

Kanoniczna ścieżka sygnałowa Wnt – funkcjonalna struktura oraz znaczenie w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi

STRESZCZENIE

Kanoniczna ścieżka sygnałowa Wnt fizjologicznie związana jest z regulacją procesów embriogenezy, różnicowania komórek i ich proliferacji. W transdukcji sygnału uczestniczy wiele białek, z których najważniejszym mediatorem jest β -katenina. W stanie braku pobudzenia ścieżki β -katenina podlega procesowi degradacji proteasomalnej, podczas gdy aktywacja szlaku wiąże się ze wzrostem jej cytoplazmatycznego stężenia i nasileniem translokacji do jądra komórkowego. W wyniku oddziaływania β -kateniny z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF dochodzi do zwiększenia ekspresji ponad stu genów docelowych ścieżki Wnt. Nasilenie aktywności kanonicznej ścieżki Wnt obserwuje się w przypadku wielu komórek rakowych, w tym płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi. Znajomość funkcjonalnej struktury tej ścieżki pozwala z kolei na poszukiwanie terapeutycznych punktów uchwytu w celu zahamowania aktywności transkrypcyjnej β -kateniny w komórkach nowotworowych.

WPROWADZENIE

Na sygnalizację Wnt składają się: ścieżka kanoniczna – zależna od β -kateniny oraz ścieżki niekanoniczne, takie jak ścieżka odpowiedzialna za biegunowość ciała (ang. *planar cell polarity*) oraz ścieżka zależna od Ca^{2+} . Fizjologicznie są one związane z regulacją procesów embriogenezy, różnicowania komórek oraz ich proliferacji. Równocześnie, dysregulacja tych ścieżek wiąże się z powstaniem wielu patologii, w tym także rozwojem chorób nowotworowych [1,2]. W szczególności, nadmierna aktywność kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt wpływać może na promowanie procesu kancerogenezy. Zmiany te mają bardzo istotne znaczenie dla rozwoju raka okrężnicy (ang. *colorectal cancer*, CRC) już w stadium inicjacji procesu nowotworzenia. Co raz częściej wskazuje się jednak na zaangażowanie aberracji w obrębie tej ścieżki sygnałowej w rozwój wielu innych nowotworów, w tym płaskonabłonkowych raków głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC). W przypadku raka okrężnicy jedną z podstawowych przyczyn nadmiernej aktywności szlaku Wnt są mutacje w genie supresorowym APC, jednakże w odniesieniu do HNSCC do zaburzenia tej ścieżki dochodzi na drodze różnych mechanizmów. Aby zmiany w aktywności kanonicznego szlaku Wnt móc wykorzystać terapeutycznie, konieczna jest dokładna znajomość jego struktury i zasad przekazywania sygnałów. To z kolei może pozwolić na poszukiwanie efektywnych punktów uchwytu terapii skierowanej na obniżenie aktywności transkrypcyjnej β -kateniny.

FUNKCJONALNA STRUKTURA KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

LIGANDY Wnt

W skład kanonicznej i niekanonicznych ścieżek sygnałowych Wnt wchodzi, według obecnego stanu wiedzy, rodzina dziewiętnastu białek: Wnt-1, Wnt-2, Wnt-2B, Wnt-3, Wnt-3A, Wnt-4, Wnt-5A, Wnt-5B, Wnt-6, Wnt-7A, Wnt-7B, Wnt-8A, Wnt-8B, Wnt-9A, Wnt-9B, Wnt-10A, Wnt-10B, Wnt-11, Wnt-16. Poprzez fizjologiczne zaangażowanie szlaków sygnałowych Wnt w tworzenie przestrzennych wzorców różnicowania się komórek w rozwoju zarodkowym, białka Wnt nazywane są morfogenami. Składają się z około 350-400 aminokwasów (~40 kDa) i posiadają wysoce konserwatywną domenę bogatą w cysteiny (22-25 Cys) [1].

Ze względu na potranslacyjne modyfikacje ligandy Wnt klasyfikuje się jako glikolipoproteiny. Wszystkie białka Wnt ulegają N-glikozytacji niezbędnej do ich prawidłowej sekrecji [2]. Modyfikacje te mają miejsce w retikulum endoplazmatycznym (RE) z udziałem kompleksu transferaz oligosacharydowych [3].

dr Robert Kleszcz✉

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

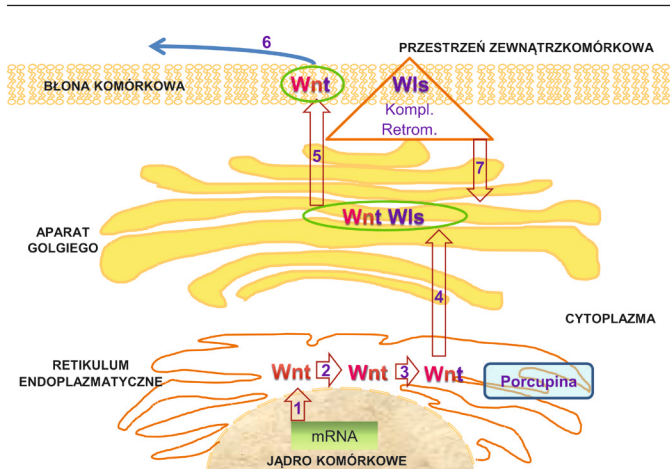
https://doi.org/10.18388/pb.2019_268

✉ autor korespondujący: kleszcz@ump.edu.pl

Słowa kluczowe: kanoniczna ścieżka Wnt, β -katenina, płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi, terapia celowana

Wykaz najważniejszych skrótów: APC – białko gruczołakowatej polipowatości okrężnicy (*Adenomatous Polyposis Coli*); *Axin* – gen kodujący aksynę; CK-1 – kinaza kazeinowa 1; CRC – nowotwory okrężnicy; *CTNNB1* – gen kodujący β -kateninę; Dvl – białko dishevelled; Fzd – receptor Frizzled; GSK-3 β – kinaza syntazy glikogenu 3 β ; HNSCC – płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji grantu SONATA nr 2014/13/D/NZ7/00300 finansowanego ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.



Rycina 1. Dojrzwienie i wydzielanie ligandów Wnt. 1 - transkrypcja mRNA dla ligandów Wnt, transport mRNA do retikulum endoplazmatycznego i translacja, 2 - N-glikozylacja ligandów Wnt, 3 - O-acylacja ligandów Wnt z udziałem Porcupiny, 4 - transport ligandów Wnt do Aparatu Golgiego z udziałem p24, 5 - wiązanie ligandów Wnt z Wntless (Wls) i transport do błony komórkowej, 6 - wydzielanie ligandów Wnt poza komórkę, 7 - powrót Wls do wnętrza komórki z udziałem tzw. Kompleksu Retromerowego.

