



## ARAŞTIRMA / RESEARCH

# Megakaryoblast ve bazofil hücre tipine sahip Ph (+) KML hücre hatlarının Wnt ve Frizzled ilişkili gen ifadelerinin karşılaştırılması

Comparison of Wnt and Frizzled related gene expressions of Ph (+) CML cell lines with megakaryoblast and basophil cell types

Melek Pehlivan<sup>1</sup>, Hakkı Ogün Sercan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Türkiye  
<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, İzmir, Türkiye

*Cukurova Medical Journal 2021;46(1):318-324*

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to investigate the expression changes in Wnt and Frizzled genes that initiate Wnt signaling in two different Ph (+) chronic myeloid leukemia (CML) cell lines.

**Materials and Methods:** Total RNA isolations were performed from Ph (+) CML cell lines with megakaryoblast and basophil cell types. RNA concentrations was evaluated by spectrophotometry and reverted to cDNA. Expression levels of Wnt and Frizzled genes were analyzed by PCR and data of two cell lines were compared with each other.

**Results:** In the analyzes, it was observed that MEG-01 cells expressed Fzd1-9 genes, while KU812 expressed Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd9 genes. It was determined that MEG-01 cells expressed Wnt2b and Wnt3 genes, while KU812 cells expressed only Wnt3 gene.

**Conclusion:** KU812, MEG-01 cell lines differ from each other in terms of expression levels of Wnt signaling genes. It is thought that the differences between the expression levels of Wnt genes observed in the two CML Ph (+) cell lines may be caused by the differences in the cell's origin, fusion regions and cell type-specific signal transduction stimuli and pathways. Therefore, it is recommended to select more than one cell line in studies using model cell lines.

**Keywords:** CML, Wnt signal transduction, Ph (+) cell lines

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada blastik fazda farklı hücre serilerinde tutulum gösteren iki farklı Ph (+) kronik miyeloid lösemi (KML) hücre hattında, Wnt sinyal yolağı ana oyuncuları olan Wnt ve Frizzled genlerinin ifade farklılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Megakaryoblast (MEG-01) ve bazofil (KU812) hücre tipine sahip Ph (+) KML hücre hatları kültüre edildikten sonra, RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonları spektrofotometrede belirlendikten sonra, cDNA çevrimi yapılmıştır. PCR ile Wnt ve Frizzled genlerinin ifade düzeyleri analiz edilmiş, iki hücre hattının Wnt ve Frizzled ekspresyon verileri birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Yapılan analizler sonrasında MEG-01 hücrelerinin Fzd1-9 genlerini, KU812'nin ise Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd9 genlerini ifade ettiği gözlemlenmiştir. MEG-01 hücreleri Wnt2b ve Wnt3 genlerini eksprese ederken, KU812 hücrelerinin ise sadece Wnt3'ü eksprese ettiği saptanmıştır.

**Sonuç:** KU812 ve MEG-01 hücre hatlarının, Wnt sinyal genlerinin ifade düzeyleri açısından birbirinden farklılık gösterdiği belirlenmiştir. İki KML Ph (+) hücre hattında gözlenen Wnt sinyal genlerinin ifade düzeyleri arasındaki farklara, hücrenin orijini, füzyon bölgeleri ve hücre tipine özgü olabilecek sinyal ileti uyarı ve yollarındaki farklılıkların neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle model hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalar da birden fazla hücre hattının seçilmesi önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** KML, Wnt sinyal iletimi, Ph (+) hücre hatları.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Melek Pehlivan, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Turkey. E-mail: pehlivanmlk@gmail.com  
Geliş tarihi/Received: 16.09.2020 Kabul tarihi/Accepted: 31.10.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 15.01.2021

