

## اختلال در مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوپیدی حاد در زمان تشخیص بیماری

علی قاسمی<sup>۱</sup>، دکتر محسن محمدی<sup>۲</sup>، عباس قوطاسلو<sup>۱</sup>، کاظم غفاری<sup>۳</sup>، صادق عباسیان<sup>۱</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** لوسمی میلوپیدی حاد (AML یا Acute myeloid leukemia) گروه هتروژنی از بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌باشند که عوامل زیادی در پاتوژنز آن‌ها دخیل هستند. در AML، تعداد زیادی از ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور مثل CDKN2B و p73 طی فرایند DNA متیلاسیون خاموش می‌شوند. پروتئین‌های WIF1 (Wnt inhibitory factor1) و DKK1 (Dickkopf1)، تنظیم‌کننده‌های منفی مسیر پیام‌رسانی Wnt می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** نمونه‌ی خون ۱۲۰ بیمار مبتلا به AML و ۳۰ فرد سالم به عنوان شاهد گرفته شد. DNA نمونه‌ها استخراج و با سدیم بی‌سولفید تیمار دارویی گردید. برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌ها، از تکنیک MSP (Methylation specific-polymerase chain reaction) با پرایمرهای اختصاصی برای توالی متیله و غیر متیله‌ی ژن‌های WIF1 و DKK1 استفاده شد.

**یافته‌ها:** درصد هایپرمتیلاسیون برای ژن‌های WIF1 و DKK1 به ترتیب ۳۵/۰ (۴۲/۱۲۰) و ۲۸/۳ (۳۴/۱۲۰) بود. در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ( $P = ۰/۰۰۳۰$ ) و ژن DKK1 ( $P = ۰/۰۰۵۰$ ) در بیماران با زیر گروه AML-M۰ مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که همانند بسیاری از تومورهای توپر، متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در AML نیز اتفاق می‌افتد. از این رو احتمال می‌رود که متیلاسیون این ژن‌ها در شروع بیماری نقش داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** متیلاسیون DNA، Wnt inhibitory factor 1، Dickkopf1، لوسمی حاد میلوبلاستیک

**ارجاع:** قاسمی علی، محمدی محسن، قوطاسلو عباس، غفاری کاظم، عباسیان صادق. اختلال در مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوپیدی حاد در زمان تشخیص بیماری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۶۶-۱۷۵۷

خون‌ساز، توقف بلوغ سلول‌ها در مرحله‌ی بلاست و مهاجرت بلاست‌ها از مغز استخوان به خون محیطی همراه است (۱). در پاتوژنز AML برخی از ناهنجاری‌ها از جمله تغییرات اپی‌ژنتیک و جابه‌جایی

### مقدمه

لوسمی حاد میلوپیدی (Acute myeloid leukemia یا AML) اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌باشد که با تکثیر مهار نشدنی سلول‌های بنیادی

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مربی، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

اولین بدخیمی هماتولوژیک که نقش مهم مسیر پیام‌رسانی Wnt در پاتوژنز آن مشاهده شد، لوسمی میلوییدی مزمن (Chronic myeloid leukemia یا CML) بود (۱۰). بتا کاتینین یک عامل رونویسی تنظیم کننده‌ی داخل سلولی است که با سرطان‌ها همراه است. Wnt سطح سیتوپلاسمی و پایداری بتا کاتینین را کنترل می‌کند (۱۱). در غیاب لیگاند Wnt و نقش محافظتی آن، سطح بتا کاتینین به دلیل تخریب توسط آنزیم‌های کازئین کیناز ۱ و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳، کاهش می‌یابد (۱۲). اما زمانی که لیگاند به گیرنده‌ی خود یعنی گیرنده‌ی فریزلد (Frizzled receptor) متصل شود، باعث فعال شدن پروتئین DV1 (Dishevelled) می‌گردد (۱۳). زمانی که پیام‌رسانی Wnt توسط پروتئین DKK1 سرکوب می‌شود، بتا کاتینین فسفریله می‌گردد و در پی آن، یوبی کوئینه و تجزیه می‌شود (۷).