Zawarte w białkach Wnt reszty aminokwasów o dodatnim ładunku podlegają z kolei różnym modyfikacjom lipidowym, za co odpowiada porcupina - błonowa O-acylotransferaza zlokalizowana w RE [4]. W obrębie domeny cysteinowej (Cys77) dochodzi do przyłączenia reszty kwasu palmitynowego, natomiast do seryny 209 przyłączana jest reszta kwasu palmitooleinowego [5,6]. Lipidowe modyfikacje Wnt mają znaczenie dla ich sekrecji i aktywności, gdyż zaobserwowano nagromadzenie tych białek w RE w przypadku utraty funkcji porcupiny, co z kolei związane jest z aktywnością białka Wntless (Wls) rozpoznającego modyfikacje lipidowe Wnt i transportującego te białka sygnałowe z aparatu Golgiego na powierzchnię błony komórkowej [3,4]. Po uwolnieniu Wnt, Wls ulega recyrkulacji do aparatu Golgiego dzięki oddziaływaniu z tzw. wielobiałkowym kompleksem retromerowym [4]. Tam ponownie Wls bierze udział w transporcie dojrzałych białek Wnt dostarczonych z RE do aparatu Golgiego przy udziale białek z rodziny p24 [7]. Ponadto w odniesieniu do aktywności białek Wnt dowiedziono także udział reszty kwasu palmitooleinowego w interakcji Wnt z receptorami Frizzled [8]. Przebieg procesu dojrzwienia i wydzielania ligandów Wnt przedstawia rycina 1.

TRANSPORT LIGANDÓW Wnt

Dojrzałe białka Wnt wydzielane są na zewnątrz komórki, gdzie mogą stanowić czynnik pro-wzrostowy dla macierzystej komórki poprzez oddziaływanie autokryne z jej błonowymi receptorami, lub też mogą oddziaływać parakrynie na otaczające je komórki [9]. Mechanizm transportu ligandów Wnt jak dotąd nie został jednoznacznie określony. Najprostszy z nich zakłada międzykomórkową dystrybucję na zasadzie dyfuzji, czyli gradientu stężeń białek Wnt między komórkami wydzielniczymi a komórkami wrażliwymi na te ligandy, na co wskazują ich rola jako morfogenów m.in. w rozwoju skrzydełek u

Drosophila melanogaster [10]. W modelu tym wskazywany jest istotny udział zakotwiczonych w błonie komórkowej β -glikanów - receptorów proteoglikanowych zawierających siarczany heparanu, które wiążą ligandy Wnt i ułatwiają ich przemieszczanie wzdłuż błony komórkowej do sąsiednich komórek [10,11]. Transport między sąsiadującymi komórkami niekiedy odbywać się może także przy udziale wypustek cytoplazmatycznych [12].

Modyfikacje lipidowe białek Wnt wpływają na przewagę właściwości lipofilnych tych cząsteczek. Negatywnie wpływa to na możliwości dystrybucji w hydrofilnym środowisku międzykomórkowym. Ligandy Wnt zdolne są jednak do autoagregacji i tworzenia struktury miceli, gdzie hydrofobowe reszty lipidowe kierowane są do wnętrza [1]. Tworzenie miceli przez jednonienasycone kwasy tłuszczowe może być utrudnione, jednakże taki mechanizm transportu został udowodniony dla białka sygnałowego Hedgehog, które także posiada resztę kwasu palmitooleinowego [13]. Lipofilność białek Wnt pozwala także na ich transport z udziałem cząsteczek lipoproteinowych, przykładowo z apolipoporyną II [14]. Podobnie możliwy jest transport wewnątrz białkowych kompleksów o hydrofobowym wnętrzu [15]. Obecnie wskazuje się również na egzosomalny transport pęcherzykowy. Uczestniczyć w nim może wspomniana wcześniej cząsteczka Wntless, transportująca ligandy Wnt na powierzchnię błony komórkowej [16].

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE INHIBITORY LIGANDÓW Wnt

Już na etapie transportu ligandów Wnt do komórek docelowych dochodzić może do negatywnej regulacji aktywności ścieżek sygnałowych Wnt. Mechanizm regulacji polega na wiązaniu ligandów Wnt przed ich połączeniem z błonowym receptorem. U człowieka pierwszą grupą endogennych inhibitorów jest rodzina pięciu białek sFRP (ang. *secreted Frizzled-related protein*). Białka te zawierają w swojej strukturze N-końcową domenę bogatą w cysteinę, tożsamą z domeną obecną w głównych receptorach dla szlaku Wnt - Frizzled. Budowa ta sprzyja wysokiemu powinowactwu do białek Wnt także zawierających liczne cysteiny w swojej strukturze, dzięki czemu możliwe jest tworzenie mostków disiarczkowych [17]. Co ciekawe, w niskich fizjologicznych stężeniach białka sFRP-1 i sFRP-2 za pośrednictwem dimeryzacji homologicznych domen bogatych w cysteinę wiążą się z receptorami Frizzled, aktywując kanoniczną ścieżkę sygnałową Wnt [18], choć wskazywano także na inhibitory charakter interakcji sFRP-Fzd [19]. Zdolność do wiązania ligandów Wnt posiada także białko WIF-1 (ang. *Wnt inhibitory factor 1*), które w przeciwieństwie do sFRP nie posiada domeny bogatej w cysteinę, lecz wiąże białka Wnt za pośrednictwem swoistej N-końcowej domeny WIF rozpoznającej resztę kwasu palmitooleinowego [20].

RECEPTORY I KO-RECEPTORY KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

Frizzled (Fzd) są receptorami charakterystycznymi dla kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt. Aktualnie znanych jest 10 członków rodziny Frizzled (Fzd-1 do Fzd-10), zbudowanych z N-końcowej dużej zewnątrzkomórkowej

domeny bogatej w cysteinę (10 reszt Cys), siedmiu domen transbłonowych oraz krótkiego C-końca po stronie cytoplazmatycznej komórki. Receptory Fzd wykazują strukturalne podobieństwo do receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR/7TM), stąd sugerowany udział białek G w transdukcji sygnału kanonicznego szlaku Wnt [2].

Do aktywacji wyłącznie kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt poza interakcją Wnt-Fzd niezbędny jest również udział ko-receptorów LRP5/6 (ang. *low-density lipoprotein receptor related protein 5/6*), które wspólnie z Wnt i Fzd tworzą trimeryczny kompleks aktywujący przekaźnictwo sygnału [21]. Białka LRP posiadają niewielką domenę wewnątrzkomórkową oraz dużą domenę zewnątrzkomórkową bogatą w motywy wiązania białek [22].

Poza omówionymi wyżej klasycznymi receptorami ścieżek sygnałowych Wnt odkryto także 3 alternatywne receptory: Ror2, Ryk oraz PTK7. Związanie białka Wnt z tymi receptorami bezpośrednio aktywuje dalszą transdukcję sygnału [1]. Receptor Ror2 posiada domenę bogatą w cysteinę, z kolei receptor Ryk wspomnianą wcześniej domenę WIF [20]. Receptor Ror2 wykazuje duże powinowactwo do białka Wnt5a charakterystycznego dla niekanonicznych ścieżek Wnt, jednakże receptory Ryk i PTK7 związane są z aktywnością kanonicznej i niekanonicznych ścieżek Wnt [15]. Co ciekawe, odkryto także inne receptory zawierające domenę bogatą w cysteinę – Smoothened, zaangażowane w ścieżkę sygnałową Sonic Hedgehog, których aktywacja jest niezależna od ligandów Wnt [23]. Ponadto, poza opisaną rodziną białek Wnt, również inne proteiny wykazują zdolności do pobudzenia ścieżki sygnałowej zależnej od β -kateniny. Są to 4 białka R-spondin oraz białko Norrin. Wiążą się one bezpośrednio z receptorami Fzd, choć zaangażowane są również w kontrolę poziomu błonowej puli tych receptorów [24].

