



Çocukluk Çağı T-ALL Hastalarında *PTEN* ve *AKT1* Gen Anlatım Düzeyleri

PTEN and AKT1 Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients

Fulya Küçükçankurt^{1,2}, Özden Hatırnaz Ng^{2,3}, Müge Sayitoğlu², Yücel Erbilgin²

ÖZ

Amaç: PI3K/AKT sinyal yolağının bozulmuş aktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. *PTEN/AKT* yolağı, hücre büyümesi ve sağ kalımında kritik role sahip olup, lösemilerde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, çocukluk çağı T-ALL hastalarındaki *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları belirlendi ve hastalığın prognozuna olan etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Otuz dokuz çocukluk çağı T-ALL olgusunun, tanı zamanı kemik iliği örnekleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile *PTEN* ve *AKT1* genleri için tarandı. Gen anlatım düzeylerinin hastaların yaş, cinsiyet, immünofenotip, tedavi yanıtı, nüks ve sağ kalım gibi klinik verileri ile ilişkisi incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda, T-ALL hastalarında *PTEN* gen anlatımında kontrollere göre bir farklılık gözlenmezken, *AKT1* gen anlatımının anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,0001$). Hastaların klinik özellikleri, genel ve hastalısız sağ kalım oranları ve gen anlatım düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken, indüksiyon tedavisi ilişkili sağ kalım analizleri *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları ile genel sağ kalım oranları arasında (sırasıyla, $p = 0,026$ ve $p = 0,034$ Cox regresyon analizi) anlamlı bir ilişki ortaya koyuldu. Diğer klinik parametreler ile gen anlatım düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızda, T-ALL örneklerinde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak artmış *AKT1* gen anlatımının varlığı ve sağ kalım sürelerini etkilediğine dair bulgular elde edildi. Gelecekteki çalışmalar, *AKT1*'in hedefe yönelik tedaviler için uygun bir aday olup olmayacağını ortaya çıkaracaktır.

Anahtar Kelimeler: T-hücreli akut lenfoblastik lösemi, gen anlatımı, *PTEN*, *AKT1*

ABSTRACT

Objective: Impaired activation of the PI3K/AKT signaling pathway has been associated with tumor development. The *PTEN/AKT* pathway plays a critical role in cell growth and survival and has been associated with chemotherapy resistance in leukemia. In this study, *PTEN* and *AKT1* gene expression were determined in childhood T-ALL patients, and the effect was investigated on the prognosis of the disease.

Materials and Methods: Bone marrow samples from 39 childhood cases were obtained at the time of diagnosis and screened with real-time quantitative PCR for *PTEN* and *AKT1* genes.

Results: In our study, no difference between T-ALL patients compared to controls was observed in *PTEN* gene expression whereas *AKT1* gene expression was significantly increased ($p < 0,0001$). There was no significant relationship between gene expression and clinical features of the patients, overall and disease-free survival rates while induction therapy-related survival analyzes revealed a significant relationship between *PTEN* and *AKT1* gene expression and overall survival rates ($p = 0,026$ and $p = 0,034$ Cox regression analysis, respectively).

Conclusion: In our study, the presence of increased *AKT1* gene expression was demonstrated in T-ALL patients independent of *PTEN* expression. Future studies will reveal whether it will be a suitable candidate for targeted therapies.

Keywords: T-cell acute lymphoblastic leukemia, gene expression, *PTEN*, *AKT1*

¹ İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: F.K. 0000-0002-5345-9072;

Ö.H.N. 0000-0001-7728-6527;

M.S. 0000-0002-8648-213X;

Y.E. 0000-0001-6969-6649

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Yücel Erbilgin,

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp

Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,

İstanbul, Türkiye

E-mail: yucel.erbilgin@gmail.com

Submitted/Başvuru: 31.08.2020

Accepted/Kabul: 23.09.2020

Citation/Atf: Kucukcankurt F, Ng Hatırnaz O, Sayitoglu M, Erbilgin Y. *PTEN* and *AKT1* Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 114-121.

