

Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı

WNT SIGNALING PATHWAY IN EMBRYONIC STEM CELLS

Murat SEVİMLİ¹, Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Gelişim ve farklılaşmada, aynı genetik bilgiye sahip hücrelerden farklı hücrelerin oluşumunu sağlayan önemli mekanizmalardan biri hücreler arası sinyal iletimidir. Bu yollarının başında ise Wnt gelmektedir. Wnt yolağı embriyonik kök hücrelerdeki etkileri ile embriyonik gelişimde çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır. Wnt yolağının embriyonik kök hücreler üzerine olan etkileri, oldukça karmaşık bir mekanizmanın parçasıdır. Hücrelerin içinde bulunduğu mikroçevrenin sağladığı etkileşimler aynı sinyale farklı yanıtlar oluşturabilmektedir. Rejeneratif tıp alanında pluripotent kök hücreler büyük önem taşımaktadır. Bu hücrelerin en önemli kaynağı, embriyonik kök hücrelerdir. Ancak etik sorunlar bu hücrelerin kullanımını engellemektedir. Alternatif olarak görülebilecek indüklenmiş pluripotent kök hücreler ise; üretim tekniklerinde zorluklar ve gen müdahalesine bağlı sorunlar taşımaktadır. Bu bakımdan gen müdahalesine gerek duymayacak veya azaltacak arayışlar sürmektedir. Burada özellikle, çeşitli hücreSEL mekanizmaları etkileyen küçük moleküller dikkat çekmektedir. Bu moleküllerin hedefinde yer alan mekanizmalardan biri de Wnt sinyal yolağıdır. Ancak bu yolak ile geliştirilmiş, hücreSEL yeniden programlama açısından güvenli ve başarılı bir yöntem henüz bulunmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Wnt, Embriyonik kök hücreler, Rejeneratif tıp

ABSTRACT

One of the major mechanisms for the formation of different cells from the cells with the same genetic information during the development and differentiation, is intracellular signal transmission. One of the most important of these signaling pathways is Wnt. Wnt pathway plays roles in various processes in the embryonic development by the effects on embryonic stem cells. The effects of Wnt pathway on embryonic stem cells seem to be a part of very complex mechanism. The interactions provided by the microenvironment within the cells can generate different answers to the same signal. Pluripotent stem cells have a great importance in regenerative medicine. The most important source of these cells are embryonic stem cells. However, ethical problems hinder the use of these cells. The induced pluripotent stem cells which can be seen as an alternative; have difficulties in the production techniques and carries some problems related to the gene intervention. In this regard quests to reduce or eliminate the need for gene intervention are ongoing. Here in particular, a variety of small molecules that can affect cellular mechanism draws attention. One of the target mechanisms of these molecules is the Wnt signaling pathway. However, a safe and successful method for cellular reprogramming with this pathway has not yet been developed.

Keywords: Wnt, Embryonic stem cells, Regenerative medicine

Murat SEVİMLİ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD
ISPARTA

Gelişim ve farklılaşma bütün canlılarda büyük titizlikle sürdürülen süreçlerdir. İnsan gelişimini incelediğimizde zigot adı verilen tek bir hücre ile başlayan bu süreç farklı fonksiyon ve morfolojiye sahip çok sayıda hücrenin oluşumu ile devam etmektedir. Başlangıçta aynı genetik bilgiyi taşıyan hücrelerin, farklılaşmalarını sağlayan temel mekanizmaları hücre içi düzenleyici sistemler ve hücre dışı etkiler olarak sınıflandırmak mümkündür. Hücre dışı mekanizmalar arasında, hücreler arasındaki sinyal iletimi büyük önem taşımaktadır. Gelişim ve farklılaşma süreçleri üzerine etki eden birçok sinyal yolağı bulunmasına rağmen üzerinde en çok durulan sinyal yollarının başında Wnt gelmektedir.

Kök hücre ve hücrel tedaviler açısından, sahip olduğu özellikler nedeniyle en çok çalışılan hücrelerin başında pluripotent kök hücreler gelmektedir. Pluripotent kök hücrelerin başlıca kaynağı embriyonik kök hücrelerdir. Buna karşılık, bu hücreler etik sorunlar nedeniyle çalışılmamaktadır. Yakın zamanda, tamamen farklılaşmış somatik hücrelerin yeniden programlanması ile oluşturulan ve pluripotent karakterdeki indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) etik sorunların aşılabilmesi açısından önemli bir gelişme olarak ortaya çıkmıştır. Ancak araştırmacılar iPSC ler ile yapılan çalışmalarda da bazı sorunlarla karşılaşmış ve henüz hücrel tedaviler alanında kullanılabilecek etkin ve güvenli bir yöntem geliştirilememiştir. Özellikle genomik integrasyon ve onkojenik dönüşüm riski taşımayan, ayrıca başarı oranları yüksek iPSC üretme teknikleri üzerinde çalışmalar sürmektedir. Bu çalışmalar hücrelerin gelişim ve farklılaşma süreçlerinde etkin rol oynayan sinyal yollarını ve bunlara etki eden çeşitli moleküller üzerine yoğunlaşmaktadır.