REGULACJA POZIOMU RECEPTORÓW I KO-RECEPTORÓW KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

Błonowa dostępność receptorów Fzd podlega regulacji za pośrednictwem ubikwitynacji inicjującej ich internalizację i endocytozę. Za modyfikację Fzd odpowiadają białka RNF43 i ZNRF3, będące ligazami ubikwitynowymi (E3) zawierającymi transbłonową domenę RING [25]. Aktywność ligaz podlega regulacji za pośrednictwem wspomnianych wyżej alternatywnych ligandów kanonicznej ścieżki Wnt – RSPO, które tworzą inaktywujący kompleks z RNF43/ZNRF4/5 oraz LGR4/5 (ang. *leucine-rich repeat-containing GPCR 5/6*). Zablockowanie ubikwitynacji receptorów Fzd zwiększa ich błonową pulę, sprzyjając możliwości aktywacji β -katenino-zależnej ścieżki Wnt [26].

Aktywność ko-receptorów LRP5/6 podlega regulacji z udziałem zewnątrzkomórkowych inhibitorów. Pierwszą grupą inhibitorów jest rodzina czterech białek Dickkopf (DKK1-4), podobnie do sFRP oraz Fzd zawierających w swojej strukturze liczne cysteiny. Mechanizm działania białek DKK polega na łączeniu się z ko-receptorami LRP5/6 i zapobieganiu tworzeniu potrójnego kompleksu Wnt-Fzd-LRP5/6 [27]. Białka DKK oddziaływać mogą także ze swoistymi dla nich receptorami Kremen 1/2

(Krem1/2), przykładowo tworząc potrójny kompleks DKK-1-Krem1/2-LRP6 i inicjując internalizację receptora LRP6 [28]. Do modulatorów szlaku Wnt należy także białko Wise. Jest ono inhibitorem LRP6, choć opisano również działanie promujące sygnalizację Wnt na drodze działania białka Wise imitującego ligandy Wnt [29].

β -KATENINA – GŁÓWNY PRZEKAŹNIK KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

β -katenina jest białkiem złożonym z dużej centralnej domeny oraz dwóch skrajnych (N- i C-końcowych) domen. Na domenę centralną składa się 12 tzw. powtórzeń armadillo (nazwa pochodzi od odpowiednika β -kateniny w organizmie *Drosophila melanogaster*) o wysoce konserwatywnej strukturze, gdzie każde powtórzenie zbudowane jest z 42 aminokwasów tworzących 3 helisy. Całość centralnej struktury tworzy superhelisę o dodatnio naładowanym wnętrzu (bruździe). Jest to miejsce oddziaływania β -kateniny z innymi cząsteczkami [30].

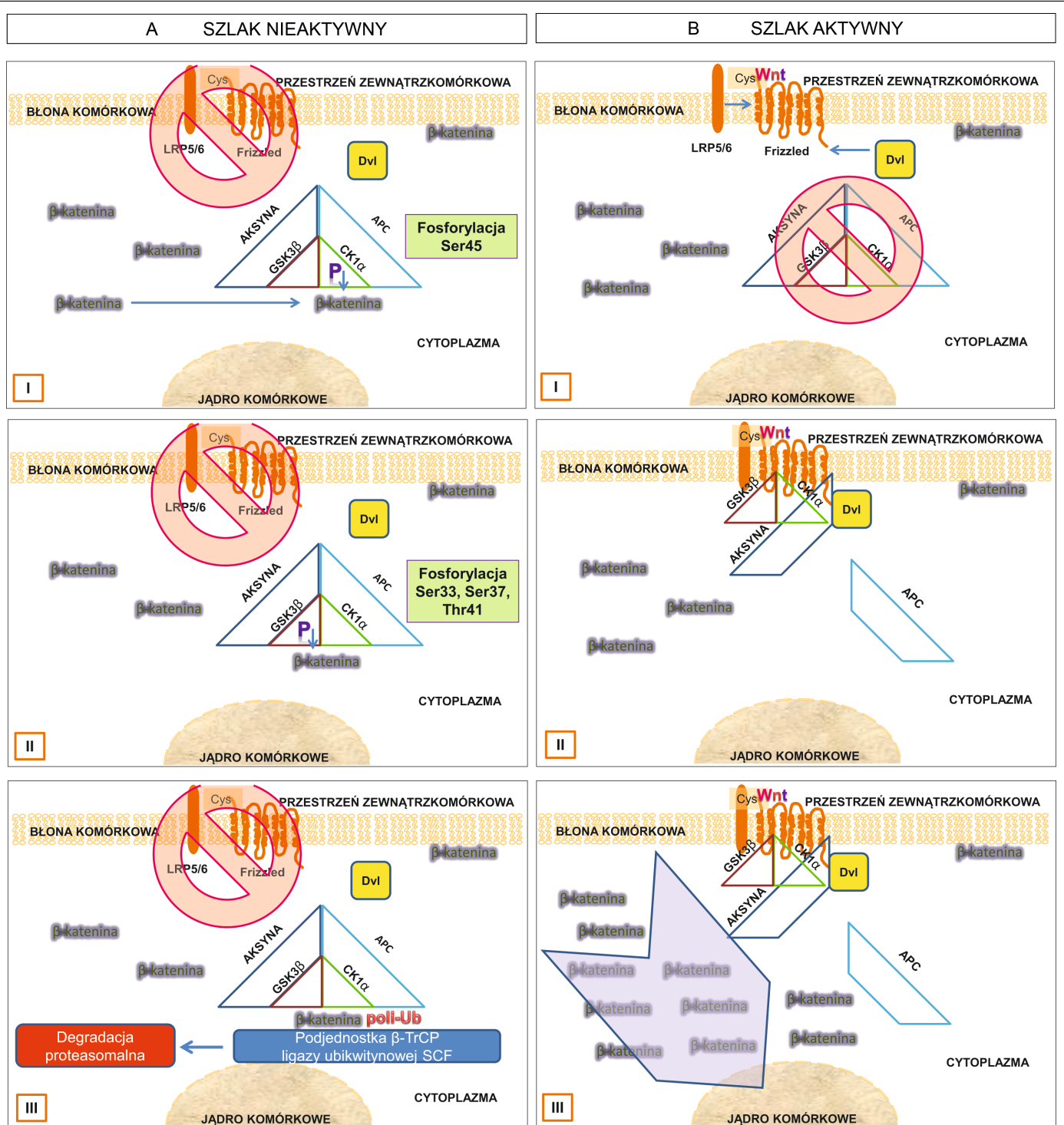
β -katenina przynależy do rodziny katenin, podobnie jak α -, δ - i γ -katenina. Poza kluczową rolę w transdukcji sygnału klasycznej ścieżki Wnt jest także odpowiedzialna za utrzymanie prawidłowej struktury cytoszkieletu. Związane jest to z oddziaływaniem β -kateniny z filamentami aktynowymi oraz E-kadheryną – przezbłonowym białkiem adhezyjnym, które uczestniczy w oddziaływaniach między komórkami poprzez zapewnienie właściwego przylegania do siebie komórek tego samego rodzaju [31]. β -katenina połączona z E-kadherynami tworzy tzw. pulę błonową tego białka. W przekaźnictwie sygnałów Wnt znaczenie ma z kolei pula cytoplazmatyczna. Pule te są od siebie w pewnym stopniu zależne. β -katenina występować może w formie monomerycznej – preferencyjnie uczestniczącej w transdukcji sygnału, bądź w formie dimerycznej w połączeniu z α -kateniną – chętniej wiązanej z E-kadheryną [32]. Ponadto nadekspresja kadheryn doprowadzić może do zahamowania kanonicznego szlaku Wnt poprzez relokalizację β -kateniny do błony komórkowej [33].