تجمع سیتوپلاسمی بتا کاتینین منجر به انتقال آن به داخل هسته می‌شود و سبب بیان برخی از ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلولی می‌شود (۹، ۱۴). در سال‌های اخیر، مشاهده شده است که هر دو عامل تغییرات کروموزومی و جهش FLT3 مرتبط با پاتوژنز AML در مسیر پیام‌رسانی Wnt نیز دخیل می‌باشند (۱۵). متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 باعث کاهش اثر مهاری بر روی مسیر Wnt می‌شود. سطح سیتوپلاسمی و هسته‌ای بتا کاتینین باعث تقویت عوامل رونویسی می‌گردد که سبب بیان برخی از ژن‌های دخیل در تنظیم چرخه‌ی سلولی از جمله myc، cox و Cyclin D می‌گردد (۱۶). بنابراین متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است نقش آغازگر در لوکموژنز AML را داشته باشد. در مطالعه‌ی حاضر،

کروموزومی مشخص شده است. پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات گسترده‌ی مولکولی، کمک زیادی در چگونگی تشخیص AML می‌کند. در AML، تعداد زیادی از ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور مثل CDKN2B و p73 توسط فرایند DNA متیلاسیون خاموش می‌شوند (۲). اختلالات اپی ژنتیکی در مقایسه با تغییرات ژنتیکی برگشت‌پذیر هستند و توسط عوامل دمتیله کننده‌ی DNA از جمله AZA و ۵-آزا-۲-داکسی سائتیدین که در درمان بدخیمی‌های خونی نقش دارند، درمان می‌شوند (۳-۶).

علاوه بر سن، شمارش گلبول‌های سفید و سیتوژنتیک، بررسی تغییرات ژنتیکی از جمله جهش ژن‌های NPM1 (نوکلئوفوسمین)، FLT3 و WT1 (Wilms tumor 1) نیز از جمله عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مهم AML می‌باشند. در سال‌های اخیر، اختلالات اپی ژنتیکی شامل متیلاسیون ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور مانند ژن‌های WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) و DKK1 (Dickkopf-1) نقش مهمی در پاتوژنز AML ایفا می‌کنند. این تغییرات، منجر به ممانعت از آپوپتوز و تمایز سلول‌های بلاست، افزایش تکثیر و خود نوسازی سلول‌های بلاست می‌شود (۷). پروتئین‌های WIF1 و DKK1 آنتاگونیست Wnt هستند که باعث سرکوب مسیر پیام‌رسانی Wnt در افراد سالم می‌شوند (۸). مسیر پیام‌رسانی Wnt در تمایز و تکثیر سلول‌ها نقش تنظیمی را بر عهده دارد. در برخی از بدخیمی‌ها از جمله سرطان کولورکتال، تومورهای سر و گردن و سرطان معده، بر اثر فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt، تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌ها مشاهده شده است (۹).

وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

نمونه‌ی خون ۱۲۰ بیمار مبتلا به AML در زمان تشخیص و ۳۰ نمونه از افراد سالم به عنوان شاهد منفی گرفته شد. تمام بیماران توسط رده‌بندی FAB (French-American-British) گروه‌بندی شدند. شاخص‌های بالینی شامل شمارش گلبول سفید، پلاکت، سن، هموگلوبین و میزان بهبودی بعد از شیمی درمانی القایی، از پرونده‌های پزشکی بیماران استخراج گردید. سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه‌های گرفته شده شامل سلول‌های بلاست لوسمیک با روش سدیممتاسیون گرادیان غلظت با استفاده از محلول Ficoll-hypaque جدا و در ادامه، DNA با روش استاندارد نمک اشباع تخلیص شد (۱۷).

در مرحله‌ی بعد، DNA استخراج شده به وسیله‌ی کیت (Epitect Bisulfite kit, Qiagen) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شد. بعد از تیمار، بازهای سیتوزین غیر متیله به باز اوراسیل تبدیل می‌شوند، در حالی که بازهای سیتوزین متیله دست نخورده باقی می‌مانند. سپس وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با استفاده از تکنیک MSP (Methylation specific polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت. MSP یک نوع PCR است که به بررسی متیلاسیون جزایر CpG می‌پردازد.