https://doi.org/10.26650/JARHS2020-788345



GİRİŞ

Lösemiler hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişen malignitelere aittir. Akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) bir alt grubu olan T hücreli ALL (T-ALL), pediatrik ALL'lerin %15'inde ve yetişkin ALL'lerin %25'inde görülen agresif ve heterojen bir hastalıktır. Güncel tedavi rejimleri ile B-hücreli ALL (B-ALL) hastalarının genel sağkalım oranları gelişmiş ülkelerde %90'lara ulaşmıştır. Ancak T-ALL hastalarının tedavi başarıları bu oranın altında kalmaktadır (1).

T-ALL patogenezi, T-hücre gelişiminde rol oynayan onkogenlerin aktivasyonu ve gelişim basamaklarındaki gen anlatım profili ile ilişkilidir. Sinyal iletili yollarında meydana gelen anormallikler, malign transformasyon, azalmış apoptozis ve kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanıp karsinogenezi indüklemektedir (2). Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletili yollarıdır (3,6).

PI3K/AKT sinyal yolağının bozulmuş aktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilendirilmekte ve birçok kanser türünde görülmektedir. PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazlara bağlanması ve heterodimerlerin regülatör bölgelerinde çapraz fosforilasyonun gerçekleşmesi ile tetiklenir. Bu sinyalizasyon olayında aktive olan PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz), PIP2'yi (Fosfatidilinositol bifosfat) fosforile eder, PIP2 ise PIP3'ü (Fosfatidilinositol trifosfat) fosforile eder. PIP3'ün fosforilasyonu ile AKT (AKT serin/treonin kinaz 1) aktive olur ve hedefinde bulunan hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, hücre göçü gibi süreçlerin aktivasyonunu sağlar (7,8). Çift yönlü bir lipid fosfataz olan PTEN (Tensin benzeri tümör baskılayıcı fosfataz), PI3K'nın ürünü olan PIP2 ve PIP3'ü defosforile ederek AKT sinyalini durdurur ve bu yolda negatif düzenleyici olarak görev yapar (9). Fosforile AKT'nin aşırı anlatımı genomik ve kromozomal instabilite ile ilişkilidir ve AKT aktivasyonu lökogenезi tetikleyebilir (10).

Somatik mutasyonlar, epigenetik değişimler veya post-transkripsiyonel modifikasyonlar sonucu *PTEN*'in susturularak inaktif hale gelmesi çeşitli kan-

serlerin oluşumuna katkı sağlamaktadır (11,16). T-ALL hastalarında artmış PI3K/AKT sinyal aktivasyonu ve *PTEN* inaktivasyonu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (17). Ayrıca PI3K/AKT yolağındaki bozukluklar akut lösemilerde tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (18,20).

Bu çalışma kapsamında, çocukluk çağı T-ALL hasta grubunda *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile belirlenerek prognostik etkisi değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi ve Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2000-2013 yılları arasında T-ALL tanısı almış, 39 çocukluk çağı T-ALL hastasının tanı zamanı kemik iliği örneklerinden edilen arşiv materyal ile çalışılmıştır. Hastaların yasal vasilerinden onam yazılı ve sözlü onam alınmıştır. Çalışmamız İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından, 07.11.2013 tarih ve 283 sayısı ile onaylanmıştır.

T-ALL hücre gelişimini tamamlayamamış erken T-hücre öncüllerinin herhangi bir gelişim basamağında bloke olması ve kontrolsüz proliferasyonu ile sonuçlanan bir kanserdir. Bu hücre popülasyonunu temsil eden en uygun kontrol gurubu, T-lenfositlerinin gelişimlerini gerçekleştirdiği timüs dokusunda bulunmaktadır. Bu amaçla açık kalp ameliyatlarından atık opere materyal olarak elde edilen, 23.06.2011 tarih ve 183 sayısı ile etik kurul onayı alınmış timüs dokularından izole edilen (21,22) olgunlaşmamış T-lenfositleri kontrol örneği olarak kullanılmıştır.