Bu açıdan embriyonik kök hücrelerde, Wnt sinyal yolağının etkileri üzerine yapılan çeşitli çalışmaların sonuçları özetlenmeye çalışılmıştır. Böylece pluripotensinin sağlanmasında Wnt yolağının işlevi ve bu yolağın hücrelerin yeniden programlanmasındaki mevcut veya olası etkilerinin gözden geçirilmesi hedeflenmiştir.

WNT SİNYAL YOLAĞI

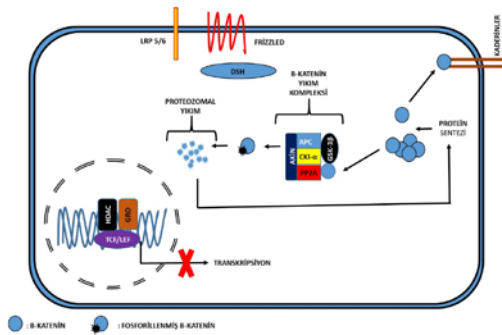
Wnt ismi bir fare protoonkogeni olan int1 ve onun drosophiladaki homoloğu olan, larva gelişimde rol alan wingless (wg) geninin isimlerinin birleşmesinden oluşmaktadır (1). Wnt yolağı bir sinyal mekanizmasının parçası olarak gen transkripsiyonu üzerine etkili olmasının yanı sıra, hücre adezyonu ile bağlantılı süreçlerde de rol almaktadır (2). Genel olarak; hücre büyümesi, hareketi ve farklılaşması olaylarında oldukça önemli roller üstlenmektedir. Hem embriyonik gelişim sürecinde hem de yetişkin dönemdeki doku homeostazisinin sağlanması olaylarında etkindir (3, 4). Wnt sinyal yolağı ile ilişkili başlıca üç farklı mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; kanonikal yol olarak da bilinen Wnt β -katenin yolağı, Wnt/Ca yolağı ve Wnt düzlemsel hücre kutuplaşması yolağıdır. Bunlar arasında üzerinde en fazla çalışılan ve mekanizması büyük oranda aydınlatılan yolak Wnt β -katenin yolağıdır (5).

WNT B-KATENİN SİNYAL YOLAĞI ÇALIŞMA MEKANİZMASI

Wnt β -katenin sinyal yolağında görevli moleküller, bu yolağının ilk keşfinden günümüze kadar geçen sürede büyük ölçüde tanımlanmıştır. Wnt yolağında ligand olarak görev alan molekül; Wnt proteindir. Hedef hücrelerde ligandın bağlanacağı reseptörler; frizzled (Fz) reseptörü ve Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP 5/6) yardımcı reseptörleridir. Sinyal mekanizmasının hücre içi olaylarından sorumlu moleküller ise; β -katenin, Disheveled (Dsh), Kazein kinaz-1(CK-1), Axin, Protein Fosfataz 2A (PP2A), Glikojen Sentaz Kinaz 3- β (GSK3- β) enzimi, Adenomatöz Polipozis Koli (APC) proteindir. İlgili hücrel cevabın oluşumunu sağlayan transkripsiyon faktörleri ise T-cell factor (TCF) ve Lymphoid enhancer-binding factor (LEF) dür (6,7). Bu transkripsiyon faktörleri ise birçok önemli genin ifadesi üzerine etki etmektedir. Bunlar arasında kanserle ilişkisi bilinen c-Myc ve Cyclin d1 gibi genlerin yanı sıra, Octamer-binding transcription factor-4 (Oct-4), Nanog ve Snail gibi embriyonik kök hücrelerde eksprese edilen genler vardır (1). Ancak diğer birçok gelişimsel sinyal yolağında olduğu gibi burada da sinyal aktivasyonu ile hedef

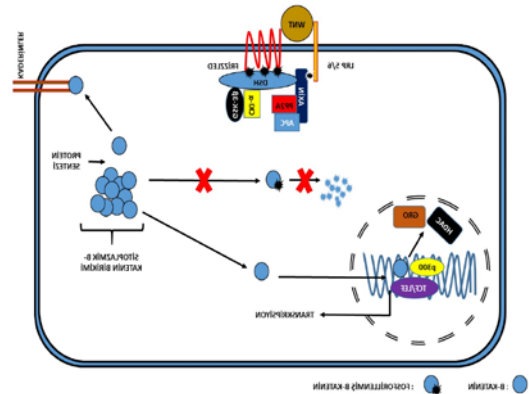
genlerden hangilerinin ifade edileceği hücre tipi tarafından belirlenmektedir. Böylelikle tek bir sinyalin oluşturacağı hüresel cevapların çeşitliliği artırılmaktadır (8).

