급성 백혈병 세포에서의
Akt 발현과 그 임상적 의미

연세대학교 대학원

의학과

맹 호 영

급성 백혈병 세포에서의
Akt 발현과 그 임상적 의미

지도 민 유 홍 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원
의학과
맹 호 영

맹호영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

맨 먼저 논문을 완성할 수 있도록 모든 여건을 허락하신 하나님께 감사 드립니다. 미숙한 저를 구체적인 지도와 조언으로 격려하여 주신 민유홍 교수님, 부족한 점이 많음에도 불구하고 너그럽게 지켜보아 주신 김주항 교수님과 양우익 교수님께 깊이 감사 드립니다. 혈액학에 관심을 가질 수 있도록 지도해 주신 고윤웅 교수님, 한지숙 교수님께 존경과 감사를 드립니다. 부족한 후배를 기쁜 마음으로 이끌어 주신 장준호, 서형찬, 김진석, 정준원 선생님, 실험에 낯선 제가 무사히 결과를 얻을 수 있도록 도와주신 혈액 내과 검사실의 유종호, 최미라 선생님, 그리고 실험실의 이광훈, 장엔지, 김지연, 정회경, 엄주인 선생님께 감사드립니다.

늘 기도로 도와주시는 소중한 부모님과 가족, 특히 사랑하는 남편이자 인생과 학문의 선배로 어려운 일마다 늘 자신의 일처럼 도와 주고 세심하게 가르쳐 준 이승태 선생님께 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문요약

급성 백혈병 세포에서의 Akt 발현과 그 임상적 의미

최근 세포고사가 암세포 발생과 사멸에 근본적인 역할을 하는 것으로 알려져 이에 대한 연구가 활발하게 이루어 지고 있다. 그 중에서도 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 경로의 활성화는 세포고사에 작용하는 여러가지 신호전달체계 관련 단백의 인산화를 통해 그 활성도를 조절하여 세포사멸에 반대되는 방향으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 특히 Akt가 암세포의 무한생존에 관여할 것으로 여러 고형 악성 종양에서 연구된 바 있으나 급성 백혈병 세포에서의 상태는 연구 된 바 없고 이미 발표된 고형 종양 세포에서도 이의 임상적 경과와의 관계에 대해서는 알려진 바 없어 저자는 급성 백혈병 환자에서의 Akt의 발현 여부 및 빈도와 Akt 발현 환자군의 임상적 특성을 알아보고자 하였다.

대상 환자는 세브란스 병원 혈액종양내과에서 급성 림프구성 백혈병 혹은 급성 골수성 백혈병으로 처음 진단 받은 성인 43명으로 진단 당시의 골수 세포를 사용하였으며 정상 골수 세포와 비교하여 Akt, phospho-Akt (S473), phospho-Akt (Thr308)의 단클론항체를 이용하여 분석하고, Akt 발현군과 비발현군 간의 진단 당시의 골수 및 혈액 검사, 생존 기간 등의 임상 자료를 비교하였다.

전체 대상 급성 백혈병 환자 43예 중 27예인 63%에서 Akt 발현을 보였는데 phospho-Akt (Thr308)과 phospho-Akt (Ser473)은 각각 58% 및 56%에서 발현을 관찰할 수 있었다. Akt 발현군을 보이는 환자군의 진단 당시 말초 혈액 백혈구 수치는 Akt 비발현군에 비해 의미 있게 높았으며 (P=0.008), phospho-Akt (Ser473)을 발현하는

환자에서도 같은 결과를 얻었다 (P=0.003). 진단 당시의 성별이나 나이, 급성 백혈병의 조직아형, 말초 혈액 중의 미숙세포 분율, LDH, 골수 충실도, 중추신경계 침범 여부에 있어서 Akt 발현군과 비발현군 간에 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다.

급성 백혈병 세포의 염색체의 이상을 예후에 따라 분류하였을 때 Akt 발현군은 좋은 예후를 보이는 염색체 이상과 관련된 경우는 한 예도 없었고 평균 정도의 예후나 나쁜 예후를 보이는 염색체를 가진 경우에만 Akt를 발현하였다 (P=0.001).

Akt 발현 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군과 그렇지 않은 군을 급성 림프구성 백혈병과 급성 골수성 백혈병으로 나누어 치료 성적을 비교하였으나 두 군 사이에는 총생존기간과 무병생존기간 모두 통계적인 차이는 없었다.

결론적으로 급성 백혈병 세포에서 Akt는 63%, phospho-Akt (Thr308)과 phospho-Akt (Ser473)은 각각 58% 및 56%가 발현하였으며, Akt 발현군과 비발현군 간에는 임상적 예후에 중요한 진단 당시의 말초 혈액 백혈구 수나 염색체 이상과 의미 있는 차이가 있는 것으로 나타났으며 이에 대한 세포 생물학적인 근거나 임상적인 적용을 위해서는 Akt 발현 기전과 세포 주기에 미치는 영향에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : Akt 발현, 급성 백혈병, 백혈구 수치, 염색체

급성 백혈병 세포에서의 Akt 발현과 그 임상적 의미

<지도교수 **민유홍**>
연세대학교 대학원 의학과
맹 호 영

I. 서론

악성 신생물을 포함한 다양한 질병의 발생 기전에 있어서 세포 생존 조절 기전의 장애가 핵심적 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 최근 세포고사가 암세포 발생과 사멸에 근본적인 역할을 하는 것으로 알려져 이를 조절하는 여러 가지 단백과 신호전달 체계에 대한 연구가 활발하게 이루어 지고 있다. 세포고사의 조절 기전에는 다양한 세포내외 단백 및 연관 세포 신호 전달 체계 경로가 상호작용을 하게 되는데 이러한 기전의 결함은 유전물질의 불안정성 및 돌연변이의 발생율을 증대 시키고 세포주기의 확인점(checkpoint)의 기능에도 영향을 주어 발암의 가능성이 높아지며, 또한 종양세포의 생존 효율성을 높이게 된다[1,2].