Hastaların yedisi kız, otuz iki tanesi erkektir ve medyan yaş 8 (min: 9 ay; maks: 17 yıl) olup, immünofenotip raporlarına göre kemik iliği blast yükleri %80 ve üzeridir. T-ALL hastaları EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia) sınıflandırması kullanılarak CD7, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 pozitifliğine göre değerlendirilmiş ve immatür (CD1a- CD2+ CCD3+ CD3- CD5+ CD7+) (n=12), kortikal (CD1a+ CD2+ CCD3+ CD3+/- CD5+ CD7+) (n=13) ve matür (CD1a- CD2+ CCD3+ CD3+ CD5+ CD7+ ve CD4+/CD8+) (n=6) olarak ayrılmıştır (23) ancak sekiz hasta sınırlı im-

Tablo 1. Çocukluk çağı T-ALL hastalarının klinik özellikleri

Klinik Özellikler	Olgu sayısı (%) (n=39)
Trombosit ($10^9/L$) Medyan (min-maks)	124000 (5400-450000)
Beyaz kan hücresi ($10^9/L$) Medyan (min-maks)	128000 (1300-417900)
Hemoglobin (g/dL) Medyan (min-maks)	10 (1,2-14,7)
Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu, n (%)	
Evet	10 (25,6)
Hayır	20 (51,3)
Bilinmiyor	9 (23,1)
Risk grubu, n (%)	
Orta	12 (30,8)
Yüksek	12 (30,8)
Bilinmiyor	15 (30,8)
33. gün kemoterapi yanıtı, n (%)	
Evet	24 (61,5)
Hayır	6 (15,4)
Bilinmiyor	9 (23,1)
Nüks, n (%)	
Evet	8 (20,5)
Hayır	31 (79,5)
Son durum, n (%)	
Yaşayan	17 (43,6)
Yaşamayan	14 (35,9)
Bilinmiyor	8 (20,5)

münolojik belirteç bilgisi nedeniyle sınıflandırılmamıştır. Hastalardan ancak altı tanesinin sitogenetik verisi mevcut olup; beşi hipodiploidi, bir tanesi hiperdiploididir. Bu hastaların *PTEN* (10q23.32) ve *AKT1* (14q32.33) gen bölgelerinde kromozomal bir değişim belirlenmemiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PZR

Kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) protokolü kullanılarak gerçekleştirildi ve genetik analiz yapılabildiği kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. RNA miktarı ve kalitesi spektrofotometre ölçümleri ile belirlendi. Bin nanogram total RNA, random heksamer (50 μM) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Amerika) ve Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) ters transkriptaz enzimi (200 U/ μL) (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Çocukluk çağı T-ALL hastaları (n=39) ve kontrollerde *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım profilleri gerçek

zamanlı kantitatif PZR ile tespit edildi ve referans gen olarak *SIKLOFILIN-A (CYPA)* kullanıldı. *CYPA* geni için, NM_021130.4 dizisi referans alınarak, 48 no'lu UPL (Roche, Life Science, Germany) prob ile ileri primer 5'TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG3' ve geri primer 5'CTTCTTGCTGGTCTTGCCAT-TCC3' dizileri kullanıldı. *PTEN* geni için NM_000314.4 dizisi referans alınarak, 60 no'lu UPL prob ile ileri primer 5'GCACAAGAGGCCCTA-GATTTC3' ve geri primer 5'CGCCTCTGACTGGGAATAGT3' dizileri, *AKT1* geni için, NM_005163.2 dizisi referans alınarak 69 no'lu UPL prob ile ileri primer 5'GGCTATTGTGAAGGAGGGTTG 3' ve geri primer 5'TCCTTGTAGCCAATGAAGGTG 3' dizileri kullanıldı. *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları, Light Cycler 480 Prob Master Mix (Roche) kullanılarak, Light Cycler 480 cihazında (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) gerçekleştirildi. Daha önce yaptığımız çalışmada, T-ALL örnekleri için referans gen seçiminde GeNorm yazılımı (V3.4, Amel Belçika) kullanılmış ve en stabil genlerden biri olan *CYPA* referans gen olarak tercih edilmiştir (22). Bu doğrultuda çalışmamızda *CYPA* referans gen olarak çalışılmıştır. Referans ve hedef genlere yönelik primer-prob tasarımları ProbeFinder Assay Design yazılımı (Roche Molecular System) kullanılarak gerçekleştirildi. Hidroliz problemleri kullanılarak yapılan çalışmada, tüm örnekler referans gen ve hedef genler için duplike olarak çalışıldı. Duplike örneklerin ortalama Ct değerleri alındı ve hedef genlerin anlatım düzeyleri, ΔCt metoduna göre rölâtif olarak hesaplandı (24). Hedef genler ve referans genlerin PZR etkinliği seri dilüsyonlar yapılarak LightCycler (LightCycler software 4.1, Roche Life Science) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