در این روش، از ۲ جفت پرایمر اختصاصی برای بررسی توالی متیله و غیر متیله استفاده شد. توالی‌های پرایمر اختصاصی که برای ژن DKK1 متیله استفاده

شد، شامل پرایمر مستقیم با توالی ۳'-CGGAATGTTTCGGGTTTCGC-۵' و پرایمر معکوس ۳'-CACGAAACCGTACCGATTTCG-۵' و برای ژن DKK1 غیر متیله پرایمر مستقیم با توالی ۳'-GTTGGAATGTTTTGGGTTTGT-۵' و پرایمر معکوس ۳'-CCACAAAACCATAACCAATTCA-۵' بود. توالی‌های پرایمر اختصاصی که برای ژن WIF1 متیله استفاده شد، شامل پرایمر مستقیم با توالی ۳'-ATTTAGGTCGGGAGGCGACGC-۵' و پرایمر معکوس ۳'-GACCTCCGCCCGCAATACCAA-۵' و برای ژن DKK1 غیر متیله پرایمر مستقیم با توالی ۳'-TGGTATTTAGGTTGGGAGGTGATGT-۵' و پرایمر معکوس ۳'-AACCTCCACCCACAATACCAA-۵' بود.

در واکنش MSP برای هر بیمار، ۴ واکنش با پرایمرهای متیله و غیر متیله مرتبط با ژن‌های WIF1 و DKK1 مورد بررسی قرار گرفت. برای وضعیت متیله از ۲ μl DNA که از قبل با بی‌سولفیت مجاور گشته بود، ۴ μl DH<sub>2</sub>O، ۱۲ μl Master mix، ۰/۵ μl پرایمر Forward و ۰/۵ μl پرایمر Reverse استفاده شد. در حالی که برای بررسی وضعیت غیر متیله، از ۲ μl DNA، ۷/۵ μl DH<sub>2</sub>O، ۱۲ μl Master mix، ۰/۵ μl پرایمر Forward، ۰/۵ μl پرایمر Reverse و ۰/۵ μl MgCl<sub>2</sub> استفاده گردید. در ابتدا اجزای واکنش MSP تحت شرایط پیش دمایی که شامل ۹۹ °C به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه بود، قرار گرفت. سپس این واکنش توسط ۳۵ سیکل که شامل ۹۹ °C برای ۱۰ ثانیه، ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه،

(۳۸/۳ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۲). در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد منفی که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 مشاهده نشد. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با علایم آزمایشگاهی و بالینی بیماران در جدول ۱ آمده است.

P1		P2		P3		P4	
M	U	M	U	M	U	M	U



C1		C2		C3		C4		C5	
U	M	U	M	U	M	U	M	U	M

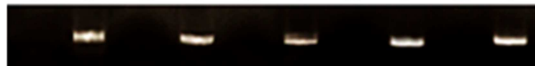


شکل ۱. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن WIF1 در تعدادی از بیماران AML (Acute myeloid leukemia) و نمونه‌های شاهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نمونه‌های افراد سالم به عنوان شاهد منفی با هیچ کدام از پرایمرهای متیله باند نداده است. شاهد مثبت = PC؛ شاهد منفی = NC؛ بیمار = P؛ متیله = M؛ غیر متیله = U

P1		P2		P3		P4	
U	M	U	M	U	M	U	M



C1		C2		C3		C4		C5	
M	U	M	U	M	U	M	U	M	U



شکل ۲. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن DKK1 در تعدادی از بیماران AML (Acute myeloid leukemia) و نمونه‌های شاهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نمونه‌های افراد سالم به عنوان شاهد منفی با هیچ کدام از پرایمرهای متیله باند نداده است. شاهد مثبت = PC؛ شاهد منفی = NC؛ بیمار = P؛ متیله = M؛ غیر متیله = U

۵۸ °C برای ۳۰ ثانیه (WIF1-UM Primer)، ۶۲ °C برای ۳۰ ثانیه (WIF1 and DKK1-M Primer) و ۷۰ °C برای ۵ دقیقه (Extension) بود، دنبال شد. در این مطالعه، از کیت تجاری EpiTect PCR (Qiagen Inc cat No.۵۹۶۹۵) که حاوی DNA غیر متیله و DNA متیله بود، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده گردید. به منظور تأیید محصول MSP، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳ درصد انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Fisher's exact و Mann-Whitney و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.  $P < 0/050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