Wnt β -katenin sinyal yolağının çalışma mekanizmasındaki temel unsur sitoplazmik β -katenin düzeylerinin kontrolüdür. Sinyal iletimi aktif değilken, yani Wnt ligandı ilgili hücre yüzey reseptörlerine bağlanmadığı durumda hedef genlerin ifadesinde bir baskılanma söz konusudur. Bu durum hücre içerisinde β -katenin düzeylerinin düşük tutulması ile sağlanır. Hücre içerisinde β -katenin düzeyleri çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Normalde hücre içinde protein sentezi ile belirli bir oranda β -katenin sentezlenir. Bunlardan bir kısmı kadherinlere bağlarak hücre adezyonunda fonksiyon görürken, geriye kalanlar yıkılarak sitoplazmik β -katenin düzeylerinin düşük seviyede tutulması sağlanır. Bu olay β -katenin yıkım kompleksi tarafından düzenlenir. β -katenin yıkım kompleksi yapısal bir protein olan Axin, aynı zamanda bir tümör baskılayıcı protein olan APC, PP2A, CK-1 α , GSK3- β gibi proteinlerden oluşmaktadır (9). β -kateninin CK-1 α ve GSK3- β tarafından farklı bölgelerinden fosforillenmesi, bu proteinin proteozomlar tarafından yıkıma uğramasına neden olur. Bu durumda çekirdekte Wnt hedef genleri ile ilişkili transkripsiyon faktörleri, LEF-1 ve TCF nin aktivitesi, baskılayıcı bir protein olan Gruc ve Histon deasetilaz (HDAC) tarafından engellenmektedir. Aslında burada HDAC histonları deasetilleyerek kromatin yeniden yapılanmasını engellemekte ve böylece hedef genlerin baskılanması sürecine katkı sağlamaktadır (10) (Şekil 1).



Şekil 1 Wnt ligandı reseptörüne bağlı olmadığı durumda, hüresel durum

Sinyal iletimi aktifken; yani Wnt ligandı reseptörlerine bağlandığı zaman; sitoplazmik β -katenin düzeyleri artar ve bunun sonucunda hedef genler üzerindeki baskı ortadan kalkar ve ilgili hüresel cevaplar oluşur. Wnt ligandının bağlandığı asıl reseptör yedi geçişli bir transmembran proteini olan Fz reseptörüdür. Ancak sinyal iletiminin gerçekleşebilmesi için Wnt nin aynı zamanda LRP5/6 yardımcı reseptörlerine de bağlanması gerekmektedir. Ligand reseptör etkileşiminin gerçekleşmesi ile birlikte LRP5/6 reseptörleri membrana bağlı CK-1 α tarafından birkaç bölgesinden fosforillenir. Bu fosforile alanlar β -katenin yıkım kompleksi üyelerinden Axin için bağlanma bölgesi oluşturur. Aynı anda bilinmeyen bir mekanizma ile Fz reseptörüne bağlı Dsh proteini de hiper-fosforile hale gelir ve sonuç olarak β -katenin yıkım kompleksinin moleküler düzenleniminde bir değişim gerçekleşir. Bunun sonucunda kompleks üyelerinin aktivitesi de değişir ve yıkım kompleksi inaktif hale gelir. Bu duruma bağlı olarak β -katenin yıkımı inhibe olur ve sitoplazmada β -katenin birikimi başlar. Sitoplazmada β -katenin düzeyleri arttıkça, bu moleküller nükleusa geçmeye başlar. Burada TCF ve LEF e bağlanır. Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini baskılayan Gruc u ve HDAC ı ortamdaki uzaklaştırarak ve yerine p300 ü bağlar. Hem baskılayıcı faktörlerin ortamdaki uzaklaşması hem de histonları asetilleyerek kromatin yeniden şekillenmesini kolaylaştıran p300 ün etkisi ile Wnt hedef genlerinin transkripsiyonu başlar ve ilgili hüresel cevaplar oluşur (5,11) (Şekil 2).



Şekil 2 Wnt ligandı reseptörüne bağlandığı zaman gerçekleşen hücre içi olaylar

WNT SİNYAL YOLAĞI AKTİVATÖRLERİ ve İNHİBİTÖRLERİ

Wnt sinyal yolağı, Wnt proteinleri haricinde iki büyüme faktörü ailesi tarafından da aktive edilmektedir. Bunlar R-spondinler ve Norrin ailesidir. Birbirleri ile ilişkisi olmayan bu iki aile üyelerinden bazıları sadece Wnt β -katenin yolağı üzerine etkili iken, bazıları ise diğer Wnt yolakları üzerine de etki etmektedir. Özellikle R-spondinler Wnt ile birlikte çalışmakta ve Wnt yolağı aktivasyonu için Wnt ligandı varlığına ihtiyaç duymaktadır. Norrinler ise Fz reseptörleri üzerinden etki göstermektedir. Bu aktivatörler özellikle embriyonik gelişim sürecindeki çeşitli basamaklarda rol oynamaktadır (12).