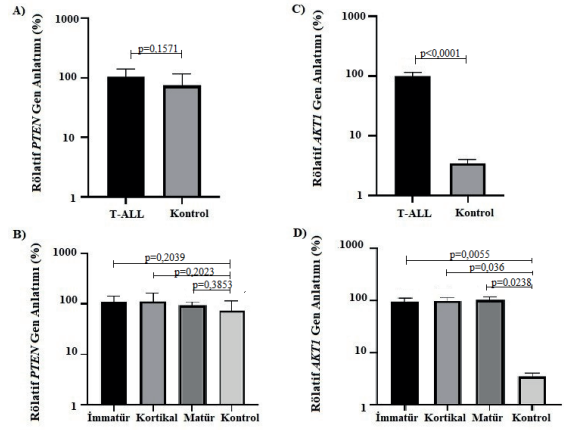
Örneklerin rölâtif mRNA düzeylerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı ve *P* değeri 0,05'in altındaki örnekler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Medyan üzerinde kalan değerler yüksek anlatım değerleri olarak belirlendi ve tüm analizler medyan altı ve medyan üstü olarak gerçekleştirildi. Pearson korelasyon testi ile *AKT1* ve *PTEN* gen anlatımları arasında

bir ilişki olup olmadığı incelendi. Sağkalım analizlerinde Kaplan-Meier metodu kullanıldı. Genel sağkalım (GS) süresi, hastanın tanı anından ölüm tarihine ya da son kontrol tarihine kadar olan süreyi ifade etmektedir. Hastalısız sağkalım (HS) ise, hastanın remisyona girdiği tarihten nüks görülme tarihine kadar veya nüks olmadan son kontrol tarihine kadar geçen süre olarak hesaplandı. Yaşam süresi üzerinde kemoterapi ve son durum değişkenlerinin etkisi Cox regresyon modeli ile gösterildi. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 19.0 (IBM SPSS Data Editor Inc., Chicago, IL, USA) ve GraphPad Prism 8 yazılımları (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

T-ALL hastalardaki (n=39) *PTEN* gen anlatımının sağlıklı timosit örnekleri ile benzer gen anlatım düzeyine sahip olduğu (p=0,1571) saptanırken (Şekil 1A), *AKT1* gen anlatımının kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0,0001) (Şekil 1C). T-ALL hastaları timosit farklılaşmasına göre immatür (n=12), kortikal (n=13) ve matür (n=6) olmak üzere üç gruba ayrılarak, *PTEN* ve *AKT1* anlatım düzeyleri kontrollere karşılaştırıldı. Tüm hastaların (n=39) %53,8'inde *AKT1* gen anlatım seviyesinin arttığı belirlendi. İmmatür fenotipteki hastaların %50'sinde (p=0,0055), kortikal fenotipteki hastaların %43,75'inde (p=0,0036) ve matür fenotipteki hastaların %50'sinde (p=0,0238) kontrollere oranla anlamlı olarak artmış *AKT1* gen anlatımı belirlendi (Şekil 1D). *PTEN* gen anlatımı açısından ise immunfenotip grupları ile kontrollere arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi (immatür (p=0,2039), kortikal (p=0,2023) ve matür (p=0,3853)) (Şekil 1B). Hastaların *PTEN* ve *AKT1* gen ifadesi değişimlerinin karşılıklı olarak incelenmesi için Pearson korelasyon testi yapıldı. %95 güven aralığı -0,5452 ile 0,05119 arasında olup, korelasyon katsayısı r=-0,2730, p=0,0972 olarak bulundu.