## GİRİŞ

Wnt sinyal iletimi, gelişim, doku homeostazı ve doku rejenerasyonu dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır. Klasik olarak Wnt sinyali,  $\beta$ -katenin bağımlı (kanonik yolak, Wnt/ $\beta$ -katenin yolu) ve  $\beta$ -katenin bağımsız (kanonik olmayan yolak, Wnt / düzlemsel hücre polaritesi [PCP] ve kalsiyum yolu) olmak üzere ikiye ayrılmıştır<sup>1</sup>. Kanonik yolakta Wnt ligandları olmadığında; Axin, APC ve GSK3 $\beta$ 'dan oluşan yıkım kompleksi  $\beta$ -katenin'in proteazomda yıkılmasına neden olmaktadır.  $\beta$ -katenin, fosforile edildikten sonra sürekli ubiquitine edilerek degradasyona uğramaktadır<sup>2</sup>. Wnt ligandları ortamda bulunduğu, Wnt reseptörü Frizzled (Fzd) ve LDL reseptörü ilişkili protein 5/6 (LRP5/6) ile etkileşime geçmektedir. Wnt, reseptörü Disheveled (Dvl) aracılığı ile yıkım kompleksinin bozulmasına yardımcı olur ve proteazomda  $\beta$ -katenin'in yıkımını önler.  $\beta$ -katenin çekirdeğe geçer, TCF-LEF ve BCL9 gibi transkripsiyon faktörlerini uyararak Myc ve CCND1 gibi hedef genlerin uyarılmasına neden olur<sup>3</sup>.

Kanonik olmayan yollarda, salgılanan Wnt proteinleri hücre içi sinyal iletimini başlatmak için Frizzled (Fzd) reseptörlerinin yanı sıra, ROR2, ROR1 veya RYK gibi diğer reseptörler ile ilişkiye girmektedir. Wnt ligandları ve Wnt reseptörleri arasındaki bu ilişki farklı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. PCP ve kalsiyum sinyal yolları başta olmak üzere kanonik olmayan yollar, kök hücrelerin korunmasına, hücre polaritesinin ve hücre hareketinin düzenlenmesine, invazyonun teşvik edilmesine ve kanonik Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal kaskadının inhibe edilmesine neden olmaktadır<sup>4</sup>.

Wnt sinyalinin hematopoezde ve kök hücre gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı, hematopoez sırasında farklı şekilde düzenlenmektedir. Yolak inhibe edildiğinde, normal hematopoez süreci tehlikeye atılırken, aktive edildiğinde hematolojik kök hücre (HKH) klojenitesi ve miyeloid gelişiminde bir artış meydana gelir. Ancak Wnt/ $\beta$ -katenin'in aşırı aktivasyonu HSC'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşmasını etkileyerek hematopoez sürecinin bozulmasına ve lösemi gelişimine yol açmaktadır<sup>5</sup>.

KML, BCR-ABL kimerik genini barındıran ve t (9; 22) (q34; q11) sonrası ortaya çıkan Philadelphia kromozomu ile karakterize edilmiştir<sup>6,7</sup>. BCR-ABL kimerik geninin yapısı, füzyona katılan genlerin

kırılma noktasına göre değişiklik gösterir. Bu değişiklik farklı mRNA'ları kodlayan kimerik yapıların oluşmasına yol açmaktadır. Bütün BCR-ABL kimerik genlerine katılan ABL1 için kırılma noktası 2. ekzon iken (a2), BCR genindeki kırılma noktaları farklı ekzonlarda oluşabilmektedir. BCR genindeki kırılmalar, major BCR (M-bcr), minor BCR (m-bcr) ve mikro BCR ( $\mu$ -bcr) olmak üzere üç bölgeden birinde oluşmaktadır. E13a2 (b2a2) ve e14a2 (b3a2) M-bcr transkriptlerini içeren translokasyon p210 proteinini, minör (m)-bcr bölgesinde meydana gelen translokasyonlar P190 proteinini kodlamaktadır. Ekzon 19 ve 20 arasında yer alan mikro ( $\mu$ )-bcr kırılma noktasından ise P230 füzyon proteini kodlanır ve daha nadir vakada karşımıza çıkmaktadır<sup>8</sup>.