세포고사는 크게 두 가지 경로 즉, caspase protease의 활성화가 중심이 되는 사멸 수용체(death receptor)에 관련된 경로 한 가지와 다른 한 가지로 미토콘드리아 경로(mitochondrial pathway)가 알려져 있으며 이 들 두 경로간의 bcl-2 동족체를 통한 세포고사 기전의 연관성이나 각각의 혹은 양쪽의 장애로 인하여 세포고사가 억제되는 현상들이 종양 세포 혹은 실험 동물 모형에서 밝혀진 바 있는데 이 중 항세포고사를 나타내는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway의 과표현(overexpression) 및 과활성화(overactivation)가 그 한 예이다[3].

Akt는 AKR mouse의 자발성 흉선종에서 처음 발견된 retroviral transforming oncogene인 υ-Akt의 homologue인 c-Akt로 57,500

MW의 Ser/Thr kinase이며 PKB (protein kinase B) 혹은 Rac protein kinase로도 불린다[4]. 정상적으로는 DNA 손상, 성장호르몬의 자극이 중단되었거나 자외선 투과, 세포 주기의 이상이 초래되었을 때, 혹은 항-Fas 항체의 투여 등이 있을 때의 세포사멸에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며[5] 전사 활성화 물질의 하나로 항세포고사 및 세포성장을 촉진시키는 것으로 알려진 NF-κB의 활성을 조절할 것으로 생각되고 있다[6,7]. 시험관 내에서는 인슐린이나 인슐린양 성장 인자(insulin-like growth factor; IGF)[8], anaplastic large cell lymphoma에서 t(2;5)(p23;q35) 유전자 전위에 의해 나타나는 Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) 중합 단백 등이 Akt의 활성화를 가능하게 하는 것으로 밝혀졌다[9].

Akt는 Ras - phosphoinositide 3-kinase (PI3K) - 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 경로에 의하여 활성화 된 PI3K의 자극에 의해 인산화 된 세포막에 부착하게 되고[4,10] Akt에 의한 procaspase-9의 인산화는 Apaf-1을 매개한 procaspase-9의 활성화를 억제하는 것 이외에 Fas ligand 합성에 관계하는 전사 인자를 불활성화 시키고 FLIP 표현을 용이하게 하며 미토콘드리아로부터의 cytochrome-C유리를 억제하여 세포고사를 억제하는데[11] 이는 좀 더 근본적으로는 oncogenic receptor tyrosine kinase나 Ras 돌연변이, bcr-abl 중합 단백 등의 작용에 의해 체질적 활성화를 나타내는 것으로 생각되며[12] 특히 Akt가 암세포의 무한생존에 기여하는 기전에 tumor suppressor gene인 PTEN 불활성화에 의한 영향이 강하게 작용하리라는 증거가 제시되고 있다[3,14,15]. 그 외에도 활성화된 Akt는 bcl-2 family의 하나인 Bad나 GSK-3, forkhead family인 FKHR, FHKRL1, AFX[8] 등 세포고사를 촉진하는 것으로 알려진 단백들의 인산화를 통해 그 기능을 억제하여 세포고사를 저해하고 세포의 무한생존을 돕는 방향으로 작용하게 된다[16,17,18]. 약술하면, Akt의 활성 증가는 세포고사에 관계하는 다양한 세포 내 단백의 활성화를 조절하여 종양세포의 무한생존(immortality)을

유지시키는데 기여한다[19].

Akt는 활성화는 PI3K의 phosphoinositide product와 직접 결합하여 부분적으로 이루어지지만 최대의 활성화를 위해서는 phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1)에 의한 Thr308의 인산화와 MAPKAP 등의 인산화 효소에 의한 C-terminus 근처의 Ser473의 인산화가 필요할 것으로 알려져 있다[20, 30].

Akt를 특정 조건에서 활성화 시킬 경우에는 실제로 악성 종양 세포의 시험관내 세포 수명이 연장되고 세포 손상을 가하는 방사선이나 약물의 자극에 의한 세포 고사가 저해된다는 보고가 있으며[21,22] 이는 임상적으로 악성 종양 세포가 항암 약물에 반응을 보이지 않게 되는 새로운 기전과 연관성을 지닐 가능성이 있어서 중요성을 가진다[12].

Akt의 과표현과 활성화에 대해서는 이미 몇몇 악성 종양에서 연구된 바 있어 PTEN의 억제에 의해 여포성 갑상선암, 유방암, 대장암, 피부 종양 등 유전적 다발성 종양을 그 임상 증상으로 하는 Cowden's disease, 비소세포폐암, 췌장암, 갑상선암, 유방암, 피부암 및 설암[10] 등의 고형 종양 세포에서 Akt가 과표현 및 활성화 되어있음과 더불어 B세포성 만성 림프구성 백혈병 세포에서 자가 혈청에 의해 Akt가 활성화되고 방사선 조사나 항암 약물 처리에 의한 DNA 손상에 대한 생존을 증가시키며[22], 앞서 기술한 바와 같이 종양 세포의 염색체 검사상 t(2;5)(p23;35)를 보이는 anaplastic large cell lymphoma에서는 nucleophosmin (NPM)/anaplastic lymphoma kinase (ALK) 융합 단백에 의해 PI3K/Akt경로가 활성화되면 세포의 악성 변형이 유도된다는 증거가 발표되었다[23,24]. 또한 EGF 및 PDGF등의 성장 촉진 인자들에 의하여 PI3k/Akt pathway가 활성화 되는 바, 이들 성장 인자의 수용체가 과표현 양상이 다양한 종양에서 자주 관찰되고 있으며 전체 종양의 30%에서 나타나는 ras 돌연변이의 경우에도 PI3K/Akt pathway를 통한 항세포고사기전이 관여하는 것으로 알려져

기존에 밝혀진 악성 종양 세포의 특성인 무한생존 기전에 Akt가 중심적인 역할을 할 것으로 생각된다.

따라서 어떠한 악성 종양 세포에서 Akt의 발현 여부에 따른 임상 양상의 차이가 존재한다면 치료 반응을 예측할 수 있는 예후 인자의 하나로 사용할 수 있을 뿐 아니라 PI3K/Akt 경로의 활성화에 작용하는 단백 혹은 Akt의 영향을 받아 활성도가 조절되는 단백을 선택적으로 억제하여 세포고사를 유도하고 이에 따른 항암 효과를 기대할 수 있을 것이며, 이를 통해 세포신호전달체계 수준에서의 효과적인 표적 치료의 개념으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다[3,25].