Kontrola cytoplazmatycznej puli β -kateniny związana jest z aktywnością tzw. kompleksu naznaczającego β -kateninę do degradacji, którego aktywność zależna jest od stanu pobudzenia klasycznego szlaku Wnt.

KOMPLEKS NAZNACZAJĄCY β -KATENINĘ DO DEGRADACJI – STRUKTURA I AKTYWNOŚĆ

Kompleks naznaczający β -kateninę do degradacji składa się z czterech podstawowych białek: aksyny (*Axin*), APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), GSK-3 β (kinazy syntazy glikogenu 3 β) oraz CK-1 α (kinazy kazeinowej 1 α) [1,2].

Aksyna stanowi swoiste rusztowanie kompleksu, tworząc zwartą strukturę wszystkich jego elementów składowych. Wskazuje się również, że ekspresja tego białka stanowi czynnik limitujący zdolność komórki do blokowania transdukcji sygnału zależnego od β -kateniny [1,2]. Cytoplazmatyczny poziom aksyny podlega ścisłej regulacji. Ulega ona poli-ADP-rybozylacji z udziałem tankyrazy 1/2 (TNKS1/2), co powoduje dalszą ubikwitynację aksy-



Rycina 2. Ścieżka sygnałowa Wnt. A - szlak nieaktywny: I brak pobudzenia szlaku przez ligandy Wnt powoduje wiązanie β-kateniny do kompleksu naznaczającego ją do degradacji, co zainicjowane jest fosforylacją Ser45 przez kinazę kazeinową 1α (CK1α), II fosforylację w pozycji Ser33, Ser37 i Thr41 wprowadza kinaza syntazy glikogenu 3β (GSK3β), III poli-ubikwitynacja β-kateniny naznacza ją do degradacji proteasomalnej; B - szlak aktywny: I aktywacja receptora Frizzled doprowadza do stworzenia kompleksu Fzd-LRP5/6-Dvl, II dochodzi do rozpadu kompleksu naznaczającego β-kateninę do degradacji, III zwiększenie cytoplazmatycznego stężenia β-kateniny wpływa na jej nasiloną translokację do jądra komórkowego.

ny przez ligazy RNF146 i jej degradację w proteasomach [34]. Naznaczenie aksyny ubikwityną może zostać odwrócone za pośrednictwem aktywności enzymu USP34 [35], bądź cząsteczka ta może być chroniona przed ubikwitynacją poprzez proces SUMO-ylacji jej C-końcowej domeny [36]. W przypadku degradacji aksyny jej funkcje może potencjalnie przejąć aksyna 2 (*Axin2/Axin-like protein/conductin*), będąca produktem ekspresji jednego

z genów docelowych szlaku Wnt, w przeciwieństwie do aksyny konstytutywnie ulegającej ekspresji [37].

Białko APC w kompleksie również pełni funkcję strukturalną poprzez wiązanie z β-kateniną, GSK-3β i aksyną [2], aczkolwiek udowodniono udział APC także w procesach niezwiązanych z Wnt, jak np. zaangażowanie w proces mitozy i migracji komórek [38]. Mutacje w genie *APC*

mają poważne konsekwencje dla organizmu, na co wskazuje przypadek rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (FAP), gdzie produkowane jest nieprawidłowe, skrócone białko APC. U pacjentów chorujących na FAP występuje bardzo wysokie ryzyko rozwoju raka jelita grubego [39]. Nie udowodniono jednoznacznie w jaki sposób APC działa jako negatywny regulator klasycznego szlaku sygnałowego Wnt, choć wiele wskazuje na zaangażowanie w nakierowanie kompleksu degradującego związanego z β -kateniną na odpowiednią ligazę ubikwityny [40], kontrolowanie fosforylacji β -kateniny i jej uwolnienia z kompleksu degradującego [41] oraz zapobieganie defosforylacji β -kateniny [42].

GSK-3 β należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych zaangażowanych w wiele procesów komórkowych, w tym regulację zależnej od insuliny syntezy glikogenu, a także bierze udział w procesach różnicowania, wzrostu i mobilności komórek oraz apoptozy [43]. Kinaza ta zazwyczaj rozpoznaje substraty, które zostały wcześniej ufosforylowane w aminokwasach innych niż docelowe dla GSK-3 β . Kinazą katalizującą taką fosforylację jest kinaza kazeinowa 1 α (CK-1 α) także należąca do rodziny kinaz serynowo-treoninowych [2].

Następstwem braku receptorowej aktywacji klasycznej ścieżki Wnt jest degradacja β -kateniny (Ryc. 2A). Zgodnie z zaproponowanym mechanizmem działania kompleksu, β -katenina zostaje związana z aksyną/APC, dzięki czemu N-końcowa domena β -kateniny zlokalizowana jest blisko CK-1 α . Dochodzi wówczas do fosforylacji seryny 45 β -kateniny [41]. Stanowi to sygnał dla GSK-3 β do dalszej fosforylacji β -kateniny w obrębie seryny 33, seryny 37 oraz treoniny 41 [1,2]. Rola GSK-3 β dodatkowo polega na fosforylacji aksyny i APC, co wpływa na prawidłową interakcję tych białek z β -kateniną [41]. β -katenina zostaje uwolniona z kompleksu i rozpoznana przez białko zawierające powtórzenia β -transducyny (β -TrCP), będące podjednostką ligazy ubikwityny SCF E3. Tak naznaczona β -katenina podlega degradacji proteasomalnej [1,44].

Za regulację aktywności kompleksu naznaczającego β -kateninę do degradacji w znaczącym stopniu odpowiada heterotrimeryczna białkowa fosfataza 2A (PP2A), jednakże jej rola jest niejednoznaczna. Prawdopodobne jest, że różne heterotrimery PP2A posiadają odmienne białka docelowe, z czego wynika ich odmienny wpływ na aktywność ścieżki sygnałowej Wnt. Enzym składający się z podjednostek A, B56 α oraz C przyczynia się do degradacji β -kateniny u płazów z rodzaju *Xenopus* [45]. Ponadto PP2A wpływa na aktywność GSK-3 β poprzez regulację statusu jej fosforylacji [41]. Z drugiej jednak strony białko PP2A jest zdolne do defosforylacji docelowych białek GSK-3 β w strukturze kompleksu degradującego – aksyny i APC oraz odwrócenia fosforylacji β -kateniny, aktywując w ten sposób transdukcję sygnału [41,46].