Wnt sinyal yolağı inhibitörleri ise başlıca iki grupta incelenebilir. Birinci grupta doğrudan Wnt proteinine bağlanarak ligandın reseptörle etkileşime geçmesine engel olan, Wnt İnhibitör Faktör - I (WIF-I) ve Secreted Frizzled Related Protein (sFRP) yer almaktadır. İkinci Grupta yer alan Dickkopf (Dkk) ve Sclerostin (SOST) ise LRP5/6 reseptörlerinin aktivitelerini inhibe etmektedir (11,13,14). Wnt sinyal yolağındaki bu inhibitör mekanizmalar özellikle embriyonik gelişim evrelerinde ve doku onarımı süreçlerinde kök hücrelerin uygun zamanda aktivasyonlarının düzenlenmesi için gereklidir (15). Ayrıca bu inhibitör mekanizmalarda meydana gelebilecek bozuklukların bazı kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Örneğin sFRP1 proteini down regülasyonu insanlarda hepatoselüler karsinoma, kolorektal kanser ve böbrek hücreli karsinoma gibi patolojilerde tespit edilmiştir (16). Bu şekilde sinyal yolağını inhibe eden mekanizmaların olması Wnt aşırı aktivasyonu ile seyreden bazı kanser türlerinde anti kanser terapi açısından yeni bir yaklaşım ortaya çıkmasını da sağlamıştır (17-19). Örneğin meme kanseri kök hücrelerini inhibe eden salinomisin etkisini Wnt yolağındaki LRP6 reseptörü inhibisyonu ile göstermektedir (20).

EMBRYONİK KÖK HÜCRELERDE WNT SİNYAL YOLAĞI

Gelişimin birinci haftasında ilk önemli hücresel kararlanma morula ve blastosist evreleri arasında

verilmektedir. Bunun sonucunda hücreler iki gruba ayrılmaktadır; blastosistin daha iç tarafında yer alan ve ileride her üç germ yaprağına farklılaşacak olan pluripotent karakterdeki iç hücre kitlesi ve embriyonik gelişimi destekleyecek olan dış hücre tabakası yani trofoblastalar. İç hücre kitlesinden elde edilen ve kültür ortamında yaşatılan hücreler embriyonik kök hücreler olarak isimlendirilmektedir ve bugün embriyonik gelişimin erken evrelerinde meydana gelen moleküler mekanizmaların işleyişi hakkındaki bilgilerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır (21,22). Bu moleküller mekanizmalardan en çok merak edileni ise pluripotent bir hücrenin kendini yenileme veya farklılaşma yollarından hangisine yöneleceğinin yani hücresel kaderin nasıl belirlediğidir. Wnt yolağı bu aşamada yer alan önemli bir sinyal yolağı olarak karşımıza çıkmaktadır (23).

Embriyonik kök hücreler in-vitro ortamda kendini yenileme özelliklerini koruyabilmektedirler. Oysaki embriyonik gelişim sırasında iç hücre kitlesindeki bu pluripotent hücreler organizmayı oluşturmak üzere çeşitli yönlere farklılaşacaktır. Kültür ortamındaki bu özelliğın ise bazı sinyal yolakları aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bu sinyal yolaklarından en önemlisi Leukemia inhibitory factor/Signal transducer and activator of transcription (LIF/Stat3) olmasına rağmen, insan embriyonik kök hücrelerinde bu yolak fonksiyonel değildir. İnsan embriyonik kök hücrelerinde ise Wnt, pluripotentliği sürdürmede önemli bir sinyal yolağı olarak görülmektedir (21, 24). Ancak kültür ortamına eklenen Wnt3a'nın embriyonik kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalmalarını sağladığı buna karşı Wnt11 in ise bunu sağlayamadığı görülmüştür. Bu sonuçlar farklı Wnt ligandlarının aynı hücrede farklı sonuçlara neden olabileceğini göstermesi açısından önemlidir (25). Benzer şekilde Wnt3a'nın embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme özelliği için gerekli olduğu, bu hücreleri epiblastlara farklılaşmaktan koruduğu, bu etkiyi de çeşitli pluripotentlikle ilişkili genleri düzenleyen TCF3 transkripsiyon faktörü aracılığı ile sağladığı gösterilmiştir (26).

Wnt sinyal yolağının insan embriyonik kök hücrelerinde belirli bir noktaya kadar kök hücre özelliklerinin korunmasına yardımcı olduğu, ancak kritik

bir düzey aşıldıktan sonra ise hücrelerde farklılaşma yönünde bir programlamaya aracılık ettiği bilinmektedir (27). Bununla birlikte Wnt sinyal yolağının insan embriyonik kök hücrelerini farklılaşmamış durumda tutmaya yeterli olmadığına dair veriler de bulunmaktadır. Buna göre Wnt yolağı insan embriyonik kök hücrelerinin çoğalmasını sağlamakta ancak farklılaşmayı engellemek üzere pluripotentliği ilk birkaç pasajdan sonra koruyamamaktadır (28).

Diğer taraftan insan embriyonik kök hücrelerinde Wnt sinyal yolağı aktivitesi hücre adezyonu ilişkili süreçler ile de düzenlenmektedir. Wnt yolağının anahtar moleküllerinden biri olan β -katenin bilindiği üzere kadherin aracılı hücre-hücre bağlantılarda da rol oynamaktadır (29). Wnt yolağının kısa süreli aktivasyonu insan embriyonik kök hücrelerinde E-kadherin ekspresyonu artırmakta ve Phosphatidylinositol 3-kinase/Serin threonine-protein kinase (PI3K/Akt) yolağı üzerinden kendini yenileme özelliğine aracılık etmektedir. Ayrıca artmış E-kadherin ekspresyonları hücre içi β -katenini bağlayarak ve birikimini engelleyerek bu sürece katkı sağlamaktadır. Uzun süreli Wnt uyarısı ise E-kadherin tarafından tutulan β -katenin düzeylerinin azalması ile nükleusa geçen β -katenin miktarının artışına neden olmakta ve ilgili cevapların oluşmasına yol açmaktadır. Bu durumda ise bazı genlerin değişen düzenlenimi ile aynı anda E-kadherin ekspresyonu inhibe olmakta, bunun sonucu olarak da hücre içerisinde daha fazla β -katenin birikimi görülmektedir. Sonuç olarak da insan embriyonik kök hücreleri farklılaşma yolunu seçmektedir (30,31).