از ۱۲۰ بیمار مورد مطالعه، ۷۸ نفر (۶۵ درصد) مرد و ۴۲ نفر (۳۵ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران بین ۱۵-۷۲ سال و میانگین سنی آن‌ها ۴۵ سال بود. شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به ترتیب ۱۴۵۰۰۰-۶۰۰۰ و ۲۸۰۰۰۰-۲۰۰۰۰ و میانگین آن‌ها به ترتیب ۲۷۸۱۸/۵ و ۹۸۶۳۳/۳ سلول در هر میکرولیتر بود.

برای ژن WIF1، ۴۵ مورد از بیماران (۳۷/۵ درصد) به صورت همی‌متیله، ۴۲ مورد (۳۵ درصد) به طور کامل متیله و ۳۷ مورد (۳۰/۸ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۱). در حالی که برای ژن DKK1، ۴۰ مورد (۳۳/۳ درصد) به صورت همی‌متیله، ۳۴ مورد (۲۸/۳ درصد) به طور کامل متیله و ۴۶ مورد

ژن WIF1 و ۳ بیمار (۸/۸۲ درصد) برای ژن DKK1 هایپرمتیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با عود بیماران مشاهده نشد (به ترتیب  $P = 0/149$  و  $P = 0/552$ ). همچنین اطلاعات مربوط به شیمی درمانی ۱۰۹ بیمار (۹۰/۸ درصد) درمان شده موجود بود. از این تعداد، ۹۵ بیمار (۷۹/۱ درصد) پس از شیمی درمانی دچار بهبودی کامل شدند که از این تعداد، به ترتیب ۳۰ و ۲۴ بیمار برای ژن‌های WIF1 و DKK1 هایپرمتیله بودند (به ترتیب  $P = 0/143$  و  $P = 0/211$ ). ۳۳ بیمار (۲۷/۵ درصد) به شیمی درمانی القایی مقاوم بودند، که از این تعداد، به ترتیب ۱۴ و ۹ بیمار برای ژن‌های WIF1 و DKK1 هایپرمتیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بین بیماران با و بدون متیلاسیون و بهبودی کامل پس از شیمی درمانی مشاهده نگردید.

در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص فراوانی هایپرمتیلاسیون دو ژن WIF1 و DKK1 به ترتیب ۳۵ درصد (۴۲ نفر از ۱۲۰ بیمار) و ۲۸/۳ درصد (۳۴ نفر از ۱۲۰ بیمار) بود. همچنین ۲۹/۱ درصد بیماران (۳۵ نفر از ۱۲۰ بیمار) در زمان تشخیص برای ژن‌های WIF1 و DKK1 متیله بودند (جدول ۱). متیلاسیون نابه‌جای این ژن‌ها در تمام زیر گروه‌های FAB-AML مشاهده شد. بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 ( $P = 0/003$ ) و DKK1 ( $P = 0/005$ ) در ارتباط با زیر گروه FAB-M و AML-M مشاهده شد (جدول ۱). هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با شاخص‌های بالینی بیماران شامل جنس، سن، شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت مشاهده نشد (جدول ۱). تعداد ۱۶ نفر از ۱۲۰ بیمار دچار عود شده بودند که از این بین، ۷ بیمار (۱۶/۶ درصد) برای

جدول ۱. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های WIF1 و DKK1 با علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماران AML (Acute myeloid leukemia)