Na pozytywny wpływ aktywności PP2A wskazywać mogą doniesienia o onkogenym działaniu inhibitorów tego enzymu. Należą do nich białka CIP2 (ang. *cancerous inhibitor of PP2A*) oraz SET (I2PP2A). CIP2 (kodowane przez gen *KIAA1524*) łączy się z fosfatazą PP2A, dzięki

czemu blokuje m.in. defosforylację seryny 62 w strukturze onkogenego czynnika transkrypcyjnego c-Myc, sprzyjając stabilności c-Myc [47]. Białko SET również działa jako inhibitor PP2A, a jego nadekspresja związana jest z promowaniem proliferacji, przejścia epitelialno-mezenchymalnego, a zatem także inwazyjności komórek nowotworowych i zdolności do tworzenia przerzutów [48].

AKTYWACJA KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

W wyniku przyłączenia się ligandu Wnt do receptora Fzd dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej (Ryc. 2B). Początkowo zachodzi fosforylacja z udziałem m.in. CK-1 ϵ oraz przywołanie adaptorowego białka dishevelled (Dvl) do błony komórkowej. Rodzina Dvl u człowieka składa się z trzech białek homologicznych (Dvl1-3), a każde z nich posiada w strukturze 3 duże domeny: DIX (Dvl/Axin), PDZ (*postsynaptic density 95, disc large, zona occludens-1*) oraz DEP (DV, Egl-10, *pleckstrin*). Umożliwiają one połączenie z receptorami Fzd. Za przekazanie sygnału od kompleksu Wnt-Fzd do białek Dvl odpowiedzialne mogą być białka G. Aktywowane przez fosforylację białko Dvl koordynuje tworzenie połączenia między Fzd a LRP6 [49]. Dochodzi następnie do fosforylacji cytoplazmatycznej domeny LRP6 prowadzonej przez różne enzymy, w tym kinazę PIP5K1 β (ang. *phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type I β*), GSK-3 β (z puli błonowej, a nie cytoplazmatycznej), CK-1 i kinazę białkową A (PKA) [50,51].

Podstawową konsekwencją aktywacji klasycznej ścieżki Wnt jest zablokowanie aktywności kompleksu naznaczającego β -kateninę do degradacji. Jednoznaczny mechanizm tego zjawiska nie jest znany, chociaż wspólnym elementem proponowanych modeli wydaje się być zahamowanie oddziaływania GSK-3 β . Może być to związane z dysocjacją GSK-3 β z kompleksu degradującego, inaktywacją fosforylacją seryny 9 GSK-3 β , łączeniem GSK-3 β do LRP6 lub rozpadem kompleksu w wyniku odłączenia aksyny [2]. Białka Dvl w swojej strukturze posiadają domenę DIX, za której pośrednictwem oddziaływać mogą z aksyną ulegającą wspólnie z GSK-3 β i CK-1 α relokacji z rozpadającego się kompleksu do błony komórkowej [49].

Opisany powyżej mechanizm inaktywacji kompleksu nie jest jednak jednoznaczny, ponieważ do degradacji β -kateniny dochodzić może jeszcze długo po aktywacji błonowego receptora, a ligand Wnt jedynie częściowo zaburza funkcję kompleksu [52]. Alternatywny model regulacji cytoplazmatycznego poziomu β -kateniny zakłada brak wpływu aktywacji ścieżki na rozpad tego kompleksu. Ufosforylowana β -katenina może nie ulegać ubikwitynacji i pozostać w połączeniu z kompleksem naznaczającym β -kateninę, blokując możliwość fosforylacji kolejnych cząsteczek β -kateniny. Za wzrost cytozolowego stężenia tego konstytutywnie syntetyzowanego białka przekąźnikowego odpowiadać będzie jego nowo utworzona pula [53].

Zaburzenie równowagi syntezy i rozkładu β -kateniny powoduje jej translokację do jądra komórkowego. Wskazuje się na możliwość oddziaływania β -kateniny z różny-

mi białkami pełniącymi funkcję chaperonów importujących ją do wnętrza jądra komórkowego. Jako chaperony służyć mogą przykładowo białka Pygopus i Legless/BCL9 związane z jądrowym działaniem β -kateniny, białka Dvl ulegające również translokacji do jądra komórkowego, a nawet aksyna i APC związane potencjalnie z transportem β -kateniny z jądra komórkowego do cytoplazmy [1,49].

AKTYWACJA TRANSKRYPCJI GENÓW DOCELOWYCH KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt

Za ekspresję genów docelowych szlaku Wnt odpowiedzialna jest rodzina czynników transkrypcyjnych TCF/LEF (ang. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*), odkrytych początkowo jako czynniki związane z transkrypcją w komórkach T i B układu odpornościowego [54]. Należą do nich: TCF1 (TCF7), LEF1, TCF3 (TCF7L1) oraz TCF4 (TCF7L2). W jądrze komórkowym pełnią one dwojaką funkcję. Przy niskich stężeniach β -kateniny łączą się z represorami transkrypcji TLE1-3 (ang. *transducin-like enhancer*, Groucho u *D. melanogaster*) i wiążą się z DNA w obszarze tzw. elementów odpowiedzi na Wnt (WRE) posiadających sekwencję CCTTTGT/AT/A [55]. Tak utworzony kompleks oddziałuje ponadto z modulatorami epigenetycznymi, a przede wszystkim aktywuje deacetylazy histonów (HDAC), które poprzez usuwanie reszt acetylowych z ogonów histonów H3 i H4 doprowadzają do utworzenia heterochromatyny i zahamowania procesu transkrypcji [54]. Ekspresja genów docelowych Wnt pozostaje zablokowana.

Gdy dochodzi do nasilonej translokacji β -kateniny do jądra komórkowego, białko to bezpośrednio wypiera TLE/Groucho z połączenia z czynnikami TCF/LEF [56]. W procesie eliminacji TLE/Groucho udział bierze białko XIAP (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis*), powodując ubikwitynację i zmniejszenie powinowactwa TLE/Groucho do czynników transkrypcyjnych [57]. Do obszaru WRE przywołane zostaje białko CBP (ang. *CREB-binding protein*) pełniące rolę acetylotransferazy histonów i związane ze zwiększeniem stopnia acetylacji histonów H3 i H4 [58].

Do aktywacji transkrypcji zależnej od Wnt niezbędne są odpowiednie czynniki pomocnicze. Do najważniejszych należą Pygopus oraz BCL9, gdzie BCL9 pełni rolę swoistego pomostu między cząsteczką β -kateniny i Pygopus [59]. W przypadku transkrypcji zależnej od TCF4 niezbędne jest także oddziaływanie białka TNIK (ang. *Traf2 and Nck-interacting protein kinase*). Powoduje ono fosforylację Ser154 TCF4, tym samym nadając pełną aktywność transkrypcyjną temu czynnikowi [60].

Aktywność kompleksu transkrypcyjnego może podlegać też negatywnej regulacji. Białka Chibby oraz ICAT (ang. *inhibitor of β -catenin and TCF4*) blokują aktywność transkrypcyjną β -kateniny [32]. Same czynniki transkrypcyjne TCF/LEF podlegać mogą regulacji na drodze fosforylacji z udziałem kinazy NLK (ang. *nemo-like kinase*), gdzie fosforylacja wprowadzana jest w obrębie domeny HMG (ang. *high mobility domain*) odpowiedzialnej za interakcję TCF/LEF z DNA. W efekcie NKL doprowadza do utraty zdolności wiązania czynników transkrypcyjnych z DNA [61].