M-bcr kırılma noktası pozisyonunun hastalık fenotipi ve prognozu üzerine etkisi uzun süredir tartışılmalara konu olmuştur. b3a2 transkriptinin, b2a2 transkriptinden daha kötü bir prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>10</sup>. Sharma ve arkadaşları, b2a2 transkriptli KML hastalarının, imatinib mesilat tedavisine, b3a2 transkript varyantı olanlara kıyasla daha yüksek yanıt verebileceğini öne sürmüştür<sup>11</sup>. Bunun nedeninin iki ana transkript (b2a2 ve b3a2) olarak ifade edilen BCR-ABL1 onkoproteininin, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında rol alan farklı sinyal yollarının aktivasyonunu teşvik etmesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının KML patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Önceki bir çalışmamızda KML hücre hattı BCR-ABL(+) K562 hücrelerinde, hematopoetik sistemde rol aldığını bildiğimiz Wnt ve Frizzled genlerinin ifade düzeylerini araştırdık<sup>12</sup>. Kemik iliğinden elde edilen K562 hücrelerinde, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt5b, Wnt10 ve Fzd 1-9'un ifade edildiğini saptadık. Wnt sinyal yolağında rol alan Wnt ve Fzd genlerinin BCR/ABL (+) hücre hattı olan diğer iki KU812 ve MEG01 hücre hatlarında ifade düzeyleri bilinmemektedir. Bu çalışmada MEG-01 ve KU812'deki Wnt ve Fzd genlerinin ifade düzeyleri belirlenerek, K562'deki ifade düzeyleri ile arasında bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. MEG-01, megakaryoblast hücre tipine sahip kemik iliğinden elde edilen bir hücre hattıdır (BCR-ABL, b2a2 füzyonu). KU812 hücre hattı ise, KML'nin blastik krizinde olan bir hastanın periferik kanından elde edilen bir hücre hattıdır (BCR-ABL, b3a2 füzyonu). KU812, bazofilik lökositlerin bazı özelliklerine sahiptir ve lenfoid belirteçler açısından da negatifdir<sup>13</sup>. K562 hücreleri ise eritrolösemik b3a2 füzyonuna

sahip bir KML hücre hattıdır. Literatürde her üç hücre hattı da KML hücre hattı olarak geçmekte ve farklı fenotipte blastik fazlara karşılık gelmektedir. Elde ettiğimiz veriler literatürde bu hücrelerde Wnt yolağı ve ilişkili genlerin ifadesinin gösterilmesi ile ilgili eksikliği tamamlamış, KML patogenezinin aydınlatılması ve ilaç direnci ile ilgili çalışmalarında hücre model sistemlerinin doğru kurgulanmasının önemini vurgulamaya çalışmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre kültürü

Kültürde süspanse olarak üreyen KU812 ve yarı yapışarak üreyen MEG-01 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI 1640 içerisinde üretildi. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda üretilen hücreler, ortalama 1.5 x 10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde sabitlenerek pasajlandı.

### Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücrelerden total RNA izolasyonu kit (Macherey-Nagel (MN) Nucleospin RNAII #740955250) kullanılarak yapıldı. İzolasyon yöntemi üretici firmanın kullanma kılavuzunda belirttiği şekilde gerçekleştirildi. İzolasyon aşamasında genomik DNA bulaşını tam olarak engellemek için, DNaseI ile

örnekler muamele edildi. İzole edilen total RNA'ların, konsantrasyonları spektrofotometrede (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) ölçüldü. A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> hesaplanarak RNA'nın saflık derecesinin 1.8-2.0 arasında olduğu saptandı.

Elde edilen total RNA'ların 2 µg 'ı, komplementer DNA (cDNA) eldesi reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. cDNA reaksiyonları "RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit" (Fermentas #K1622) ile gerçekleştirildi. Üretici firmanın belirttiği protokol uygulanarak cDNA'lar elde edildi.

### Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

KU812 ve MEG-01 hücrelerinde hedef genlerin ekspresyon desenlerinin belirlenmesi için PCR uygulaması gerçekleştirildi. Wnt ve Fzd geni için mRNA ekspresyon desenlerinin belirlenmesinde kullanılan PCR primer dizileri "Oligos 9.4" yazılımı kullanılarak dizayn edildi. Reaksiyonlar sırasında β-aktin geni iç kontrol olarak kullanıldı. Kullanılan PCR primerlerinin dizileri ve beklenen PCR büyüklükleri Tablo 1'de verilmiştir.

### İstatistiksel analiz

Çalışmada iki ayrı hücre hattında ilgilenilen 15 ayrı genin ekspresyonlarının varlığı ya da yokluğu analiz edilmiştir. Varyasyon olmadığı için istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

**Tablo 1. KU812 ve MEG-01 hücre hatlarında Wnt ve Frizzled genleri mRNA ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan primerler ve PCR büyüklükleri.**

Gen	Forward primer	Reverse primer	PCR ürünü
Fzd1	ACGGCGAACGGGGCATCTCC	TGGGGTGCCTTTGTCCGACG	407 bp
Fzd2	CCCTGCCCCGCTGCTGCTG	GTAGCGCAGGAGCTCCGTCC	474 bp
Fzd3	GTGTGTTTTGTCCGGCCTCTACG	ATGTGATACTCTCTGCAGCGTTC	313 bp
Fzd4	TGCCTTTTCAGGGCAAAGTG	ACAGGAAGAGATTTATGGAATG	400 bp
Fzd5	TACCCAGCCTGTCGCTAAAC	AAAACCGTCCAAAGATAAACTGC	248 bp
Fzd6	TTTTGGCATCCGATGGCCTG	CACACTGTTCAATFCCCAGAAAAC	209 bp
Fzd7	GTTTGGATGAAAAGATTTTCAGGC	GACCACTGCTTGACAAGCACC	294bp
Fzd8	ACAGTGTGATTGCTATTAGCATG	GTGAAATCTGTGTATCTGACTGC	268bp
Fzd9	CCCTAGAGACAGCTGACTAGCAG	CGGGGGTTTATTCCAGTCACAGC	263bp
Fzd10	ACACGTCCAACGCCAGCATG	ACGAGTCATGGGGTAGCCGATG	170 bp
Wnt2b	GGGGACTTTGACTGGGGTGG	AGTAGACAAGATCAGTCCGGGTG	365 bp
Wnt3	GGCACCAGGGCGCTGGGAAG	CATGTGCAAAGATAAGCCTCAGG	300 bp
Wnt5b	TTCTCTCCCTCTGGCGAGGAC	AGCCTGGTTCATGCACCTGG	550 bp
Wnt10a	TCTTCTACTGCTGCTGGCTG	ATGGCGATCTGGATGCCCTG	200 bp
β-Aktin	CTTCTGGGCATGGAGTCTCTG	GGAGCAATGATCTTGATCTTC	202 bp

## BULGULAR

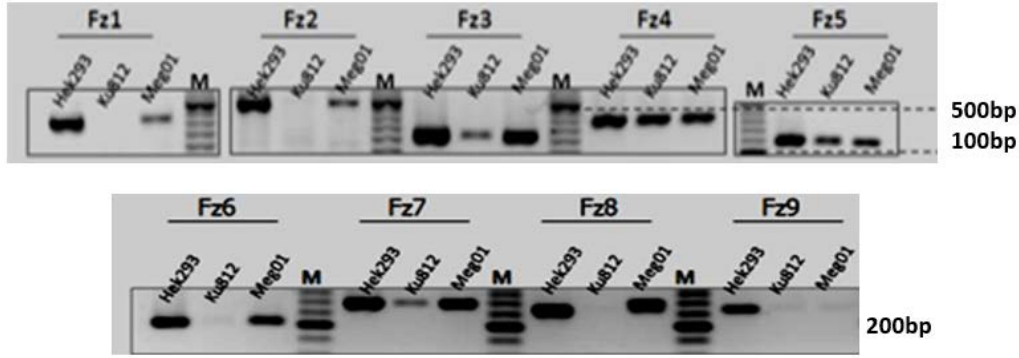
KU812 ve MEG-01'de W2b, W3, W3a, W5b, W10a ile 10 Fzd genlerinin ekspresyon desenleri PCR ile analiz edildi. KU812 ve MEG-01 hücre hatlarında ekspresyon profillerini belirlemek amacıyla kullanılan cDNA ürünleri, PCR çalışmalarından önce kalitesini kontrol etmek amacıyla  $\beta$ -aktin PCR primerleri ile çoğaltıldı. Wnt ve Frizzled gen ekspresyonlarının analizinde, gerçekleştirilen deneyler sonrasında PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