지금까지 Akt 발현 및 활성화에 대한 연구는 주로 일부 고형종양 및 악성혈액질환을 대상으로 시행된 바 있으나 급성 백혈병에서는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 급성백혈병에서 Akt의 발현 및 활성화 양상을 정상 골수세포와 비교 분석하여 확인함으로써 세포 신호 전달 체계 수준에서의 치료 표적으로서의 적용 가능성을 타진해 보고 Akt의 발현 및 활성화가 임상적으로 갖는 의미와 그 유용성에 대해 조사해 보고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

가. 1997년 1월부터 2001년 9월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원 혈액종양내과에서 급성 림프구성 백혈병 혹은 급성 골수성 백혈병으로 처음 진단 받은 성인 환자 중 무작위 선정된 43예를 대상으로 하였으며 정상 대조군으로 8예의 정상 골수 세포를 이용하였다. 급성백혈병 세포는 진단 당시 시행한 골수 흡인 검사 표본을 사용하였고, 대조군으로 사용한 정상 골수 세포는 동종 골수이식 공여자로부터 채취한 것을 사용하였다.

나. 급성 백혈병의 혈액학적 진단은 미숙세포의 형태와 세포화학염색을 근거로 한 French-American-British (FAB) 분류를 따랐다.

급성 백혈병으로 진단 받을 당시의 골수 단핵세포를 Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 농도차분리법을 사용하여 분리하였다. 2회의 세척 후에 세포들을 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)과 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 함유된 RPMI 1640 배양액 (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)에 재부유 시킨 후에 액화 질소에 냉동하여 –70℃에 보관하였다.

다. 정상 골수 세포의 경우에는 세포 성상의 단일화를 위하여 MiniMACS® (Miltenyi, Nordrhein-Westfalen, Germany) CD34 isolation kit를 이용하여 골수 단핵구 중의 CD34양성 세포만을 분리하였고 상술한 바와 같은 방법으로 저장하였다.

2. 방법

가. 단백질 추출

동결 저장 중이던 세포를 37℃ 항온 수조에서 해동하였고 PBS 1ml로 2차례 세척하였다. 4℃ 원심분리기에서 15,000 RPM으로 1분간 원심 분리한 뒤 0.3% tryphan blue 용액으로 염색하여 hemocytometer로 세포생존율(viability)을 측정하여 생존도가 90% 이상인 세포들을 실험 사용하였는데, 시험관 한 개 당 $5x10^6$개의 세포가 되도록 나누어 SDS sample buffer 100㎕로 lysis시킨 뒤 2초간 sonication하고 95℃에서 10분간 heat block 하였다. 추출된 단백은 4℃에서 12,000RPM으로 1분간 원심 분리하였고 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다.

나. Western blotting

⑴ SDS-PAGE

Hoeffer Mighty® gel cast (Pharmacia Biotech Inc., USA)에 Hoeffer gel glass plate (Pharmacia Biotech Inc., USA)를 사용하여 12% Acrylamide ruuning gel (Sigma, Steinheim,

Germany)과 5% acrylamide stacking gel을 만들고 pH 8.3 SDS-PAGE running buffer (iNtRON Biotech, Seoul, Korea)를 전기영동 chamber에 채운뒤 SDS-PAGE prestained standard low range marker (BioRad, Hercules, CA, USA) 10 μl 및 1X sample buffer가 첨가된 준비되어 있는 protein을 각각 15 μl씩 loading하고 120V, 100mA에서 bromophenol blue가 gel의 말단부에 도달 할 때까지 전기영동 하였다.

⑵ transfer

전기영동이 끝나면 pH 8.3 transfer buffer (iNtRON Biotech, Seoul, Korea)를 사용하여 350mA에서 4시간 동안 nitrocellulose 막 (Amersham, Little Chalfont, UK)에 단백을 이동시켰다.

⑶ Immunoblotting

5% Non-fat-milk에 4시간 이상 비특이적 단백에 대한 blocking을 시행하고 1차 항체를 각 항체의 권장되는 농도로 5% non-fat milk에 희석한 뒤 4℃에서 6시간 동안 반응시켰다.

각 추출된 세포 단백의 양은 α-tubulin 항체 (Cedarlane, Hornby, Canada)를 사용하여 정상화(normalization)하였다. 사용한 1차 항체들은 모두 rabbit 항체였으며 자세한 내용은 다음과 같다.

㈎ Akt (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)

㈏ phospho-Akt (Ser473) (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)

㈐ phospho-Akt (Thr308) (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)

1차 항체를 반응시킨 뒤에는 TBST로 10분간 3회에 걸쳐 세척한 후 2차 항체(anti-rabbit antibody, Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)를 2시간 동안 반응시키고 TBST를 사용한 세척을 3회 반복하였다.

⑷ Detection

ECL chemiluminiscent detection reagent (Amersham Co, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 각각 15 sec와 1, 3분간 노출시켜 현상하였다.

다. 단백의 간접적 정량

각 단백의 표현 정도는 CSC camera controller 1.4 program (Vilber Lourmat, France)로 scan하여 TINA 2.10e program (Raytest, Germany)을 이용하여 측정하였다.

라. 대상 환자의 임상 자료 수집

대상 급성 백혈병 환자의 입원 및 외래 진료 기록을 토대로 진단 당시의 나이, 성별, 말초 혈액 백혈구 수치와 미숙세포(blast)의 분율, lactate dehydrogenase (LDH), 골수 외 백혈병의 침습의 유무, 골수 조직 검사의 세포 충실도 및 염색체 변이 여부, 항암 치료 여부 및 치료 효과, 항암 치료 후 재발 유무, 총생존기간, 무병생존기간 등의 임상적 특징을 후향적으로 조사하였다.

완전 관해는 골수 외 백혈병 침범의 증거가 없고 말초 혈액 내 미숙세포가 관찰되지 않는 상태에서 말초 혈액 호중구 수치가 1,500/㎕ 이상, 혈소판이 100,000/㎕이상이며 골수 검사 상 세포 충실도가 20% 이상, 미숙세포가 5% 미만 관찰되는 상태가 적어도 4주 이상 지속될 때로 정의하였다.