مقدار P	Dkk1 (Dickkopf)		مقدار P	Wif1 (Wnt inhibitory factor)		خصوصیات
	غیر متیله	متیله		غیر متیله	متیله	
	۸۶ (۷۱/۶)	۳۴ (۲۸/۳)		۷۸ (۶۵)	۴۲ (۳۵)	تعداد بیماران (درصد)
۰/۷۸۱	۴۲/۵ (۱۷-۶۸)	۴۳ (۲۲-۶۴)	۰/۲۸۵	۳۹ (۱۸-۶۰)	۴۲/۵ (۲۲-۶۳)	متوسط سن (محدوده‌ی سنی)
۰/۵۷۷	۶۵	۲۵	۰/۲۱۷	۴۸	۳۰	جنس (درصد)
	۲۱	۹		۳۰	۱۲	مرد زن
۰/۲۰۱	۱۳/۲	۶۴/۱	۰/۲۷۸	۲۹/۶	۱۴/۵	میانگین شمارش گلبول‌های سفید ( $10^9/l$ )
۰/۳۸۸	۱۲۸	۹۱	۰/۶۹۴	۱۰۲	۱۱۵/۴	میانگین شمارش پلاکت ( $10^9/l$ )
۰/۱۸۵	۸/۹	۸/۳	۰/۲۸۰	۸/۷	۸/۳	میانگین طیف هموگلوبین (g/dl)
۰/۰۰۵	۳ (۳/۴)	۷ (۲۰/۵)	۰/۰۰۳	۲ (۲/۵)	۸ (۱۹/۰)	گروه‌بندی FAB، تعداد
۰/۹۹۹	۱۹ (۲۲)	۷ (۲۰/۵)	۰/۸۱۷	۱۶ (۲۰/۵)	۱۰ (۲۳/۸)	M۰ M۱ M۲ M۴ M۵ M۶ (درصد)
۰/۱۷۸	۲۶ (۳۰/۲)	۶ (۱۷/۶)	۰/۵۲۵	۲۲ (۲۸/۲)	۱۰ (۲۳/۸)	
۰/۳۰۳	۱۸ (۲۰/۹)	۴ (۱۱/۷)	۰/۴۶۶	۱۶ (۲۰/۵)	۶ (۱۴/۲)	
۰/۰۹۴	۱۶ (۱۸/۶)	۲ (۵/۸)	۰/۲۸۸	۱۴ (۱۷/۹)	۴ (۹/۵)	
۰/۵۰۶	۱۰ (۱۱/۶)	۲ (۵/۸)	۰/۵۳۸	۹ (۱۱/۵)	۳ (۷/۱)	
۰/۲۱۱	۷۱ (۸۲/۵)	۲۴ (۷۰/۵)	۰/۱۴۳	۶۵ (۸۳/۳)	۳۰ (۷۱/۴)	وضعیت بیماران، تعداد
۰/۹۹۹	۴ (۴/۶)	۱ (۲/۹)	۰/۱۳۷	۲ (۲/۵)	۳ (۷/۱)	بهبودی کامل مرگ (درصد)
۰/۵۵۲	۱۳ (۱۵/۱)	۳ (۸/۸)	۰/۱۴۹	۹ (۱۱/۵)	۷ (۱۶/۶)	عود

FAB: French-American-British

## بحث

مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در بسیاری از فرایندها از جمله مورفولوژی، حرکت، تکثیر، تعیین سرنوشت سلول‌ها و تکامل ارگانل‌ها دخالت دارد. درک نقش مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز، باعث به وجود آمدن این فرضیه شده است که اختلال در این مسیر پیام‌رسانی، امکان دارد در پاتوژنز لوسمی‌ها نقش داشته باشد (۲۰-۱۸). WIF1 و DKK1 پروتئین‌های سرکوب‌کننده‌ی توموری هستند که تعدیل‌کننده‌ی مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin می‌باشند. این پروتئین‌ها با اتصال به پروتئین Wnt مانع از اتصال آن به گیرنده‌ی Wnt می‌شوند. در نتیجه، سبب غیر فعال شدن مسیر پیام‌رسانی Wnt می‌گردند. از این رو، ممکن است ارتباطی بین متیلاسیون ژن‌های آنتاگونیست مسیر پیام‌رسانی Wnt و فعال شدن این مسیر در تومورهای توپر و لوسمی‌ها وجود داشته باشد (۲۰-۱۹). متیلاسیون نابه‌جای ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور، یکی از اختصاصی‌ترین و رایج‌ترین حوادث ژنتیکی در اکثر سرطان‌های انسانی می‌باشد (۲۲-۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 به ترتیب با فراوانی ۳۵ درصد (۴۲ نفر از ۱۲۰ بیمار) و ۲۸/۳ درصد (۳۴ نفر از ۱۲۰ بیمار) در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص بیماری اتفاق می‌افتد. در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های شاهد منفی، متیلاسیون این ژن‌ها مشاهده