MEG-01 hücrelerinin Fzd10 hariç diğer Frizzled genlerini eksprese ettiği gösterildi. Bant varlığı, bu

genin düşük de olsa eksprese edildiği yönünde değerlendirildi. KU812 hücrelerinin ise, Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd9 ekspresyonu açısından pozitif olduğu izlendi. Fzd6 ve Fzd 9'da çok zayıf bir bant gözleendiği için pozitif olarak kabul edildi (Şekil 1).

KU812 ve MEG-01 hücre hatlarının Wnt genleri açısından PCR sonrası jel elektroforezi görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda KU812 ve MEG-01 hücrelerinden elde edilen PCR sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

MEG-01 hücreleri Wnt2b ve Wnt3 genlerini eksprese ederken KU812 hücreleri ise sadece Wnt3'ü eksprese etmektedir (Şekil 2).



Şekil 1. KU812 ve MEG-01 hücre hatlarında mRNA ekspresyonu pozitif çıkan Frizzled genlerinin PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. Hek293 hücre hattı reaksiyonlar için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (M=Marker: O' RangeRuler 50 bp DNA ladder -Thermo Scientific Kat. No: SM0613).

Tablo 2. KU812 ve MEG-01 hücre hatlarının Frizzled (A), Wnt (B) genleri için ekspresyon desenlerinin karşılaştırılması

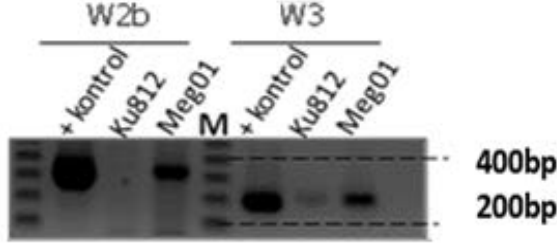
A.

	Fzd1	Fzd2	Fzd3	Fzd4	Fzd5	Fzd6	Fzd7	Fzd8	Fzd 9	Fzd10
KU812	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
MEG-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

B.

	W2b	W3	W3a	W5b	W10a
KU812	-	+	-	-	-
MEG-01	+	+	-	-	-

\* PCR sinyali zayıf olmakla beraber pozitif olarak kabul edildiler



Şekil 2. KU812 ve MEG-01 hücre hatlarında mRNA ekspresyonu pozitif olan Wnt genlerinin RT-PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. K562 hücre hattı reaksiyonlar için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (M=Marker: Step Ladder 50bp Sigma Kat No:S7025).

## TARTIŞMA

KML gelişiminde, LKH'lerin çoğalmasında Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının katkıda bulunduğu bilinmektedir. Wnt ligandının reseptörlerine bağlandıktan sonra,  $\beta$ -katenin fosforilasyonunu inhibe ederek sitoplazmik birikimini indüklemesi sonucu lösemik progenitörlerin genişlemesine neden olmaktadır<sup>14,15</sup>. Ancak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının hangi genler üzerinden KML'nin blastik transformasyonunda rol aldığı hala belirsizdir.