마. 통계 분석

Akt 발현 및 활성화 유무에 따른 임상적 특징을 비교하기 위하여 Chi-square test, independent-samples T test를 사용하였고, 생존율 비교를 위해서는 Kaplan-Meier survival test, 통계적 의의를 검사하기 위해서는 log rank test를 사용하였다. 모든 통계 결과는 P 값이 0.05 미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로

판정하였다. 이상의 모든 통계적 분석은 Windows-SPSS release 10.0을 사용하여 수행하였다.

Ⅲ. 결과

1. 대상 환자들의 임상적 특성

전체 대상 급성 백혈병 환자 43예 중 27예인 63%에서 Akt 발현을 보였고(Fig. 1.), phospho-Akt (Thr308)와 phospho-Akt (Ser473)는 각각 58%와 56%에서 발현하였다 (Table 1.).

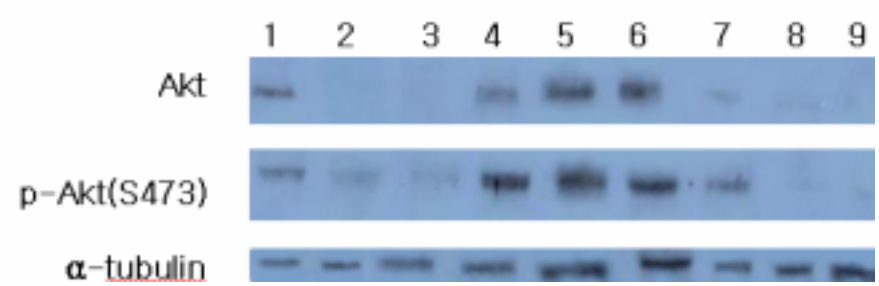

Fig. 1. Expression of Akt and phospho-Akt (Ser473) in leukemic cells. Samples loaded from No.1 to No.7 were acute leukemic cells. From No.8 to No.9, samples were normal bone marrow stem cells.

Table 1. Akt and phospho-Akt (Ser473) expression in acute leukemia cells and normal bone marrow stem cells

	Acute leukemia (N=43)		Normal control (N=8)
	N	%	
Akt expression	27	63	0
Phospho-Akt (Thr308) expression	25	58	0
Phospho-Akt (Ser473) expression	24	56	0

Akt 발현군과 비발현군의 임상적인 특성을 비교한 결과 Akt 발현을 보이는 환자군의 진단 당시 말초 혈액 백혈구 수치는 평균 88,419/㎕으로 Akt 발현을 보이지 않는 군의 수치인 27,796/㎕에 비해 의미 있게 높았다.

성별이나 나이, 급성 백혈병의 조직아형, 말초 혈액 중의 미숙세포 분율, 진단 당시의 LDH, 진단 당시의 골수 충실도, 중추신경계 침범 여부에 있어서 Akt 발현군과 비발현군 간의 통계적으로 의미 있는 차이는 나타나지 않았다 (Table 2.).

급성 백혈병의 골수외침범여부와 Akt 발현 여부를 비교하였다. 중추신경계, 간비종대, 림프절종대 등의 골수외침범을 보인 6예 중 5예에서 Akt의 발현을 보였으나 통계적인 의미는 없었다 (P=0.26).

Phospho-Akt (Ser473)의 발현군과 비발현군을 비교하였을 때는 Akt 발현군과 비발현군을 비교하였을 때와 마찬가지로 Akt 발현군의 진단 당시 말초 백혈구 수치만 의미 있게 높았고 (P=0.003) LDH, 말초혈액 미숙세포의 분율, 골수충실도 등은 의미 있는 차이는 나타내지 않았다.

Table 2. Clinical characteristics of involved patients

	Akt expression		
	Positive (N=27)	Negative (N=16)	*P*
Age	49 (17~68)	51 (17~66)	0.20
Sex(M:F)	16:11	8:8	0.55
ALL	8	3	0.43
L2	8	3	
AML	19	13	
M0/M1/M2	3/1/7	–/2/3	
M3/M4/M5	1/4/3	2/4/2	
WBC($\times 10^9$/L)*	88,419	27,796	0.008
	±115,854	±40,473	
Blast(%)	75(16~90)	46.5(12~92)	0.68
LDH†	6.5	2.76	0.78
	(0.6~11.2)	(0.82~12.6)	
BM‡ cellularity(%)	90 (35~100)	90 (60~100)	0.37

Values denote median except initial peripheral WBC count.

* mean±standard deviation of initial WBC count

† ratio to upper normal limit

‡ bone marrow

2. Akt 발현 여부와 염색체 이상

대상 환자를 급성 백혈병 세포의 염색체의 이상에 따라 좋은 예후, 평균 정도의 예후, 나쁜 예후의 세가지 군으로 분류하여 평가하였을 때 Akt 발현을 보인 27예 중 염색체 검사 결과를 확인할 수 있었던 경우가 21예 였는데 그 중 좋은 예후를 보이는 염색체 이상을 가진 군에 속하는 경우는 없었고 평균 정도의 예후와 나쁜 예후를 보이는 염색체 이상의 경우는 각각 15예와 6예가 있었다. Akt를 발현하지 않은 군의 14예 중 염색체 검사 결과를 확인할 수 있었던 7예에서 좋은 예후, 평균 정도의 예후 및 나쁜 예후를 보이는 경우가 각각 5예, 그리고 2예 있었다 (Table 3).

Akt 발현군에 속하면서 phospho-Akt (Thr473) 음성이었던 3예의 경우 그 중 2예가 나쁜 예후를 보이는 군에 속하였고 나머지 1예는 정상 핵형을 가졌다.

급성 백혈병에서 예후와의 연관성이 뚜렷이 밝혀지지 않은 핵형 중 하나인 47,XY,+Y 핵형을 가진 1예의 경우 Akt 발현은 보이지 않았으며 통계에서 제외하였다.

Table 3. Akt expression and karyotypes of bone marrow cells

	Akt expression		*P*
	Positive (N=21)	Negative (N=14)	
Good	–	7(50%)	<0.001
t(15;17)	–	2	
t(8;21)(q22;q22)	–	4	
inv16	–	1	
Intermediate	15(70%)	6(35.7%)	0.09
Normal	14	6	
47,XY,+8	1	–	
Poor	6(30%)	1(14.3%)	0.12
t(9;22)(q34;q11)	3	–	
del(7)t(9;22)	1	–	
t(3;5)(q21;31)	1	–	
45,XX, -7,+15,+16, -21, -X	1	–	
t(5;9)(p24;q22)	–	1	

3. Akt 발현 여부에 따른 치료 결과와 생존율

가. Akt 발현 여부와 치료 결과

Akt 경로의 활성화가 치료 반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Akt 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군과 그렇지 않은 군의 치료 성적을 비교하였고 질환 자체의 특성상 급성 림프구성 백혈병과 급성 골수성 백혈병의 임상 경과와 예후가 다르므로 각각의 군으로 나누어 치료 결과와 생존율을 분석하였다.