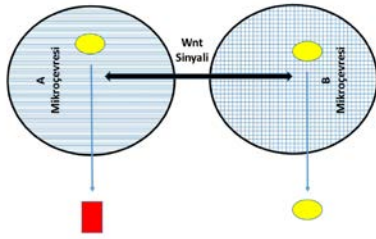
Embriyonik kök hücre fizyolojisi açısından Wnt β -katenin yolağı ve Nanog arasındaki etkileşim de oldukça önemlidir. Nanog, Wnt yolağındaki Dkk 1 inhibe ederek hücre içerisinde β -katenin birikimine yol açmaktadır. Bu süreç ayrıca Nanog aracılı hücre yeniden programlama sürecinde de büyük önem taşımaktadır (32).

Genel olarak Wnt sinyal yolağının embriyonik kök hücreler üzerine olan etkileri konusunda birbirine zıt bulguların olduğunu görmekteyiz. Bazı çalışmalar Wnt sinyal yolağının embriyonik kök hücrelerde pluripotensi ve kendini yenileme özellikleri için gerekli olduğunu

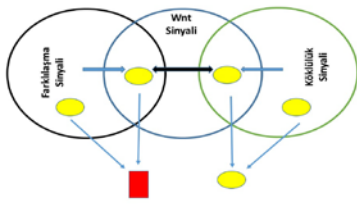
göstermektedir. Ancak diğer bazı çalışmalar ise aksine Wnt sinyal yolağının bu hücrelerde farklılaşmayı uyardığı ve farklılaşmanın engellenmesi için Wnt inhibisyonunun gerektiğini savunmaktadır (23,33). Aslında bu durum sinyal yolağının moleküler mekanizmasının karmaşıklığı ve diğer mekanizmalarla olan etkileşimleri nedeniyle gözlenen doğal bir sonuçtur. Çünkü embriyonik gelişim esnasında farklı basamaklarda farklı Wnt ligandları, reseptörleri, aktivatörleri veya antagonistleri eksprese edilmektedir ve bunlara bağlı olarak farklı etkiler gözlenmektedir. Bunun haricinde Wnt sinyalinin hücre tarafından değerlendirilmesi kök hücrenin içinde bulunduğu mikroçevreye ve mikroçevrenin sağladığı diğer sinyallerin etkisine bağlı olarak da değişebilmektedir (Şekil 3) (28). Wnt sinyal yolağının, mevcut şartlardan etkilendiğini gösteren farklı örneklerle rastlamak mümkündür. Bunlardan biri yüksek düzeydeki β -katenin varlığında, Activin düzeyinin hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar rol üstlenmesidir (34). Mikroçevre etkisi ile ilgili olarak diğer bir örnek, pluripotent özellikte olan ancak epiblastlardan elde edilen Epiblast kök hücrelerinin (epiSC), Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) aracılı farklılaşma süreçlerinde endojen Wnt proteinlerinin de bu süreci indükleyici etki göstermesidir. Ayrıca Wnt nin, embriyonik kök hücrelerin köklülüğünde özellikle farklılaşmanın erken dönemlerinde de gerekli olduğu vurgulanmakta olup, bu sonuç sinyal zamanlamasının da önemine dikkat çekmektedir (35).

Bu gibi farklı bulgulardan çıkarılabilecek ortak sonuç ise embriyonik kök hücrelerin Wnt sinyal uyarısına duyarlı olduğudur. Wnt sinyal yolağının embriyonik kök hücreler üzerine olan farklı etkilerini açıklayabilmek amacıyla aktivasyon modeli kavramı ortaya konulmuştur. Buna göre Wnt sinyalinin geldiği anda eğer embriyonik kök hücre çevresinden farklılaşma yönünde başka sinyaller almıyorsa, Wnt yolağı da hücre kaderininin kök hücre olarak devamını sağlamaktadır. Ancak Wnt sinyali embriyonik kök hücreye ulaştığında eğer hücre çevreden farklılaşma yönünde bir sinyal alıyorsa yine buna paralel olarak Wnt de hücreleri farklılaşma yönünde uymaktadır (Şekil 4). Ancak bu karmaşık sistemin diğer hangi mekanizmalarla ve ne şekilde düzenlendiği tam

olarak bilinmemektedir (28). Bu kadar karmaşık bir mekanizma ve düzenleme büyük ölçüde insan embriyonik kök hücrelerinde geçerlidir. Çünkü fare embriyonik kök hücrelerinde Wnt aktivasyonunun bu hücreleri farklılaşmamış durumda tuttuğu, kendini yenileme ve pluripotentiği sağladığı bilinmektedir (36). Bir grup araştırmacı bunun Stat 3 aracılı bir mekanizma ile LIF üzerinden sağlandığını savunmaktadır. Bunun aksine bir başka grup ise Wnt ve LIF arasında herhangi bir kesişme olmadığını farklı agaonist sinyallerin etkili olduğunu, bir başka grup ise Wnt sinyal yolağının Oct3-4 gibi bazı faktörler üzerinden fare embriyonik kök hücrelerinin köklülüğüne aracılık ettiğini savunmaktadır (37-39).