KML sürecinde Wnt sinyal iletiminde rol alan genler dinamik olarak düzenlenirler. 19 Wnt geninin ve 10 Frizzled geninin farklı kombinasyonlarda ilişkiye girmesi ve bu interaksiyon sonrasında farklı Wnt yollarının aktivasyonu, yolların karmaşıklığının ve dinamik olduğunun göstergesidir. Normal yetişkin kemik iliğinde T ve B lenfositleri ile bazı hematopoietik hücre hatlarındaki Wnt ve Fzd genlerinin ekspresyon profilleri incelendiğinde, Wnt sinyal iletiminde lösemik hücelere özgü gen ekspresyon farklılıklarının olduğu gösterilmiştir<sup>16</sup>.

Fonksiyonel çalışmalar yaparken model olarak seçtiğimiz aynı kliniği temsil eden farklı hücre hatları olabilmektedir. Örneğin K562, KU812 ve MEG-01 hücre hatları BCR-ABL (+) KML hücre hattı olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu üç hücre hattına doğal ve mutant bir BCR-ABL inhibitörü uygulandığında, BCR-ABL aracılı sinyal yollarında oluşan etkinin benzer olduğu, aynı şekilde hücre döngüsünün durması ve apoptoz açısından benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir<sup>17</sup>. Bu üç hücre hattı, her ne kadar KML blastik fazını temsil ediyor

ve hastalığa karşı kullanılan terapötiklere aynı yanıtları veriyor olsalar da bu hücre hatlarının araştırılan bazı gen veya protein ifadeleri açısından farklılıklar gösterdiği görülmüştür. KML'de progenitör hücrelerin genişleme, çoğalma ve hayatta kalma sürecinde önemli rol oynayan kimerik ABL geninin 177. lokalizasyondaki tirozin rezidüsünün (Y177) fosforilasyonunun, KU812 hücrelerinden farklı olarak K562 hücrelerinde önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>18,19</sup>. Yapılan farklı bir çalışmada platelet-eritroid ilişkili genlerin (B-globin, Ca2, B-TG, THBS1) ekspresyonları değerlendirildiğinde KU812 ve K562 hücreleri birbirlerine yakın ekspresyon profili gösterirken, MEG-01 hücrelerinde farklı bir ekspresyon profili sergilemişlerdir<sup>20</sup>.

Bu çalışmada KML sürecinde önemli rol oynadığı bilinen Frizzled ve Wnt genlerinin KML hücre hatlarındaki ifadeleri incelendiğinde, eritroblastoid, megakaryoblastik veya bazofilik özellik gösteren bu hücre hatlarında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Farklı kökenlerden elde edilen bu hücre hatları her ne kadar BCR/ABL (+) KML hücreyi temsil etse de farklı moleküler düzenlenmeler göstermektedirler. Bu nedenle daha önceki çalışmalarımızda kullandığımız KML hücre hattı K562'ye alternatif olan diğer hücre hatlarını incelediğimizde eritroblastoid olan K562 hücrelerinden farklı olarak bazofilik özellik gösteren KU812 ve megakaryoblastik özellik gösteren MEG-01 hücreleri farklı Wnt ve Fzd desenleri göstermişlerdir. K562 hücreleri, KU812 ve MEG-01 hücreleri ile kıyaslandığında bu iki hücre hattından farklı olarak Wnt2b, Wnt3a, Wnt5b ve Wnt10a genlerini de ifade etmektedir. Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd9, Fzd10 ve Wnt3 genleri açısından

her üç hücre hattı aynı ekspresyon profilini sergilerken, Fzd1, Fzd2, Fzd8, Wnt2b, Wnt3a, Wnt5b ve Wnt10a açısından farklılık göstermektedirler.