항암 치료에 대한 반응은 첫 2회의 항암 치료 이내에 상술한

바와 같은 기준에 의해 진단된 완전 관해를 얻은 경우와 그렇지 않은 경우로 나누어 각각 complete response (CR) 및 no response (NR)로 표시하였다 (Table 4).

Table 4. Akt expression and treatment response

Treatment response	Akt expression		Phospho-Akt (Ser473) expression	
	Positive	Negative	Positive	Negative
ALL				
NR*	3	-	2	1
CR**	4	3	4	3
P	0.18		0.67	
AML				
NR*	6	2	6	2
CR**	12	8	10	10
P	0.39		0.22	
Total	25	13	22	16

* no response

** complete response

항암 약물 치료를 받은 38예 중 ALL은 10예 였으며 Akt 발현을 보인 환자 중 CR 4예, NR 3예였으나 Akt 발현이 없었던 환자 중 CR 3예였고 NR에 속하는 경우는 없었다 (*P*=0.18). AML은 28예 였으며 Akt 발현을 보인 환자 중 CR 12예, NR 6예였으며 Akt 발현이

없었던 환자 중 CR 8예였고 NR 2예였다 (P=0.45).

나. Akt 발현과 생존율

Akt 발현을 보인 군과 그렇지 않은 군의 생존율을 비교하였으며 조혈모세포이식을 시행 받은 9명의 환자에서는 이식일을 기준으로 총생존기간과 무병생존기간을 계산하였다 (Table 5). 총생존기간과 무병생존기간에 있어서 Akt 발현군과 비발현군 간의 Kaplan-Meiyer 생존 곡선에서 Akt 발현군이 그렇지 않은 군에 비하여 ALL (Figure 2.) 과 AML (Figure 3.) 모두에서 낮은 생존율을 보였으나 통계적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.

Table 5. Akt expression and survival duration

	Akt expression		P
	Positive (N=24)	Negative (N=13)	
Overall survival (weeks)			
ALL	19 (3~105)	38 (17~48)	0.08
AML	21 (0~154)	4 (0~36)	0.47
Disease-free survival (weeks)			
ALL	2 (0~44)	33 (14~33)	0.07
AML	15 (0~67)	6 (0~78)	0.18

Values denote median.

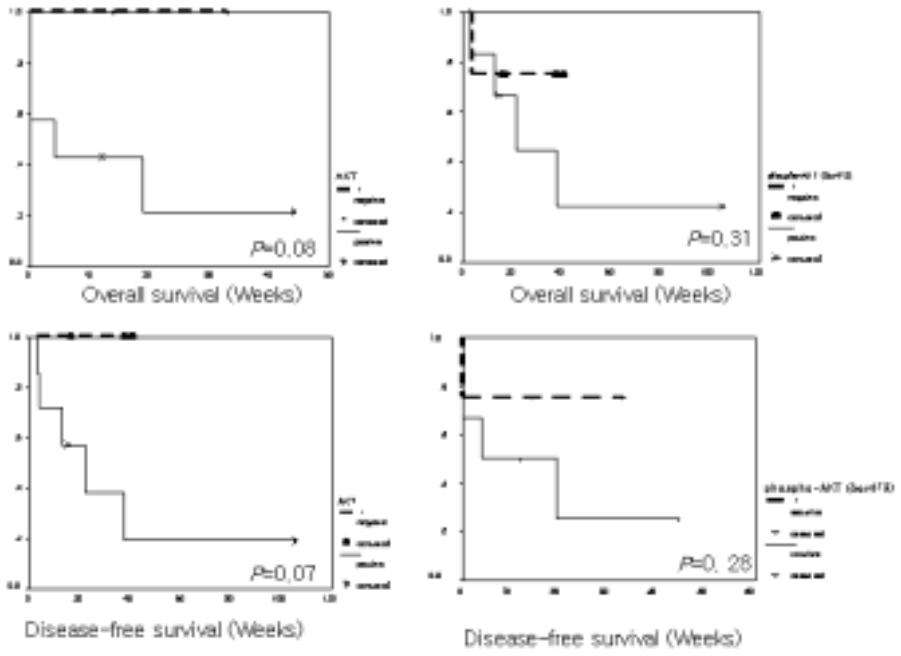

Figure 2. Graphs showing survival duration according to Akt-expression in ALL patients (From the leftt top, in clockwise manner, comparison of overall survival between Akt and phospho-Akt (Ser473) positive and negative group and disease free survival between Akt and phospho-Akt (Ser473) positive and negative group)

