimizu H, Julius MA, Giarre M, Zheng Z, Brown AM. Transformation by wnt family proteins correlates with regulation of β catenin. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 1349-58.
17. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL. Activities of the wnt -1 class of secreted signaling factors are antagonized by the wnt-5a class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 1996; 133: 1123-37.
18. Tsukamoto AS, Grosschedle R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the *int-1* gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 1998; 55: 619-25.
19. Tufan AC, Tuan RS. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin related functions. *FASEB J* 2001; 15: 1436-8.
20. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP. Differential transformation of mammary epithelial cells by wnt genes. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6278-86.
21. Woodward WA, Tuan RS. N-cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine. *Dev Genet* 1999; 24: 178-87.

Arař.Gör. Dr. Ülker SÖNMEZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tel: 232 259 59 59 /4558