Çocukluk çağı T-ALL hastalarının klinik bulguları, tanı zamanı beyaz kan hücre sayısı (>100,000 ve <100,000 (10⁹/L)), trombosit sayısı (>100,000 ve <100,000 (10⁹/L)), hemoglobin düzeyi (>10 dL ve <10 dL), yaş (0-2 yıl, 2-10 yıl ve >10 yıl), cinsiyet (kız/erkek), organ tutulumu (var/yok), merkezi sinir sistemi tutu-



Şekil 1. Çocukluk çağı T-ALL hastalarında *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım sonuçları. A) Çocukluk çağı T-ALL hastalardaki (n=39) *PTEN* gen anlatımının sağlıklı timosit örnekleri ile benzer gen anlatım düzeyine sahip olduğu (p=0,1571) belirlendi. B) Hastalar immunfenotiplerine göre ayrıldığında (immatür (n=12), kortikal (n=13), matür (n=6)) *PTEN* gen anlatımları kontrollere göre anlamlı farklılık göstermedi (immatür (p=0,2039), kortikal (p=0,2023), matür (p=0,3853)). C) Çocukluk çağı T-ALL hastalardaki (n=39) *AKT1* gen anlatımının ise kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0,0001). D) Hastalar immunfenotiplerine göre ayrıldığında (immatür (n=12), kortikal (n=13), matür (n=6)) *AKT1* gen anlatımları kontrollere oranla arttığı belirlendi (immatür (p= 0,0055) ve kortikal (p= 0,0036), matür (p= 0,0238))

lumu (var/yok) ve risk grupları (orta/yüksek) için, *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım seviyeleri incelendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı.

Yaşam analizi sonuçlarında, *PTEN* (GS p=0,47; HS p=0,63) ve *AKT1* (GS p=0,52; HS p=0,50) gen anlatımlarının genel sağ kalım ve hastalısız sağkalım üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. Bunun yanında, Cox regresyon analizleri sonucunda, azalmış *PTEN* gen anlatımı ile 33. gün kemoterapi yanıtının ilişkisi incelendiğinde, genel ve hastalısız sağ kalımın azaldığı belirlendi (GS p=0,026; HS p=0,048). Artmış *AKT1* gen anlatımı ile 33. gün kemoterapi yanıtının ilişkisi incelendiğinde, *AKT1* gen anlatımı artmış ve 33. gün yanıtı olmayan hastalarda genel sağkalımın azaldığı belirlendi (GS p=0,034) ancak hastalısız sağ kalım ile ilişki belirlenemedi (HS p=0,09).

TARTIŞMA

AKT1, hücre proliferasyonu, olgunlaşması, yaşam süresi ve hücre döngüsünün kontrolünde rol alan onkogenik bir serin/treonin kinazdır. Artmış *AKT1*