Lista genów docelowych szlaku Wnt zależnego od β -kateniny zawiera ponad 100 pozycji (https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes). Wyróżnić tu można geny kodujące czynniki transkrypcyjne np. c-Myc, TCF1, LEF1, regulatory cyklu komórkowego np. cyklina D1, czynniki wzrostu np. VEGF, czynniki prozapalne np. IL-8, COX-2, regulatory apoptozy np. surwiwina, metaloproteinazy np. MMP-7 oraz białka związane z aktywnością komórek macierzystych np. Oct 4 i Nanog. Wśród genów docelowych pojawiają się również elementy składowe szlaku sygnałowego Wnt m.in. wspomniane czynniki transkrypcyjne TCF1 i LEF-1, receptor Fzd7, inhibitory DKK i sFRP-2 oraz Aksyna 2.

KANONICZNA ŚCIEŻKA SYGNAŁOWA Wnt W PŁASKONABŁONKOWYCH NOWOTWORACH GŁOWY I SZYI

W raku okrężnicy (CRC) nasilenie aktywności kanonicznej ścieżki Wnt jest jednym z podstawowych zmian na poziomie molekularnym już na wczesnych etapach kancerogenezy. Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP) należy do chorób genetycznych wywołujących powstanie bardzo licznych polipów gruczolakowatych – głównie jelita grubego – zazwyczaj już w wieku kilkunastu lat, które nieleczone niemalże zawsze przekształcają się w inwazyjny nowotwór. FAP spowodowana jest mutacjami anty-onkogenu APC – jednego z elementów składowych kompleksu oznaczającego β -kateninę do degradacji. Na niezwykle istotne znaczenie APC w rozwoju CRC wskazuje występowanie mutacji kodującego go genu w ponad 70% przypadków spontanicznych nowotworów jelita grubego [39,62]. Inne obserwowane mutacje dotyczą również genów: *FBXW7* (koduje jedną z podjednostek ligazy ubikwitynowej, mutacja u 10,4% pacjentów z CRC), *CTNNB1* (β -katenina, 4,7%), *TCF7L2* (*TCF4*, 4,1%), *Axin* (3,4%), *LRP6* (2,9%), *LGR5* (2,0%), *GSK3 β* (0,9%), *RNF43* (0,6%) [63].

W przeciwieństwie do nowotworów okrężnicy, w przypadku HNSCC mutacje genów kodujących elementy składowe kanonicznego szlaku Wnt występują rzadko i stanowią przykładowo jedynie 4% przypadków dla APC, a dla innych genów m.in. *CTNNB1*, *Axin* oraz *GSK-3 β* – niemal nie występują. Z tego względu przez długi czas nie brano pod uwagę zmian molekularnych w obrębie ścieżki sygnałowej Wnt jako istotnych z punktu widzenia kancerogenezy HNSCC [64,65]. Jednakże wiele wskazuje na znaczenie nadmiernej aktywności tego szlaku sygnałowego w rozwoju HNSCC związanej z mechanizmami odmiennymi od mutacji.

W nowotworach głowy i szyi hiperaktywacja szlaku Wnt wynikać może z podwyższonej ekspresji ligandów Wnt, receptorów Frizzled oraz białek dishevelled oraz nasilonej translokacji β -kateniny do jądra komórkowego [66,67]. Z kolei zwiększenie jądrowej puli β -kateniny związane jest z nasiloną ekspresją genów docelowych szlaku, takich jak wspomniane wcześniej *c-Myc*, *CCND1*, *MMP7* i *BIRC5*. Zwiększone ilości syntetyzowanych w komórkach metaloproteinaz macierzy międzykomórko-

wej sprzyjać będą inwazyjności i potencjałowi przerzutowania takich komórek, połączonej także ze zmianami w ich morfologii [68]. Zmiany w poziomie aktywności szlaku Wnt, podobnie jak w przypadku nowotworów jelita grubego, obserwuje się już na bardzo wczesnych etapach kancerogenezy, w tym także w tzw. stadiach przednowotworowych. Przykładowo, choć w prawidłowym nabłonku jamy ustnej nie obserwuje się translokacji β -kateniny do jądra komórkowego, to w przypadku leukoplakii, szczególnie leukoplakii dysplastycznej, zwiększeniu ulega jądrowa pula tego białka [69,70].

Na istotne zaangażowanie szlaku Wnt w rozwój HNSCC wskazują wyniki badań określające efekt zahamowania tego szlaku na komórki nowotworowe. Badania *in vitro* na hodowlach komórkowych, w których opisano podwyższony poziom ekspresji ligandów Wnt, wskazały na efekt antyproliferacyjny immunoterapii skierowanej wobec Wnt-1 w wybranych liniach komórkowych [71]. Na podobnym poziomie oddziaływania, zastosowanie LGK974 – inhibitora porcupiny – doprowadziło do osłabienia sygnalizacji Wnt w przypadku niektórych modeli komórkowych, a także redukcji wielkości guza w modelu mysich ksenograftów [72]. Poprzez zablokowanie ekspresji β -kateniny także zaobserwowano ograniczony wzrost komórek nowotworowych, co po części związane było z zablokowaniem ich cyklu komórkowego w fazie G1/G0 oraz znaczącą indukcją apoptozy [73]. Także na poziomie obserwacji klinicznych udowodniono zależność między podwyższonym poziomem β -kateniny a krótszym przeżyciem pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem obszaru jamy ustnej [67].

Kanoniczny szlak sygnałowy Wnt podlega fizjologicznej regulacji m.in. na drodze oddziaływania zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych antagonistów. Stąd, w przypadku zaburzenia ich ekspresji dochodzić może do nadmiernego pobudzenia sygnalizacji zależnej od β -kateniny. Odmienne niż ma to miejsce w nowotworach okrężnicy, dla rozwoju kancerogenezy nabłonka płaskiego głowy i szyi istotne znaczenie mają zmiany w mechanizmach regulacji epigenetycznej. Na ekspresję naturalnych antagonistów szlaku Wnt wpływ ma status metylacji ich obszarów promotorowych. W przypadku HNSCC dla zewnątrzkomórkowych antagonistów szlaku Wnt opisano hipermetylację sFRP-1, sFRP-2, sFRP-5, DKK-1, WIF-1 [74,75]. Wśród antagonistów wewnątrzkomórkowych wyciszenie ekspresji na drodze epigenetycznej dotyczy genu *DACH1* (jądrowy inhibitor ekspresji genów docelowych Wnt, w tym receptorów Fzd), *PPP2R2B* (jest genem dla podjednostki B białkowej fosfatazy 2A), *CXXC4* oraz *DACT2* (kodujące białka hamujące szlak Wnt poprzez oddziaływanie z Dvl) [75,76].

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA INHIBICJI KANONICZNEJ ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ Wnt W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Zdolność do modulacji zależnej od β -kateniny sygnalizacji Wnt wykazują liczne substancje stosowane rutynowo w leczeniu. Należą do nich niesteroidowe leki przeciwwzapalne (NLPZ) m.in. kwas acetylosalicylowy,

indometacyna i sulindak, które prawdopodobnie poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenaz zaangażowanych w kaskadę kwasów arachidonowych ograniczają produkcję prostaglandyn, a te z kolei są czynnikami blokującymi degradację β -kateniny [77-79]. Wieloletnie obserwacje wskazują na chemoprewencyjny efekt kwasu acetylosalicylowego w rozwoju nowotworów jelita grubego, płuc i piersi [80]. Spośród leków biologicznych imatynib – inhibitor kinazy tyrozynowej Bcr-Abl oraz receptora dla płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), również nasila fosforylację β -kateniny [81].