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları, BCR-ABL transkriptlerinin tipi açısından da farklılık göstermektedir. K562 ve KU812 b3a2 transkriptini kodlarken, MEG-01 b2a2 transkriptini kodlamaktadır. KML transkripti ile KML hasta özellikleri arasındaki ilişkiye ait veriler çelişkilidir. Balatzenko ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada BCR-ABL pozitif KML hastalarının ana klinik özelliklerini transkriptleri ile karşılaştırdıklarında, iki grup arasında anlamlı farklılık gösteren tek değişkenin b3a2 ifade eden hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olan trombosit sayısı olduğu gözlenmiştir<sup>9</sup>. Bununla birlikte farklı bir çalışmada, b3a2 hücrelerinin lösemik b2a2 progenitörlerinden daha kromozomal yanlış ayrışmaya (anöploidi) ve klonal evrime duyarlı olabileceği belirtilmiştir<sup>21</sup>. P230'u kodlayan e19a2 transkriptine sahip hastalar, sıklıkla belirgin nötrofilik olgunlaşma veya trombositoz ile başvururken, P190'u kodlayan e1a2 transkripti olan hastaların sıklıkla monositoz, bazofili yokluğu ve lenfoid blast fazına ilerleme eğilimi gösterdikleri bildirilmiştir<sup>22</sup>.

Çalışmamızda ise BCR/ABL (+) KML hücre hatları olan KU812, K562 ile aynı transkriptte sahipken, MEG-01 hücreleri farklı bir transkriptte sahiptir. Wnt sinyal yolağının majör oyuncuları olan Wnt ve Frizzled genleri arasında bulduğumuz ifade değişimlerinin nedeninin hücre orjinlerinin farklı hücrelerden oluşmalarından (eritroblastoid, megakaryoplast ve bazofil hücre tipine sahip), hücrenin elde edildiği kaynağın (kan, kemik iliği vb.) farklı olmasından ve füzyon bölgeleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği düşüncesindeyiz. Bununla birlikte hücre hattının elde edildiği kişinin yaşı, cinsiyeti, klinik özellikleri gibi değişkenlerde genlerin ifade düzeylerini etkilemektedir. Bu üç hücre hattı dışında, BCR/ABL (+) olan diğer hücre hatlarının da bu genler açısından taranması ve sonuçlarının değerlendirilmesi önemlidir, bu çalışmanın kısıtlılığını oluşturmaktadır.

Elde edilen veriler doğrultusunda KML hücre hattı olarak geçen KU812, MEG-01 ve K562 hücrelerinin Wnt sinyalinin majör proteinleri açısından farklı ifade düzeylerine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu nedenle bir hastalığı modelleyen farklı hücre hatlarının çalışmalarında kullanımı durumunda farklı deney sonuçları elde edilebilmektedir. Özellikle kanser gibi çoklu sinyal yollarının rol oynadığı süreçlerde, bu model hücre hatları arasındaki ifade farklılıklarının

saptanabilmesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenle bilimsel araştırma yapılırken hastalığı temsil eden birden fazla model hücre hattının kullanılması, olası gen ve protein ifade değişimlerinin birden fazla hücre hattı üzerinden araştırılması önerilmektedir. Elde ettiğimiz bulgular KML'nin patogenezi ile ilgili çalışmalarda model sistemlerin oluşturulmasına yardımcı olacak niteliktedir.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: MP, HOS; Veri toplama: MP, HOS; Veri analizi ve yorumlama: MP, HOS; Yazı taslağı: MP, HOS; İçerigin eleştirel incelenmesi: MP, HOS; Son onay ve sorumluluk: MP, HOS; Teknik ve malzeme desteği: MP, HOS; Süpervizyon: MP, HOS; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Bu çalışma "hücre veya doku kültürü çalışmaları" kapsamına girdiği için etik kurul belgesi alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Desteği:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Author Contributions:** Concept/Design : MP, HOS; Data acquisition: MP, HOS; Data analysis and interpretation: MP, HOS; Drafting manuscript: MP, HOS; Critical revision of manuscript: MP, HOS; Final approval and accountability: MP, HOS; Technical or material support: MP, HOS; Supervision: MP, HOS; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** Since this study is within the scope of "cell or tissue culture studies", an ethics committee certificate has not been obtained.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