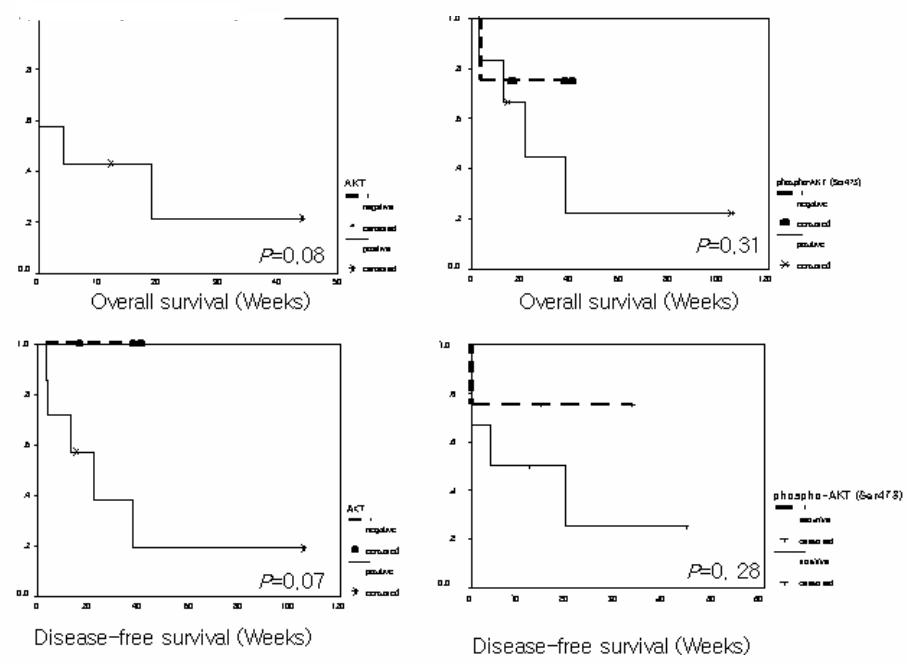

Figure 3. Graphs showing survival duration according to Akt-expression in AML patients (From the leftt top, in clockwise manner, comparison of overall survival between Akt and phospho-Akt (Ser473) positive and negative group and disease free survival between Akt and phospho-Akt (Ser473) positive and negative group)

Ⅳ. 고 찰

PI3K-Akt 경로가 세포고사에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려지면서 여러 고형 악성 종양 및 악성 혈액 질환에서의 Akt 발현 및 활성화와 이의 작용이나 세포생물학적 혹은 임상적 의미에 대해 다각적으로 연구되고 있으나 급성백혈병 세포에서 Akt가 갖는 의미에 대해서는 알려진 바 없다. 이에 저자는 급성 백혈병 native cell에서 Akt 및 phosphorylated Akt의 존재 여부를 확인하고 어떤 임상적 의미와 유용성을 가질 수 있는지 평가하고자 하였다.

본 연구에서는 급성 백혈병으로 진단 받은 43명의 환자와 건강한 골수 기증자 8명을 대상으로 골수 세포의 단백으로 Western blot을 실시하여 Akt 발현 여부를 확인하고 환자군의 경우에는 Akt 발현 여부와 기존에 확립되어 있는 여러 가지 예후 인자, 치료 반응 및 생존 기간과의 관계를 유추하였는데 Western blot 분석을 시행할 때는 급성백혈병세포와 정상세포의 단백질 추출 시 세포 수 차이에서 올 수 있는 오류를 막기 위하여 기준이 되는 단백으로 각 예에서 α- tubulin을 측정하여 비교하였다.

Akt는 protein kinase B (PKB) 혹은 Rac으로도 불리 우며 insulin-like growth factor-1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor 등의 다양한 growth factor와 insulin, interleukin-3, interleukin-6, macrophage-colony stimulating factor 등 생체 내 존재하는 여러 가지 물질에 의해 활성화되며[26] 최근 당뇨병이나 혈관질환, 퇴행성 뇌 질환 등 다양한 영역에서 세포고사와 관계하여 병인 기전에 중요한 역할을 할 것으로 예측되고 있다. Akt 단백은 v-akt oncogene의 산물과 유사성이 있는데[23,27] 3가지 동종체로 구성되어 각 악성 종양 마다 특정 isotype의 Akt가 과표현 및 과활성화 되어 존재하며[22,28] 갑상선암에서는 Akt1과 Akt2가, 난소, 췌장 및 유방 악성 종양의

경우에는 Akt2와 Akt3가 상대적으로 활성도가 높은 것으로 발표되었는데 비소세포폐암 세포주의 경우에 Akt의 활성을 측정한 결과 Akt3가 in vitro kinase 활성과 가장 연관성이 좋았기 때문에 이를 측정하는 것이 유용하리라고 제시된 바 있다[21]. 그 외에도 Akt-1이 retroviral oncogene에서 발견되어 세포고사 이외에 transformation에도 관여할 가능성이 제시되었다[3,29]. 본 실험에서 사용한 일차 항체는 동종체의 구분 없이 전체 Akt에 대한 것으로 특정 동종체의 증가는 확인하지 못하였다.

Akt 발현군 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군은 각각 그렇지 않은 군과 비교했을 때 말초 혈액 백혈구 수치가 의미 있게 증가되어 있었으나 나이, LDH 등의 다른 예후인자에 있어서는 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.

급성 백혈병 환자의 진단 시의 임상 특성 중 염색체 이상은 독립적 예후 인자의 하나로 복잡한 핵형의 이상(complex karyotype), 골수이형성을 보이는 경우에 나타나는 염색체 이상을 동반하는 경우, 또는 치료 중 추가적 염색체 이상이 발견되는 경우에는 불량한 예후를 보이는 것으로 알려져 있으며 특히 급성 림프구성 백혈병에서의 t(9;22) (Philadelphia chromosome)이나 급성 골수성 백혈병의 –5, -7, del5q 혹은 3p의 이상이 그 대표적인 예이다[31].

본 실험의 결과에서 비교적 좋은 예후를 보이는 염색체 이상에 속하는 예에서 Akt를 발현하는 경우는 한 예도 없었으며 (P<0.001), 불량한 예후를 보일 것으로 생각되는 염색체 이상을 나타낸 8예의 중 6예가 Akt 발현군이었고 2예가 Akt 비발현군에 속하였다. Akt 활성화군과 비활성화군으로 나누어 비교했을 때는 불량한 예후를 나타내는 7번 염색체 결실을 보이는 1예가 Akt는 발현하였으나 phospho-Akt (Ser473)는 발현하지 않았기 때문으로 생각되며, Akt 발현군이면서 Akt 비발현군에 속하는 나머지 2예의 핵형은

정상이었다.

Akt와 염색체 이상의 관련성에 대한 보고를 살펴보면 T 세포 림프종(T cell lymphoma;TCL) 호지킨병에서 14q32를 포함하는 전위가 있는 경우 TCL1A 단백이 Akt의 pleckstrin 영역에 작용하여 Akt 활성화 보조물질의 역할을 한다고 하며[32] 10q23.3에 위치하는 PTEN gene product는 Akt를 활성화시키는 PI3K를 낮은 수준으로 유지시켜 Akt의 활성화를 억제하는 tumor suppressor gene으로서의 역할을 하므로 이를 포함하는 염색체의 이상은 Akt의 활성화를 가져올 수 있다[13]. 대상 예에서는 Akt 혹은 phospho-Akt 발현군에서 진단명 특이적인 유전자 이상의 경향은 발견할 수 없었다.