Ze względu na rosnące zainteresowanie klasyczną ścieżką Wnt jako miejscem oddziaływania leków przeciwnowotworowych, w ostatnich latach zsyntetyzowano wiele substancji blokujących różne białka tej ścieżki. Są to głównie związki drobnocząsteczkowe licznie opisywane w literaturze. Ich działanie obejmuje wczesne w sygnalizacji punkty uchwytu np. IWP-1, IWP-2 (inh. porcupiny), etap wewnątrzkomórkowego przekaźnictwa sygnału np. XAV939, JW55, JW74 (inh. tankyrazy) oraz 3289-8625, NSC668036, J01-017a (inh. Dvl) oraz w znaczącym stopniu jądrowe inhibitory transkrypcyjnej aktywności β -kateniny m. in. PKF115-584, PKF118-310, PKF118-744, PRI-724, ZTM000990. W przypadku oddziaływania wobec białek związanych z błoną komórkową oraz wobec ligandów Wnt zastosowanie mają przede wszystkim leki biologiczne, tzn. przeciwciała monoklonalne, rekombinowane białka oraz interferujące RNA [63,79,82-84]. Za efektywne punkty uchwytu w obrębie kanonicznego szlaku Wnt w rakach głowy i szyi uznać można inhibicję porcupiny oraz interakcji CBP z β -kateniną [85].

Na aktywność sygnalizacji Wnt wpływ mają bardzo liczne związki pochodzenia naturalnego, często będące składnikami pożywienia. Wśród nich wiele związków należy do grupy flawonoidów: galusan epigallokatechiny (EGCG), genisteina, kwercetyna i izokwercetyna, kamferol, sylibina [86]. Podobną aktywność zaobserwowano również w przypadku kurkuminy, resweratrolu i innych związków polifenolowych m.in. pochodzących z zielonej herbaty, triterpenów np. lupeolu, a także likopenu oraz retinoidów [87]. Związki pochodzenia naturalnego posiadają różne punkty działania w obrębie klasycznej ścieżki Wnt. Przykładowo EGCG sprzyjać może demetylacji promotora dla białka WIF-1, jest inhibitorem ścieżki PI3K/AKT, co pomaga w stabilizacji kompleksu naczynającego β -kateninę do degradacji, jak również wspólnie z izokwercetyną i sylibiną zaburza translokację β -kateniny do jądra komórkowego. Genisteina, kurkumina i kwercetyna wykazują zdolność do blokowania ekspresji genów docelowych szlaku Wnt, choć ich działanie widoczne jest też na wcześniejszych etapach tej ścieżki sygnalizacyjnej [86, 87]. Wskazano także na inhibicję ścieżki sygnałowej Wnt pod wpływem kwasu kaperatowego i fytozodowego pozyskiwanych z porostów [88].

PODSUMOWANIE

Złożoność struktury kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt sprawia, że wciąż opisywane są nowe białka uczestniczące w transdukcji sygnału. Wiele interakcji pomiędzy

nimi wymaga dokładniejszego wyjaśnienia, jednakże już obecny stan wiedzy pozwala na zrozumienie molekularnych podstaw zaburzonej sygnalizacji Wnt. Nadmierna aktywność transkrypcyjna β -kateniny obserwowana m.in. w niektórych nowotworach może być podstawą do ujęcia sygnalizacji Wnt jako punktu uchwytu celowanej terapii przeciwnowotworowej. Z kolei zdolność wybranych składników żywności do modulacji szlaku Wnt daje nadzieję również na możliwości chemoprewencyjnego działania takich związków naturalnych.

PIŚMIENNICTWO

- Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R (2013) The Wnt signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther* 138: 66-83
- Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E (2013) The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* 31: 1-31
- Coudreuse D, Korswagen HC (2007) The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development* 134: 3-12
- Port F, Basler K (2010) Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic* 11: 1265-1271
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448-452
- Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 11: 791-801
- Port F, Hausmann G, Basler K (2010) A genome-wide RNA interference screen uncovers two p24 proteins as regulators of Wingless secretion. *EMBO Rep* 11: 1144-1152
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337: 59-64
- Nusse R (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15: 28-32
- Yan D, Lin X (2009) Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a002493
- Lin X (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131: 6009-6021
- Hsiung F, Ramirez-Weber FA, Iwaki DD, Kornberg TB (2005) Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437: 560-563
- Yu J, Virshup DM (2014) Updating the Wnt pathways. *Biosci Rep* 34: pii: e00142
- Panáková D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435: 58-65
- Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, ten Berge D, Kalani Y (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 59-66
- Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N, Budnik V (2009) Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 139: 393-404
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121: 737-746
- Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinnayam B, Rubin JS (2014) Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ β -catenin signaling. *Cell Signal* 26: 94-101
- Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA (1999) Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 274: 16180-16187
- Liepinsh E, Bányai L, Patthy L, Otting G (2006) NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J Mol Biol* 357: 942-950
- Li Y, Bu G (2005) LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future Oncol* 1: 673-681
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663-1677
- Schulte G (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62: 632-667
- Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11452-11457
- Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Clevers H (2012) Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488: 665-669
- Xie Y, Zamponi R, Charlat O, Ramones M, Swalley S, Jiang X, Rivera D, Tschantz W, Lu B, Quinn L, Dimitri C, Parker J, Jeffery D, Wilcox SK, Watrobka M, LeMotte P, Granda B, Porter JA, Myer VE, Loew A, Cong F (2013) Interaction with both ZNRF3 and LGR4 is required for the signalling activity of R-spondin. *EMBO Rep* 14: 1120-1126
- Ahn VE, Chu ML, Choi HJ, Tran D, Abo A, Weis WI (2011) Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Dev Cell* 21: 862-873
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature* 417: 664-667
- Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, Krumlauf R (2003) Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 130: 4295-4305
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell* 90: 871-882
- Shapiro L, Weis WI (2009) Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a003053
- Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *Cell Biol* 167: 339-349
- Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting β -catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153: 1049-1060
- Zhang Y, Liu S, Mickanin C, Feng Y, Charlat O, Michaud GA, Schirle M, Shi X, Hild M, Bauer A, Myer VE, Finan PM, Porter JA, Huang SM, Cong F (2011) RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 13: 623-629
- Lui TT, Lacroix C, Ahmed SM, Goldenberg SJ, Leach CA, Daulat AM, Angers S (2011) The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol* 31: 2053-2065
- Kim MJ, Chia IV, Costantini F (2008) SUMOylation target sites at the C terminus protect Axin from ubiquitination and confer protein stability. *FASEB J* 22: 3785-3794
- Lee E, Salic A, Krüger R, Heinrich R, Kirschner MW (2003) The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* 1: E10
- Näthke I (2006) Cytoskeleton out of the cupboard: colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC. *Nat Rev Cancer* 6: 967-974
- Das V, Kalita J, Pal M (2017) Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother* 87: 8-19
- Yu X, Waltzer L, Bienz M (1999) A new *Drosophila* APC homologue associated with adhesive zones of epithelial cells. *Nat Cell Biol* 1: 144-151
- Kimelman D, Xu W (2006) β -catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25: 7482-7491

42. Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, Schreiber EM, Day BW, Liu B (2008) APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32: 652-661
43. Forde JE, Dale TC (2007) Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 64: 1930-1944
44. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16: 3797-3804
45. Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM (2001) Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *EMBO J* 20: 4122-4131
46. Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353: 417-439
47. Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y, Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grénman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kähäri VM, Westermarck J (2007) CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 130: 51-62
48. Sobral LM, Sousa LO, Coletta RD, Cabral H, Greene LJ, Tajara EH, Gutkind JS, Curti C, Leopoldino AM (2014) Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. *Mol Cancer* 13: 32
49. Gao C, Chen YG (2010) Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22: 717-727
50. Niehrs C, Shen J (2010) Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 67: 2551-2562
51. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438: 873-877
52. Hernández AR, Klein AM, Kirschner MW (2012) Kinetic responses of beta-catenin specify the sites of Wnt control. *Science* 338: 1337-1340
53. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H (2012) Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149: 1245-1256
54. Cadigan KM, Waterman ML (2012) TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: pii: a007906
55. Hatzis P, van der Flier LG, van Driel MA, Guryev V, Nielsen F, Denisov S, Nijman IJ, Koster J, Santo EE, Welboren W, Versteeg R, Cuppen E, van de Wetering M, Clevers H, Stunnenberg HG (2008) Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol* 28: 2732-2744
56. Daniels DL, Weis WI (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 12: 364-371
57. Hanson AJ, Wallace HA, Freeman TJ, Beauchamp RD, Lee LA, Lee E (2012) XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Mol Cell* 45: 619-628
58. Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 276-286
59. Fiedler M, Sánchez-Barrena MJ, Nekrasov M, Mieszczanek J, Rybin V, Müller J, Evans P, Biernacki M (2008) Decoding of methylated histone H3 tail by the Pygo-BCL9 Wnt signaling complex. *Mol Cell* 30: 507-518
60. Yamada T, Masuda M (2017) Emergence of TNK1 inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Sci* 108: 818-823
61. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2003) Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 23: 1379-1389
62. Zhai Z, Yu X, Yang B, Zhang Y, Zhang L, Li X, Sun H (2017) Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin Cell Dev Biol* 64: 107-115
63. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36: 1461-1473
64. Lea IA, Jackson MA, Li X, Bailey S, Peddada SD, Dunnick JK (2007) Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis* 28: 1851-1858.
65. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, Zhao M, Ortega Alves MV, Chang K, Drummond J, Cortez E, Xie TX, Zhang D, Chung W, Issa JP, Zweidler-McKay PA, Wu X, El-Naggar AK, Weinstein JN, Wang J, Muzny DM, Gibbs RA, Wheeler DA, Myers JN, Frederick MJ (2013) Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 3: 770-781
66. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, Liotta LA, Emmert-Buck M, Gutkind JS (2000) Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 19: 3220-3224
67. Ravindran G, Devaraj H (2012) Aberrant expression of beta-catenin and its association with DeltaNp63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig* 16: 1275-1288
68. Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y (2010) Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 37: 1095-1103
69. Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M, Takagi R, Saku T (2011) Nuclear translocation of beta-catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology* 59: 283-291
70. Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T (2007) Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer* 6: 62
71. Rhee CS, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, Corr M, Carson DA (2002) Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 21: 6598-6605
72. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, Li J, Tompkins C, Pferdekammer A, Steffy A, Cheng J, Kowal C, Phung V, Guo G, Wang Y, Graham MP, Flynn S, Brenner JC, Li C, Villarreal MC, Schultz PG, Wu X, McNamara P, Sellers WR, Petruzzelli L, Boral AL, Seidel HM, McLaughlin ME, Che J, Carey TE, Vanasse G, Harris JL (2013) Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20224-20229
73. Chang HW, Lee YS, Nam HY, Han MW, Kim HJ, Moon SY, Jeon H, Park JJ, Carey TE, Chang SE, Kim SW, Kim SY (2013) Knockdown of beta-catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Signal* 25: 839-847
74. Paluszczak J, Hemmerling D, Kostrzewska-Poczekaj M, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, Wierzbicka M, Baer-Dubowska W (2014) Frequent hypermethylation of WNT pathway genes in laryngeal squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 43: 652-657
75. Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzewska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, Mielcarek-Kuchta D, Baer-Dubowska W (2015) 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* 36: 2855-2861
76. Paluszczak J, Wiśniewska D, Kostrzewska-Poczekaj M, Kiwerska K, Grénman R, Mielcarek-Kuchta D, Jarmuż-Szymczak M (2017) Prognostic significance of the methylation of Wnt pathway antagonists-CXXC4, DACT2, and the inhibitors of sonic hedgehog signaling-ZIC1, ZIC4, and HHIP in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Oral Investig* 21: 1777-1788
77. Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M (2001) The non-steroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 20: 645-653
78. Nath N, Kashfi K, Chen J, Rigas B (2003) Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon can-

- cer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12584-12589
79. Takahashi-Yanaga F, Kahn M (2010) Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 16: 3153-3162
80. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348: 891-899
81. Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, Jiang W, Luu HH, Vanichakarn P, Sztankowski JP, Park JY, Breyer B, He TC (2003) Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett* 193: 161-170
82. Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, Caron de Fromentel C, Merle P (2013) Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 59: 1107-1117
83. Voronkov A, Krauss S (2013) Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des* 19: 634-664
84. Zimmerman ZF, Moon RT, Chien AJ (2012) Targeting Wnt pathways in disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: pii: a008086
85. Kleszcz R, Szymańska A, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W, Paluszczak J (2019) Inhibition of CBP/β-catenin and porcupine attenuates Wnt signaling and induces apoptosis in head and neck carcinoma cells. *Cell Oncol* 42: 505-520
86. Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, Neto VM, Abreu JG (2011) Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci* 89: 545-554
87. Tarapore RS, Siddiqui IA, Mukhtar H (2012) Modulation of Wnt/β-catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis* 33: 483-491
88. Paluszczak J, Kleszcz R, Studzińska-Sroka E, Krajka-Kuźniak V (2018) Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 441: 109-124

The canonical Wnt pathway – functional structure and importance for head and neck squamous cell carcinomas

Robert Kleszcz 

Department of Pharmaceutical Biochemistry, Poznan University of Medical Sciences

✉ corresponding author: kleszcz@ump.edu.pl

Key words: the canonical Wnt pathway, β-catenin, head and neck squamous cell carcinoma, targeted therapy

ABSTRACT

The canonical Wnt pathway is related to regulation of embryogenesis, cell differentiation and proliferation. Various proteins are necessary for proper signal transduction and β-catenin serves as the main mediator. In off-state of the Wnt pathway β-catenin undergoes proteasomal degradation, while in on-state increase of cytoplasmic concentration of β-catenin occurs followed by β-catenin translocation into the cell nucleus. Interaction between β-catenin and TCF/LEF transcription factors activates the expression of over hundred target genes of the Wnt pathway. Highly active Wnt signaling is observed in many cancers, including head and neck squamous cell carcinomas. Knowledge of the functional structure of the canonical Wnt pathway enables search of therapeutic molecular targets to effectively inhibit transcriptional activity of β-catenin in cancer cells.