نگردید. متیلاسیون مهارکننده‌های دیگر مسیر پیام‌رسانی Wnt مانند متیلاسیون ژن‌های SFRP (Secreted frizzled-related protein)، در بعضی بدخیمی‌ها از جمله در AML دیده شده است (۲۳). Yu و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که متیلاسیون پروموتور ژن DKK1 به عنوان آنتاگونیست مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin، در ارتباط با پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌باشد (۲۴). اختلالات اپی‌ژنتیکی در مقایسه با تغییرات ژنتیکی برگشت‌پذیر هستند و توسط عوامل دمتیله‌کننده‌ی DNA از جمله AZA و ۵-آزا-۲-داکسی‌سایتیدین که در درمان بدخیمی‌های خونی نقش دارند، درمان می‌شوند (۶-۳). Cooper و همکاران بعد از تحقیقاتشان پیشنهاد کردند که SFRP نوترکیب، ممکن است یک استراتژی درمانی جدیدی برای سرطان‌هایی باشد که بیان SFRP (یکی دیگر از مهارکننده‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt) در آن‌ها مهار شده است (۲۵). ژن DKK1 بر روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد، که تمایز رده‌های سلولی سرطانی انسان و انواع زیادی از سرطان‌های انسانی از جمله کارسینومای سلول بزرگ ریه (۲۷-۲۶)، کارسینومای سلول کلیوی انسان (۲۶) و لوسمی لنفوبلاستیک حاد (۲۸) را سرکوب می‌کند. همچنین ممکن است به عنوان یک ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور مطرح باشد. درصد بیماران با متیلاسیون نابه‌جا برای ژن‌های WIF1 و DKK1 در این مطالعه ۸۷ بیمار (۷۲/۵ درصد) برای WIF1 و ۷۴ بیمار (۶۱/۶ درصد) برای DKK1 مشاهده گردید. بنابراین متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است از طریق تنظیم کاهشی مسیر پیام‌رسانی Wnt، در شروع AML دخالت داشته باشد. از طرف

بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ۸۰ درصد ( $P = ۰/۰۰۳۰$ ) و ژن DKK1 ۷۰ درصد ( $P = ۰/۰۰۵۰$ ) می‌باشد. در حالی که در زیر گروه AML-M۵ کمترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ۲۲/۲ درصد ( $P = ۰/۲۲۸۰$ ) و ژن DKK1 ۱۱/۱۱ درصد ( $P = ۰/۰۹۴۰$ ) اتفاق می‌افتد.

Hou و همکاران پیشنهاد کردند که فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن DKK1 به همراه هایپرمتیلاسیون خانواده‌ی SFRP اتفاق می‌افتد ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). در حالی که با WIF1 همراه نیست ( $P = ۰/۷۶۴۰$ ) (۳۱). در این مطالعه، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 و عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مرسوم مانند سن و شمارش گلبول‌های سفید در بیماران AML مشاهده نشد. همچنین هیچ ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون این ژن‌ها و دیگر شاخصه‌های بالینی بیماران مانند جنس، شمارش پلاکت و هموگلوبین مشاهده نگردید. این امر ممکن است مرتبط با افزایش اندازه‌ی نمونه‌ها باشد. در بین ۱۲۰ بیمار، پس از شیمی درمانی القایی در ۹۵ بیمار (۷۹/۱ درصد) بهبودی کامل مشاهده شده بود. بهبودی کامل به حضور کمتر از ۵ درصد بلاست در مغز استخوان و تصحیح شمارش سلول‌های خونی (شمارش نوتروفیل بیشتر از ۱۰۰۰ سلول در میکرولیتر، شمارش پلاکت بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ سلول در میکرولیتر، هموگلوبین بیشتر از ۱۰ g/dl و عدم حضور بلاست در خون محیطی) اطلاق می‌شود. همچنین سلولاریته‌ی بیش از ۲۰ درصد مغز استخوان با شواهدی از خون‌سازی هر سه رده‌ی سلولی، باید وجود داشته باشد (۳۲).