Şekil 3 Mikroçevredeki farklılıklar aynı tip kök hücrelerde Wnt sinyaline karşı verilen cevabı etkilemektedir. Şekilde A mikroçevresinde farklılaşma B mikroçevresinde ise kendini yenileme cevabı oluşmaktadır



Şekil 4 Aynı tip kök hücrelerin Wnt sinyaline verdikleri cevap ortamdaki diğer sinyallerin etkisine bağlı olarak da değişebilir. Örneğin kök hücre o anda farklılaşma yönünde sinyal alıyorsa Wnt de farklılaşma yönünde cevap oluşturur. Ancak ortamda köklülük sinyali varsa Wnt köklülük yönünde cevabı destekler.

HÜCRE YENİDEN PROGRAMLANMASINDA WNT SİNYAL YOLAĞI

Pluripotent kök hücreler sahip oldukları özellikler nedeniyle günümüzde rejeneratif tıp alanında üzerinde en çok durulan hücrelerdir. Ancak pluripotent kök hücrelerin en önemli kaynağı olan embriyonik kök hücreler çeşitli etik sorunlar nedeniyle çalışılmamaktadır. Bu durum araştırmacıları farklı yollar aracılığı ile pluripotent hücre elde etme çalışmalarına yönlendirmiştir. Bu çalışmalar, tamamen farklılaşmış somatik hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent karakterdeki iPSC'lerin üretilmesi ile sonuçlanmıştır. Ancak daha verimli ve güvenli yöntemler ile iPSC üretimine yönelik araştırmalar hızla devam etmektedir (40). Bu alandaki en önemli araştırma konularından birini pluripotent hücrelerdeki köklülüğe etki eden moleküler mekanizmalar oluşturmaktadır. Özellikle küçük moleküllerin etki edebileceği farklı sinyal yolları, genomik integrasyon riski olmadan veya azaltarak iPSC üretme çalışmalarında önemli birer hedef konumundadır (41). Gelişim ve farklılaşma süreçleri üzerinde özellikle etkileri bilinen ve büyük ölçüde kanıtlanmış olan sinyal yolları arasında Wnt, Notch, Hedgehog, Ras-Raf sinyal yolları gelmektedir. Bunlar arasında üzerinde en çok durulan ve çalışılan sinyal yolağı ise Wnt sinyal yolağıdır (42).

iPSC ler üzerine yapılan ilk çalışmalarda β -kateninin yeniden programlanmayı desteklediği yönünde veriler elde edilmiş olmasına rağmen, bu molekül Yamanaka faktörleri (Oct4, Klf2, Sox2, c-Myc) arasında kendine yer bulamamıştır. iPSC elde edilmesi ile ilgili bazı çalışmalar Wnt yolağının uyarıcı etkisi olduğunu bazıları ise süreci inhibe ettiğini savunmaktadır. Bunların yanı sıra, bu yolağa etki ederek Wnt β -katenin aktivasyonu yapan küçük moleküller ile yeniden programlama etkinliğinin arttığı da gösterilmektedir. Ayrıca tek bir programlama faktörü olarak Oct4 ile birlikte bu küçük molekülün kullanımının yeniden programlama sürecinde başarılı olduğu bilinmektedir. Wnt aktivasyonu farklılaşmış bir hücrenin yeniden programlanması için gereklidir ve ancak devamlı bir Wnt sinyali ile iPSC kolonisi oluşturulabilmektedir. Wnt sinyal aktivasyonu özellikle yeniden programlama sürecinde erken evrelerde daha fazla önem taşımaktadır (43). Fakat yeniden

programlama sürecinde erken evrelerde Wnt yolağının inhibisyonu, geç evrelerde ise aktivasyonu gerekmektedir. Bu etkiler TCF nin düzenlenmesi ile gerçekleşmekte olup, ekzojen Sox2 yokluğunda bile yeniden programlama sürecinin başarılmasını sağlamaktadır. Yeniden programlama sürecinin erken evrelerinde, Wnt sinyal yolağı aktivasyonu, TCF1 ve LEF1 üzerinden bu sürece müdahale eden genleri aktive etmekte ve sonuç olarak süreci bloke etmektedir (44, 45). Wnt sinyalinin etki zamanı kadar, başarılı bir yeniden programlama süreci için miktarı da önem taşımaktadır. Çok fazla ya da çok az sinyal düzeyleri bu süreci olumsuz etkilemektedir (45).