anlatımının karsinogenezi tetiklediği bilinmektedir. *AKT1*'in aşırı anlatımına özellikle mide, meme, kolon, over, pankreas, tiroid kanserlerinde ve glioblastomada rastlanmaktadır (25-29). Çalışmamızda, *AKT1* gen anlatımının immatür, kortikal ve matür T-ALL hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. AKT aktivasyonu pro-apoptotik protein olan BAD ve FOXO3'ü inhibe ederek apoptozun baskılanmasına neden olabilir (30). Ayrıca, *PTEN*/*AKT* yolağı, hızlı proliferen olan kanser hücrelerinin kullandığı aerobik glikoliz üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve AKT'nin aşırı anlatımı, glikozun hücre içine alınımını uyarmaktadır (31). *PTEN* inaktivasyonu sonucunda AKT yolağının ektopik aktivasyonu T-ALL hastalarında gösterilmiştir (17,20,32). Bu çalışmada, bir grup çocukluk çağı T-ALL hastasının %53,8'inde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak *AKT1* gen anlatımı artışı saptanmıştır. T-ALL hastalarının %5-18'inde *PTEN*/*AKT1* aktivasyonuna yol açan mutasyonlar gösterilmiştir (17,33). Ancak, nadir *AKT1* gen mutasyonları hastaların çok büyük kısmında görülen yüksek gen anlatımını açıklayamamaktadır. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi kısıtlı proje bütçesi nedeni ile bulguların protein verisi ile desteklenememesidir. *AKT1* gen anlatımının *AKT1* protein anlatımı ile uyum gösterdiği bildirilmiştir (34). Kanserde anormal Akt sinyal aktivasyonunu kontrol eden çok sayıda mekanizma ortaya çıkartılmıştır. PI3K/*AKT* yolağı, tüm genom DNA metilasyonunu azaltarak transkripsiyonel aktivasyonu tetiklediği ve lokusa özgü DNA hipometilasyonu da düzenlediği bildirilmiştir. Fosforilasyon ve defosforilasyon, Akt sinyal aktivasyonunu yönlendiren birincil mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra ubiquitinasyon ve sumolasyon gibi diğer posttranslasyonel değişikliklerin de Akt sinyal aktivasyonu için fosforilasyon kadar önemli olduğu gösterilmiştir (35).

PTEN/*AKT* sinyal transdüksiyon kaskadının aşırı aktivasyonu birçok tümör hücresinde görülmekte ve çoklu ilaç direncinin gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda artmış *AKT1* anlatımı, farklı kemoterapi ajanlarına ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir (36,37). *AKT* inhibitörlerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda,

sinyal yolağının baskılanması ile çoklu ilaç direncinin üstesinden gelinerek, kemoterapötik ajanlara karşı sasiyetin arttığı bildirilmiştir (38). Çalışmamızda, medyanın üzerinde *AKT1* gen anlatımı gösteren hastalar ile düşük *AKT1* gen anlatımı gösteren hastalar arasında tedavi yanıtı ile ilişkili olarak bir farklılık belirlenmemiştir. T-ALL hastalarının tedavi yanıtlarının B-ALL alt grubuna nazaran daha kötü olduğu bilinmektedir (39,40). Bu doğrultuda, kohortumuzdaki hastaların %53,8 'inde artmış *AKT1* gen anlatımı gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda hastaların tedavi yanıtı açısından *AKT1* düzeylerinde farklılık göstermemeleri çok da şaşırtıcı değildir. Ancak yine de T-ALL örnekleri içerisinde, daha kötü ve daha iyi prognoza sahip olan örneklerin ayrıştırılmasında *AKT1* gen anlatımının bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağına yönelik daha geniş sayıdaki kohortlarda analizlerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. Genel ve hastalısız sağkalım analizleri ile gen anlatım düzeyleri arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Ancak hastaların indüksiyon tedavisine verdikleri cevaplar ile sağkalım oranları arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. *AKT1* gen anlatımı düşük olan hastaların indüksiyon tedavisine yanıt verdikleri ve genel sağkalımın arttığı belirlenmiştir.