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری

دیگر، Suzuki و همکاران یک ارتباط احتمالی بین کاهش بقا و هایپرمتیلاسیون پروموتور DKK1 پیشنهاد کردند (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 (به ترتیب ۳۵ درصد و ۲۸/۳ درصد، در کل ۶۳/۳ درصد) مشاهده گردید که بیشتر از گزارش Griffiths و همکاران (به ترتیب ۳۲ درصد و ۱۶ درصد، در کل ۴۸ درصد) (۳۰) و گزارش Hou و همکاران (به ترتیب ۲۶ درصد و ۳۰/۱ درصد، در کل ۵۶/۱ درصد) بود (۳۱). این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت در انتخاب بیمار و تنوع نژادی بیماران باشد. مطالعه‌ی حاضر نیز همانند مطالعات دیگر نشان داد که ژن‌های WIF1 و DKK1 از اهداف تعدیل‌کننده‌ی ژنتیکی در بیماران AML هستند که به دنبال متیلاسیون غیر فعال می‌گردند.

Hou و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که بیشترین هایپرمتیلاسیون مهارکننده‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt در AML با زیر گروه M۰ (۱۰۰ درصد) رخ می‌دهد، در حالی که کمترین هایپرمتیلاسیون (۴۸/۳ درصد با  $P = ۰/۰۰۰۶$ ) در زیر گروه M۴/M۵ اتفاق می‌افتد (۳۱). همچنین Hou و همکاران گزارش کردند که متیلاسیون ژن DKK1 در زیر گروه AML-M۰ شایع‌تر (۷۵ درصد با  $P = ۰/۰۱۰۵$ ) و متیلاسیون ژن WIF1 بیشتر در زیر گروه M۱ ( $P = ۰/۰۰۳۵$ ) (به ترتیب ۴۲/۱ درصد با  $P = ۰/۰۰۰۵$ ) اتفاق می‌افتد (۳۱). مطالعه‌ی حاضر نشان داد که متیلاسیون نابه‌جای این ژن‌ها در تمام زیر گروه‌های FAB-AML شامل M۰، M۱، M۲، M۴، M۵ و M۶ اتفاق می‌افتد. در بیماران با زیر گروه AML-M۰



مطالعات بیشتری با تعداد نمونه‌های مبتلا به AML بیشتر برای تثبیت این نظر نیاز است. به طور خلاصه، این مطالعه نشان داد که متیلاسیون جزایر CpG ژن‌های WIF1 و DKK1 یک پدیده‌ی شایع در بیماران AML است و مطالعه‌ی آنتاگونیست‌های دیگر مسیر پیام‌رسانی Wnt توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌ی اجرای این مطالعه را تأمین نمود، قدردانی می‌گردد.

بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 و بهبودی کامل پس از شیمی‌درمانی القایی مشاهده نگردید و پاسخ به درمان در بیماران با و بدون هایپرمتیلاسیون یکسان بود. اگر چه Chim و همکاران (۳۳) نشان دادند که متیلاسیون WIF1 یک عامل غیر وابسته‌ی پیش‌آگهی دهنده‌ی ضعیف برای DFS (Disease-free survival) می‌باشد، Valencia و همکاران (۳۴) نشان دادند که بیماران مبتلا به AML با داشتن چند ژن متیله‌ی مهار کننده‌ی Wnt، دارای پیش‌آگهی ضعیف‌تر RFS (Relapse-free survival) هستند.

### References

- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14): 1051-62.
- Galm O, Herman JG. Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* 2005; 113: 279-91.
- Gilbert J, Gore SD, Herman JG, Carducci MA. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14): 4589-96.
- Claus R, Almstedt M, Lubbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 2005; 32(5): 511-20.
- Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109(1): 52-7.
- Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(8): 1472-81.
- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25(29): 4116-21.
- Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. Cancer incidence in five continents. Volume VIII. *IARC Sci Publ* 2002; (155): 1-781.
- Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 142(5): 745-53.
- Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 387-98.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7): 657-67.
- Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasia* 2008; 55(3): 165-76.
- Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 2002; 24(9): 811-20.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
- Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7081-5.
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 2008;