급성 백혈병, 특히 급성 골수성 백혈병에서 예후에 가장 중요한 인자는 초기 치료에 대한 반응이라는 사실은 잘 알려져 있다[31]. 또한 소아기의 백혈병이나 일부 고형 악성 종양 중 항암 약물치료를 통해 완전관해가 가능한 것으로 알려진 종양일수록 그 세포의 항암제에 의한 소멸 기전이 세포사멸에 의한 것이 현저하며 항암 치료에 대한 예민도는 세포사멸 조절인자들의 표현 정도와 비례하는 것을 살펴볼 때[3] 미래의 항암 약물 치료의 공격점의 하나로 세포사멸 관련 경로를 세울 수 있는 논리적 근거가 될 수 있다. 실제로 PI3K경로 및 Akt 활성을 조절할 수 있는 PTEN의 결핍을 보이는 PTEN null cell에서 PTEN gene reconstruction했을 경우 Akt경로와 관계된 세포고사가 일어남이 관찰되었고 bcr-abl 융합단백을 발현하는 세포주에서 antisense Akt가 세포의 성장을 억제하는 현상이 발표된 바 있다[3,33].

본 연구의 결과에 의하면 Akt 발현군과 활성화군에서는 그렇지 않은 군과 비교하여 치료에 반응이 저조했던 환자군이 차지하는 분율은 상대적으로 높았으나 그 차이는 통계적인 의미를 갖지 못하는 것으로 나타났다. 실험적으로는 악성 종양 세포에서 Akt를 활성화 시킬 경우 항암 약물이나 방사선 조사 등으로 염기 서열에 손상을 초래하더라도 세포고사에 저항하는 능력을 갖추게 되며 이러한 현상은 손상을

가하는 자극이 이미 일어나고 일정 기간이 경과한 후에도 Akt 활성화가 가능한 조건이 만족될 경우 cytoprotective effect를 유지하였다는 보고가 있어[21,22] 치료 개시 이전에 Akt가 활성화되지 않았던 군에서 치료 중 PI3K/Akt 경로가 활성을 보이면서 불응성을 나타낼 가능성이 있다.
Akt 발현과 급성 림프구성 백혈병에서의 환자의 생존율의 관계를 살펴보면 Akt 발현군의 총 생존 기간과 무병생존기간은 각각 그 중앙값이 22주, 4주 였으며 이 두 군간의 생존 곡선에 통계적으로 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다 (각각 P=0.10, P=0.84). 급성 골수성 백혈병의 경우에도 Akt 비발현군의 생존 곡선이 우위를 차지하나 Akt 발현군과 비발현군을 비교하여 통계적으로 의미 있는 결과는 얻지 못하였다.

Akt가 임상적 예후에 중요한 진단 당시의 말초 혈액 백혈구 수나 염색체 이상과 의미 있는 관계를 가지는 것으로 나타났음에도 불구하고 실제 환자의 생존율에서는 통계적으로 의미를 갖지 못한 것에 대해서 몇 가지 원인을 제시해 볼 수 있다. 이론적으로는 치료 약제에 의해 급성 백혈병 세포의 염기 서열이 손상을 입는 경우에 Akt 활성화가 일어나 세포의 무한생존을 돕는 방향으로 작용한다면 Akt 활성화를 보이는 세포는 항암 약제에도 내성을 가질 가능성이 있으나 본 실험은 환자의 골수에서 진단 당시에 채취한 native leukemic blast를 사용하였으므로 급성 백혈병 세포가 innate하게 Akt의 발현 혹은 활성화를 보이는 기전과 항암 약물 치료 시에 Akt가 발현되고 활성화되는 기전이 서로 상이하고 세포 간에 차이가 있을 수 있다. 이런 동질하지 못한 조건을 극복하기 위해서는 Akt의 활성화를 유도하는 조건이 없는 동일한 환경에서 기존에 Akt 활성을 유도하는 것으로 알려진 성장 촉진 인자나 인슐린 등으로 균일하게 자극한 뒤에 Akt의 활성화 여부를 측정해 볼 수 있겠다. 제시해 볼 수 있는 다른 이유는 통계상의 문제점으로 무작위 추출된 환자군의 임상 경과가

균일하지 못하다는 점이다. Akt 발현군에 비하여 Akt 비발현군의 추적관찰 기간이 짧아서 객관적인 성적의 비교가 어려웠던 것으로 판단된다.

급성백혈병 환자에서 Akt의 어떤 동종체가 주로 표현되는 지와 Akt 표현과 활성화가 기존에 다른 고형 악성 종양에서 알려진 바와 같은 기전에 의한 것인가에 대한 주제에 대해서 앞으로 연구가 진행되어야 할 것이며, Akt의 활성화 기전을 좀 더 객관적으로 확인하기 위해서는 동일한 조건에서의 세포 배양이 시행하여 Akt의 표현 수준을 세포주들 간에 동일하게 하고 혈청 제거(serum deprivation)로 Akt 활성화를 자극하지 않는 조건에서 phospho-Akt (Ser473) 및 PI3K/Akt 세포신호전달체계에 소속된 단백의 발현 및 활성화를 측정하고 나아가 PI3K/Akt 경로를 억제하는 물질을 투여하여 세포고사가 증가하는 지의 여부와 그런 현상과 관련된 세포신호전달체계 관련 물질의 질적, 양적 활성화 정도를 확인하여야 할 것으로 생각된다. 또한 Akt의 활성화가 갖는 임상적 의미는 Akt의 활성화가 종양 세포 특이적인 세포 신호 전달 체계의 중요한 물질로 생각되고 대다수의 종양세포에서 발견되는 현상으로 밝혀질 때 이를 앞으로 항백혈병 약물의 신호전달체계 수준에서의 목표 단백으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

저자들은 1997년 1월부터 2001년 9월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원 혈액종양내과에서 급성 림프구성 백혈병 혹은 급성 골수성 백혈병으로 처음 진단 받은 성인 환자 중 무작위 선정된 43예 (급성 림프구성 백혈병 11예, 급성 골수성 백혈병 32예)를 대상으로 진단 당시의 각 환자의 임상적 특징과 골수의 백혈병 세포를 사용하여 Akt 표현 여부에 따른 상관 관계를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상 급성백혈병환자 43예 중 27예인 63%에서 Akt 발현을 보였고 그 중 89%인 24예에서 phospho-Akt (Ser473)의 발현을 관찰할 수 있었다.
2. Akt 발현군 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군의 경우 진단 시의 말초 혈액 백혈구 수치가 비발현군에 비해 의미 있게 증가되어 있었고, 나쁜 예후를 갖는 염색체의 이상을 가진 경우에는 Akt 및 phospho-Akt (Ser473) 발현을 동반하는 빈도가 높았다.
3. Akt 나 phospho-Akt (Ser473)발현이나 활성화는 나이, 성별, 진단(급성 림프구성 백혈병 혹은 급성 골수성 백혈병), 초기 치료의 결과와는 통계적으로 의미 있는 관계를 보이지 않았다.