Tümör baskılayıcı özelliği nedeniyle *PTEN* gen anlatımı hücrelerin malign transformasyonunun baskılanması için kritiktir. *PTEN* gen anlatım seviyesi kanser türlerine göre değişkenlik göstermektedir. Bizim çalışma grubumuzda *PTEN* gen anlatımı kontrol örneklerinden farklılık bulunmamıştır. Silva A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma gen anlatım profili bakımından bizim bulgularımızı desteklemekle birlikte, T-ALL hastalarında, *PTEN* protein anlatımlarının arttığını ve post-translasyonel değişimlere bağlı olarak PI3K/Akt yolağının artmış aktivasyonu da göstermiştir (17). Gen anlatım düzeyinde anlamlı değişim olmamasına karşın, *PTEN*'in post translasyonel değişimleri ve mutasyonları, *PTEN*'in fonksiyonel olarak baskılanmasına neden olabilmektedir.

Hastaların indüksiyon tedavi yanıtları ve sağkalım oranları bakımından ele alındığında daha yüksek (medyan üzeri) *PTEN* gen anlatımı gösteren hastaların tedavi yanıtlarının daha iyi olduğu görülmüştür.

PTEN gen anlatımı yokluğunda T-ALL hücre hatlarının γ -sekretaz inhibitörlerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca, T-ALL'de glukokortikoid direnci ile ilişkili transkripsiyonel süreçleri modüle eden sinyalizasyon faktörlerinin in-siliko analizinde, AKT1'in glukokortikoid direncinin sürücü olarak potansiyel bir rolüne işaret ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *PTEN* kaybı ile artmış AKT1 fosforilasyonunun klinikte primer glukokortikoid direncine neden olduğu gösterilmiştir (36,19,42).

SONUÇ

PTEN/*AKT* sinyal ileti yolağı, tümörögenез ile bağlantılı olduğu için, çeşitli anti-neoplastik ajanlarla bu yolağın inaktivasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Çok sayıda çalışma, AKT'nin hücrel proliferasyon aracısı olduğunu ve ilaç geliştirmek için etkili bir hedef olabileceği yönünde bulgular sunmaktadır. Çalışmamızda, T-ALL örneklerinde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak artmış *AKT1* gen anlatımının varlığı ve indüksiyon tedavisi yanıtları ile ilişkisi gösterilmiştir. T-ALL'lerdeki tedavi başarısızlığının üstesinden gelinebilmesi için alternatif tedavi protokolleri ya da yeni hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Özgün ve geniş hasta gruplarında gerçekleştirilecek çalışmalar ve saptanan prognostik ilişkiler bahsi geçen yukarıda söz edilen alternatif tedavilere ışık tutacaktır. Son yıllarda geliştirilen AKT yolağı spesifik inhibitörleri de kanser tedavisi için umut vaat etmektedir.

Teşekkür: Hasta materyallerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Zeynep Karakaş ve Prof. Dr. Tiraje Çelkan'a teşekkür ederiz.

Acknowledgements: We would like to thank Prof. Dr. Zeynep Karakaş and Prof. Dr. Tiraje Çelkan for their contribution in providing patient materials.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (tarih 07.11.2013 ve no 283).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University İstanbul Faculty of Medicine. (date 07.11.2013 and number 283).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazarlık Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.S., Ö.H.N., Y.E.; Veri Toplama- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Veri Analizi/Yorumlama-F.K., Y.E., M.S.; Yazı Taslağı- F.K., Y.E., M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Y.E., M.S., Ö.H.N.; Son Onay ve Sorumluluk- F.K., Ö.H.N., M.S., Y.E.; Malzeme ve Teknik Destek- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Süpervizyon- M.S.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.S., Ö.H.N., Y.E.; Data Acquisition- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Data Analysis/Interpretation- F.K., Y.E., M.S.; Drafting Manuscript- F.K., Y.E., M.S.; Critical Revision of Manuscript- Y.E., M.S., Ö.H.N.; Final Approval and Accountability- F.K., Ö.H.N., M.S., Y.E.; Technical or Material Support- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Supervision- M.S.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 48185) ve İstanbul Kalkınma Ajansı, Geleceğe Yatırım: BİYOBANKA projesi (Proje No: TR10/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No: 48185) and Istanbul Development Agency, Investment in the Future: BİYOBANKA project (Project No: TR10 / 15 / YNK / 0093).