Yamanaka faktörleri ile birlikte E-kadherin aşırı ekspresyonu farelerde embriyonik fibroblastlardan iPSC oluşturma başarısını artırmaktadır. Burada E-kadherinlerin etkilediği sistemlerden biri de Wnt yolağıdır. E-kadherinler hücre içerisinde Wnt yolağının temel molekülü olan β -katenin için bir tuzak görevi görmekte onları bağlamaktadır. Genel olarak β -kateninin çekirdekte lokalize olmasını engelleyen faktörler yeniden programlama başarısını artırmaktadır (31,46).

SONUÇ

Wnt sinyal yolağı kök hücrelerde pluripotensi ile ilgili mekanizmaların bir parçasıdır. Ancak etkileri hücrenin içinde bulunduğu gelişim evresi, hücrede o anda devam etmekte olan metabolik ve genetik düzenlenimler, diğer sinyal mekanizmaları ile olan etkileşim ve mikro çevrenin sağladığı koşullar aracılığı ile düzenlenmektedir (47). Mevcut veriler insan embriyonik kök hücreleri üzerine Wnt sinyal yolağının etkilerini kısmen açıklayabilmektedir. Çünkü organizmada hücreler birçok mekanizma ile iletişim halinde olup, oluşan yanıtlar mevcut duruma göre dinamik olarak düzenlenmektedir. Fakat bu farklı iletişim yollarının neler olduğu tam olarak bilinmediğinden ve bilinenlerin de hepsinin in-vitro ortamda sağlanması mümkün olmadığından mevcut veriler bazı alanlarda yetersiz kalmaktadır. Örneğin gelişmekte olan bir embriyoda iç hücre kitlesinde yer alan hücreler bir birleri ile ve çevre ile çoğunu bilmediğimiz birçok hücreler arası iletişim mekanizması ile haberleşmektedir ve bu mekanizmalarında kendi aralarında etkileşimleri bulunmaktadır. Oysaki bu

hücrelerin kültüre edilmesiyle oluşturulan ortam her ne kadar gerçeği taklit etmeye çalışsa da bu mekanizmaların birçoğundan yoksun yapay koşullardır. Genel olarak çalışmalar Wnt sinyal yolağının insan embriyonik kök hücrelerinde oldukça karmaşık bir mekanizmanın parçası olduğunu göstermektedir. Ancak bu karmaşık mekanizma içerisindeki etkileşimlerin ne olduğu ve nasıl bir düzenlenim içinde oldukları henüz ayrıntılı olarak ortaya konulamamıştır.

Günümüzde, rejeneratif tıp açısından büyük öneme sahip iPSC'ler üzerine olan çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle gen aktarımını azaltarak veya devre dışı bırakarak somatik hücrelerin yeniden programlanması bu çalışmaların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu çalışmaların başarısı ise pluripotensiyi sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına bağlıdır. Farklı hücresel yollar üzerine etki eden küçük moleküller daha güvenli iPSC oluşturma çalışmalarında popüler bir başlıktır. Bu alanda birçok molekül genetik müdahaleyi gerektirmeyen bir yöntemin geliştirilebilmesi için araştırılmaktadır. Bu moleküllerin bazıları hücrelerde epigenetik düzenlemeler ile etki göstermekte iken, bazıları ise gelişim ve farklılaşmada rol oynayan önemli sinyal mekanizmalarını etkileyerek etkili olmaktadır. Wnt yolağı, gelişim ve farklılaşma süreçlerindeki rolü ve diğer birçok mekanizma ile olan bağlantısı nedeniyle geliştirilecek moleküller için iyi bir hedef olarak araştırmalar arasında yer almaktadır. Üstelik bu sinyal yolağına etki eden farklı inhibitör veya aktivatör mekanizma ve moleküllerin olması da bir avantaj sağlamaktadır. Ancak yine de güvenilir bir yeniden programlama sürecinin başarılabilmesi için hücre moleküler biyolojisi alanında daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127(3):469-480.
2. Paratore C, Sommer L. Stem Cells. In: Unsicker K., Kriegstein K (Eds). *Cell Signaling and Growth Factors in Development: From Molecules to Organogenesis*. Weinheim; Wiley-VCH;2006. p.1-37.