결론적으로 본 연구에서는 Akt 및 phospho-Akt (Ser473) 발현 여부에 따른 생존 간의 통계적인 차이는 보이지 않았지만 진단 당시의 말초 혈액 백혈구 수치 및 서로 다른 예후를 보이는 염색체 이상과 관계를 가짐을 알 수 있었다. 이를 토대로 Akt 발현에 관계하는 신호전달체계를 연구하여 급성 백혈병의 발병 기전과 치료 예후 예측 및 치료시의 목표 물질로서의 그 가치에 대한 가능성을 타진해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Reed JC Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. Curr Opin Oncol 1999;11:68-75.

2. Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. Bioessays 2000;22:1007-17.

3. Sellers WR, Fisher DE. Apoptosis and cancer drug targeting. J Clin Inves 1999;104:1655-61.

4. Coffer P, Woodgett J. Protein kinase B (c-akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J 1998;335:1–13.

5. Wan X, Yokoyama Y, Shinohara A, Takahashi Y, Tamaya T. PTEN augments staurosporine-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells by downregulating PI3K/Akt signaling pathway. Cell Death Differ 2002;9:414-20.

6. Curnock AP, Logan MK, Ward SG. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. Immunology 2002;105:125-36.

7. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. J Clin Inves 2001;107:241-6.

8. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature 1999;398:630-4.

9. Falini B. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. Br J Haematol 2001;114:741-60.

10. Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem 1998;273:19929-32.

11. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 1998;282:1318-21.

12. Mow BM, Blajeski AL, Chandra J, Kaufmann SH. Apoptosis and the response to anticancer therapy. Curr Opin Oncol 2001;13:453-62.

13. Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK, Mao L. Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001;127:1441-5.`

14. Ravandi F, Talpaz M, Kantarjian H, Estrov Z. Cellular signalling pathways: new targets in leukaemia therapy. Br J Haematol

2002;116:57-77.

15. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science 1999;286:1741-4.

16. Franke TF. Apoptosis: A Bad kinase makes good. Nature 1997;390:116-7.

17. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 1997;91:231-41.

18. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science 1997;278:687-9.

19. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem 1994;269:5241-8.

20. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J 1996;15:6541-51.

21. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/PKB is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and

radiation. Cancer Res 2001;61:3986-97.

22. Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick V, Hartley JA, Wadhwa M, Thorpe R, Hoffbrand V, Prentice HG, Mehta AB. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chromic lymphocytic leukemia cells. Br J Haematol 2001;114:608-15.

23. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, Morris SW, Wasik MA, Skorski T. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin /anaplastic lymphoma kinase kinase-mediated lymphoma-genesis. Cancer Res 2001;61:2194-99.

24. Bai R, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phospha-tidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. Blood 2000;96: 4319-27.

25. Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. Drugs 2000;59:435-76.

26. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 1999;13:2905-27.

27. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing

an SH2-like region. Science 1991;254:274-7.

28. Ringel MD, Hayre N, Satio J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V Burman KD, Kohn LD, Saji M. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. Cancer Res 2001;61:6105-11.

29. Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. Association of phospjatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. Nature 1985;315:239-242.

30. Blum-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature 2001;411:355-65.

31. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 1997;16:64-7.

32. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. Pi3K:Downstream AKTion blocks apoptosis. Cell 1997;88:435-7.

32. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. EMBO J 1997;16:6151-61.

33. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci 1999;96:4240-5.

Abstract

Akt expression in acute leukemia cells and its clinical significance

Ho Young Maeng

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yoo Hong Min)

A disturbance in apoptosis is recently considered as one of key mechanisms in oncogenesis. Among them, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway is thought to have a role in cancer cell immortality through its kinase action which results in eventually antiapoptotic properties. Enhanced expression and activation was previously noted in several solid non-hematopoietic malignancies but not in human acute leukemia cells. In this study, the expression of Akt and phospho-Akt in acute leukemia cells was evaluated and the comparison was made in the point of clinical characteristics between Akt or phospho-Akt positive and negative group.

Using bone marrow leukemic cells from patients who were newly diagnosed as acute lymphocytic or myelogenous leukemia and normal bone marrow cell from healthy donors, Akt, phospho-Akt (Ser473), phospho-Akt (Thr308) was qualified by Western blot analysis. Clinical characteristics of involved patient were obtained by a retrospective way from their medical records.

Akt was demonstrated in 27 of 43 cases and phospho-Akt was detected in 24 of 27 Akt-positive cases. Comparison of the above

two groups showed that WBC count at diagnosis in Akt-positive group was significantly elevated than in Akt-negative group (P=0.008). In phospho-Akt (Ser473)-positive group also showed significantly higher initial WBC counts than in phospho-Akt (Ser473)-negative group (P=0.003).

Considering karyotypic abnormalities in acute leukemia cells, there is prognosis-based classification in some specific occasions. When compared Akt-positive and Akt-negative group according to this, no one from Akt-positive goupr was belonged to the karyotyic group which shows relatively good prognosis (P=0.001).

Other clinical characteristics such as age, leukemia subtypes, peripheral blast proportions, bone marrow cellularity, lactate dehydrogenase (LDH) at diagnosis, central nervous system involvement and overall or disease free survival did not show any difference between two groups.

In conclusion, there exist significant differences in WBC at diagnosis and chromosomal abnormalities in acute leukemia cells between Akt-positive and Akt-negative group in this study. It will be needed to further investigate molecular basis and detailed action in apoptosis regarding Akt activation to define its role in the pathogenesis or progression in acute leukemia.

Key words : Akt, acute leukemia, white blood cell count, chromosome