## KAYNAKLAR

1. Jung YS, Park J II. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. *Exp Mol Med.* 2020;52:183–191.
2. Zhong Z, Virshup DM. Wnt signaling and drug resistance in cancer. *Mol Pharmacol.* 2020;97:72-89.
3. Van Andel H, Kocemba KA, Spaargaren M, Pals ST. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia.* 2019;33:1063-1075.
4. Flores-Hernández E, Velázquez DM, Castañeda-Patlán MC, Fuentes-García G, Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK et al. Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cell Signal.* 2020;72:109636.
5. Chiarini F, Paganelli F, Martelli AM, Evangelisti C. The role played by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1098.
6. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CRJ, Chen Z-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res.* 2010;34:1255-68.
7. Kleppe M, Levine RL. Targeting  $\beta$ -catenin in CML: Leukemia stem cells beware! *Cell Stem Cell.* 2012;10:351-353.
8. Hu LH, Pu LF, Yang DD, Zhang C, Wang HP, Ding YY et al. How to detect the rare BCR-ABL (e14a3)

- transcript: A case report and literature review. *Oncology Letters*. 2017;14:5619-5623.
9. Balatzenko G, Vundinti BR, Margarita G. Correlation between the type of bcr-abl transcripts and blood cell counts in chronic myeloid leukemia - a possible influence of MDR1 gene expression. *Hematol Rev*. 2011;3(1):e3.
  10. Farhat-Maghribi S, Habbal W, Monem F. Frequency of BCR-ABL transcript types in Syrian CML patients. *J Oncol*. 2016;1-5.
  11. Sharma P, Kumar L, Mohanty S, Kochupillai V. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. *Ann Hematol*. 2010;89:241-7.
  12. Sercan HO, Pehlivan M, Simsek O, Ates H, Sercan Z. Induction of apoptosis increases expression of non-canonical WNT genes in myeloid leukemia cell lines. *Oncol Rep*. 2007;18:1563-1569.
  13. KU812 (ATCC® CRL-2099™). <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2099.aspx>. (accessed Oct 2020).
  14. Grassi S, Palumbo S, Mariotti V, Liberati D, Guerrini F, Ciabatti E, et al. The WNT pathway is relevant for the BCR-ABL1-independent resistance in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol*. 2019;9:532.
  15. Hu J, Feng M, ZL L., Liu Y, ZL H, Li H et al. Potential role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in blastic transformation of chronic myeloid leukemia: cross talk between  $\beta$ -catenin and BCR-ABL. *Tumor Biology*. 2016;37:15859-15872.
  16. Sercan Z, Pehlivan M, Sercan HO. Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells. *Leuk Res*. 2010;34:946-9
  17. Liu F, Wang B, Wang Q, Qi Z, Chen C, Kong LL et al. Discovery and characterization of a novel potent type II native and mutant BCR-ABL inhibitor (CHMFL-074) for Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Oncotarget*. 2016;7:45562-45574.
  18. Peng Z, Luo HW, Yuan Y, Jing S, Huang SF, Li CL et al. Growth of chronic myeloid leukemia cells is inhibited by infection with Ad-SH2-HA adenovirus that disrupts Grb2-Bcr-Abl complexes. *Oncol Rep*. 2011;25:1381-8.
  19. Chu S, Li A, Singh H, Bhatia R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2007;67:7045-53.
  20. Sekikawa T, Iwase S, Saito S, Arakawa Y, Agawa M, Horiguchi-Yamada et al. JAS-R, a new megakaryo-erythroid leukemic cell line that secretes erythropoietin. *Anticancer Res*. 2006;26:843-50.
  21. Haaß W, Kleiner H, Weiß C, Haferlach C, Schlegelberger B, Müller MC et al. Clonal evolution and blast crisis correlate with enhanced proteolytic activity of Separase in BCR-ABL b3a2 fusion type CML under imatinib therapy. *PLoS One*. 2015;10:e0129648.
  22. Gong Z, Medeiros LJ, Cortes JE, Zheng L, Khoury JD, Wang W et al. Clinical and prognostic significance of e1a2 BCR-ABL1 transcript subtype in chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2017;m7:e583.