3. Lustig B and Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2003;129(4):199-221.
4. Jager M et al., Evidence for involvement of Wnt signalling in body polarities, cell proliferation, and the neuro-sensory system in an adult ctenophore. *PloS One* 2013;8(12).
5. Lien, WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes & Development* 2014;28(14):1517-1532.
6. Dönmez HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *Deu Med J.* 2011;25(3): 189-199
7. Can A. Moleküler Hücre Biyolojisine Kısa Bakış. Can A, Editor. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları.* Ankara: Akademisyen Tıp Kitapevi; 2014.
8. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research* 2005;15(1):28-32.
9. Nusse R. Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012;4(5).
10. Gordon M, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(32):22429-22433.
11. Berridge MJ. *Cell Signaling Biology*, 2012 <http://www.auburn.edu/academic/classes/biol/6190/CellSignalingBiology/csb001.pdf>
12. Cruciat, CM and Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013;5(3):1-26.
13. Sharma G, Sharma AR, Seo EM, Nam JS. Genetic Polymorphism in Extracellular Regulators of Wnt Signaling Pathway. *BioMed Research International* 2015;2015:847529.
14. Pohl S, Scott R, Arfuso F, Perumal V, Dharmarajan A. Secreted frizzled-related protein 4 and its implications in cancer and apoptosis. *Tumor Biology* 2014;1-10.
15. Matsuda K and Kondoh H. Dkk1-dependent inhibition of Wnt signaling activates Hesx1 expression through its 5' enhancer and directs forebrain precursor development. *Genes to Cells* 2014;19(5):374-85.
16. Mii Y, Taira M. Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, Growth & Differentiation* 2011;53(8):911-923.
17. Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nature reviews. Drug Discovery* 2006;5(12):997-1014.
18. Zhang X, Lou Y, Zheng X et al. Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells. *Drug Design, Development and Therapy* 2015;9:2399.
19. Madan B, Virshup DM. Targeting Wnts at the Source—New Mechanisms, New Biomarkers, New Drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* 2015;14(5):1087-1094.
20. Lu D, Carson D. Inhibition of Wnt signaling and cancer stem cells. *Oncotarget* 2011;2(8):587.
21. 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. *Nature Medicine* 2004;10(1):55-63.
22. Tan F, Qian C, Tang K, Abd-Allah SM, Jing N. Inhibition of TGF- β Signaling can Substitute for Oct4 in Reprogramming and Maintain Pluripotency. *J Biol Chem* 2015;290(7):4500-11.
23. Sokol S. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development (Cambridge, England)*, 2011;138(20):4341-4350.
24. Fernandez A, Huggins IJ, Perna L et al., The WNT receptor FZD7 is required for maintenance of the pluripotent state in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(4):1409-1414.
25. Singla DK, Schneider DJ, LeWinter MM, Sobel BE. wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem

- cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;345(2):789-795.
26. ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T et al., Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nature Cell Biology* 2011;13(9):1070-1075.
 27. Walsh J, Andrews P. Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonal carcinoma cell line and embryonic stem cell. *APMIS* 2003;111(1):197.
 28. Dravid G, Ye Z, Hammond H et al., Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23(10):1489-1501.
 29. McCrea PD, Maher MT, Gottardi CJ. Chapter Five-Nuclear Signaling from Cadherin Adhesion Complexes. *Current Topics in Developmental Biology* 2015;112:129-196.
 30. Huang TS, Li L, Moalim-Nour L, et al. A Regulatory Network Involving β -Catenin, E-Cadherin, PI3K/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Response to Wnt Signaling. *Stem Cells* 2015;33(5):1419-33.
 31. Sinev GS, Pospelov VA. β -Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2014;312:53-78.
 32. Marucci L, Pedone E, Di Vicino U, et al. β -catenin pluripotent fluctuates in mouse ESCs and is essential for Nanog-mediated reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Reports* 2014;8(6):1686-1696.
 33. Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, et al. Wnt/-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(12):4485-90.
 34. Turner DA, Trott J, Hayward P, Rué P, Martinez Arias A. An interplay between extracellular signalling and the dynamics of the exit from pluripotency drives cell fate decisions in mouse ES cells. *Biology Open* 2014;3(7):614-626.
 35. Schlupf J, Steinbeisser H. IGF antagonizes the Wnt/ β -Catenin pathway and promotes differentiation of extra-embryonic endoderm. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 2014;87(5):209-219.
 36. Raggioli A, Junghans D, Rudloff S, Kemler R. Beta-catenin is vital for the integrity of mouse embryonic stem cells. *PloS One* 2014. 9(1):e86691.
 37. Hao J, Li TG, Qi X, Zhao DF, Zhao GQ. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 2006;290(1):81-91.
 38. Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;343(1):159-166.
 39. Anton R, Kestler H, Köhl M. Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Letters* 2007;581(27):5247-5254.
 40. Tavernier G, Mlody B, Demeester J, Adjaye J, De Smedt SC. Current methods for inducing pluripotency in somatic cells. *Advanced Materials* 2013;25(20):2765-2771.
 41. Jung DW, Kim WH, Williams DR. Reprogram or reboot: small molecule approaches for the production of induced stem cells and direct cell reprogramming. *ACS Chemical Biology* 2014;9(1):80-95.
 42. Cooper, GM, Hausman RE. *Hücre: moleküler yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi;2006.
 43. Ross J, Busch J, Mintz E, et al. A rare human syndrome provides genetic evidence that WNT signaling is required for reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Cell Reports* 2014;9(5):1770-1780.
 44. Ho R, Papp B, Hoffman JA, Merrill BJ, Plath K. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Reports* 2013;3(6):2113-2126.

45. Aulicino F, Theka I, Ombrato L, Lluís F, Cosma MP. Temporal perturbation of the Wnt signaling pathway in the control of cell reprogramming is modulated by TCF1. *Stem Cell Reports* 2014;2(5):707-20.
46. Murayama H, Masaki H, Sato H, Hayama T, Yamaguchi T, Nakauchi H. Successful Reprogramming of Epiblast Stem Cells by Blocking Nuclear Localization of β -Catenin. *Stem Cell Reports* 2015;4(1):103-113.
47. Serio RN. Wnt of the two horizons: putting stem cell self-renewal and cell fate determination into context. *Stem Cells and Development* 2014;23(17):1975-1990.