- 121(Pt 6): 737-46.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
  18. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, et al. Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2007; 7: 126.
  19. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 55-67.
  20. Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(8): 1638-47.
  21. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
  22. Nakamoto D, Yamamoto N, Takagi R, Katakura A, Mizoe JE, Shibahara T. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of malignant mucosal melanoma using whole genome amplification. *Bull Tokyo Dent Coll* 2008; 49(2): 77-87.
  23. Ghasemi A, Nadali F, Chahardouli B, Alizad Ghandforosh N, Ghavamzadeh A, Rostami Sh. Study of correlation between SFRP-1 and SFRP-2 hypermethylation with relapse, complete remission, genetic mutations of FLT3-ITD and NPM1 and immunophenotypes of leukemic cells in patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J Hematol* 2014; 3(2): 34-42.
  24. Yu J, Tao Q, Cheng YY, Lee KY, Ng SS, Cheung KF, et al. Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer. *Cancer* 2009; 115(1): 49-60.
  25. Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, et al. Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(10): 2105-15.
  26. Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, et al. Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171(3): 1314-8.
  27. Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001; 19(1): 117-21.
  28. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, et al. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 2004; 91(4): 707-13.
  29. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Fukagawa S, Tsuboi K, et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138(5): 624-31.
  30. Griffiths EA, Gore SD, Hooker C, McDevitt MA, Karp JE, Smith BD, et al. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma* 2010; 51(9): 1711-9.
  31. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, et al. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2011; 105(12): 1927-33.
  32. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(3): 197-222.
  33. Chim CS, Chan WW, Pang A, Kwong YL. Preferential methylation of Wnt inhibitory factor-1 in acute promyelocytic leukemia: an independent poor prognostic factor. *Leukemia* 2006; 20(5): 907-9.
  34. Valencia A, Roman-Gomez J, Cervera J, Such E, Barragan E, Bolufer P, et al. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23(9): 1658-66.

## Dysregulation of the Wnt Signaling Pathway through Methylation of WIF1 and DKK1 Genes in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at the Time of Diagnosis

Ali Ghasemi MSc<sup>1</sup>, Mohsen Mohammadi PhD<sup>2</sup>, Abbas Ghotaslou MSc<sup>1</sup>,  
Kazem Ghaffari MSc<sup>3</sup>, Sadegh Abbasian MSc<sup>1</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** In acute myeloid leukemia (AML), a large number of tumor suppressor genes are silenced through DNA methylation such as CDKN2B and p73. Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) and Dickkopf-1 (DKK-1) are negative regulator of the Wnt signaling pathway. In the present study, we studied the methylation status of WIF1 and DKK-1 genes in patients with acute myeloid leukemia.

**Methods:** Blood samples from 120 patients with acute myeloid leukemia and 25 healthy control subjects were taken. Isolated DNA was treated with sodium bisulphite and examined via methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with primers specific for methylated and unmethylated sequences of the WIF1 and DKK-1 genes.

**Findings:** The frequency of aberrant hypermethylation of WIF1 and DKK-1 genes in patients with acute myeloid leukemia was determined 35.0% (42/120) and 28.3% (34/120), respectively. In addition, for all subjects in control group, methylation of WIF1 and DKK-1 genes were negative. Patients with M0 subtype of French-American-British acute myeloid leukemia (FAB-AML) had the highest incidence of hypermethylation of WIF1 (P = 0.003) and DKK-1 (P = 0.005) genes.

**Conclusion:** The present study showed that, like many solid tumors, WIF1 and DKK-1 genes methylation also occurs in acute myeloid leukemia. Therefore, the methylation of these genes may play a role in leukemogenesis initiation.

**Keywords:** DNA Methylation, WIF1, DKK, Acute myeloid leukemia

**Citation:** Ghasemi A, Mohammadi M, Ghotaslou A, Ghaffari K, Abbasian S. **Dysregulation of the Wnt Signaling Pathway through Methylation of WIF1 and DKK1 Genes in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at the Time of Diagnosis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1757-66

1- Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Department of Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Instructor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

**Corresponding Author:** Ali Ghasemi MSc, Email: a.qasemi2012@yahoo.com