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2017;49:1211–8.
- Ferrando A. Can one target T-cell ALL? *Best Pract Res. Clin Haematol.* 2018;31(4);361–6.

3. Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, Matsuda S. *PI3K/AKT/PTEN* signaling as a molecular target in leukemia angiogenesis. *Advances in Hematology*. 2012.
4. Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med*. 2016;67:11–28.
5. Worby CA, Dixon JE. *PTEN*. *Annu Rev Biochem*. 2014; 83(1):641–69.
6. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N et al. *PTEN*: Multiple functions in human malignant tumors. *Front Oncol*. 2015;16(5):24.
7. Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. Aberrantly activated anti-apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets. *Br J Haematol*. 2011;153(5):545–56.
8. Shi Y, Paluch BE, Wang X, Jiang X. *PTEN* at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(20):4687–92.
9. Chalhoub N, Baker SJ. *PTEN* and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127–50.
10. Kharas GM, Okabe R, JJ. Ganis, Gozo M, Khandan T, Paktinat M, Gilliland GD et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood*. 2010;115(7):1406–15.
11. Cai J, Xu L, Tang H, Yang Q, Yi X, Fang Y et al. The Role of the *PTEN/PI3K/Akt* Pathway on Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Oncologist*. 2014;19(5):528–35.
12. Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira S-M, Garcia-Echeverria C et al. The role of *PTEN/Akt/PI3K* signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(1):268–73.
13. Panuzzo C, Crivellaro S, Carrà G, Guerrasio A, Saglio G, Morotti A. BCR-ABL promotes *PTEN* downregulation in chronic myeloid leukemia. *PLoS One*. 2014;9(10):e110682.
14. Podsypnina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM et al. Mutation of *Pten/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1563–8.
15. Philip C-A, Laskov I, Beauchamp M-C, Marques M, Amin O, Bitharas J et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. *BMC Cancer*. 2017;17(1):638.
16. Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, Bose S. *PTEN* promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer*. 2004;112(3):407–10.
17. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M et al. *PTEN* posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3762–74.
18. Mendes RD, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JPP. The relevance of *PTEN-AKT* in relation to NOTCH1-directed treatment strategies in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(9):1010–7.
19. Bandapalli OR, Zimmermann M, Kox C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD et al. NOTCH1 activation clinically antagonizes the unfavorable effect of *PTEN* inactivation in BFM-treated children with precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):928–36.
20. Paganin M, Grillo MF, Silvestri D, Scapinello G, Buldini B, Cazzaniga G et al. The presence of mutated and deleted *PTEN* is associated with an increased risk of relapse in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia treated with AIEOP-BFM ALL protocols. *Br J Haematol*. 2018;182(5):705–11.
21. Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR et al. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3322–6.
22. Ng OH, Erbilgin Y, Firtina S, Celkan T, Karakas Z, Aydogan G et al. Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4(3):e192.

23. Hoelzer D, Gökbuğet N. Diagnostik und therapie der akuten lymphatischen leukämie des erwachsenen. *Der Onkologe*. 2002;8:672-85.
24. Livak KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4): 402-8.
25. Hisamatsu Y, Oki E, Otsu H, Ando K, Saeki H, Tokunaga E et al. Effect of EGFR and p-AKT Overexpression on Chromosomal Instability in Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2016;23:1986-92.
26. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24(50):7455-64.
27. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1261-74.
28. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic Alterations and Aberrant Expression of Genes Related to the Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Signal Transduction Pathway in Glioblastomas. *Brain Pathology*. 2006;13(4):507-18.
29. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905-27.
30. Sandhöfer N, Metzeler KH, Rothenberg M, Herold T, Tiedt S, Groß V et al. Dual PI3K/mTOR inhibition shows antileukemic activity in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):828-38
31. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31372-8.
32. Blackburn JS, Liu S, Wilder JL, Dobrinski KP, Lobbardi R, Moore FE et al. Clonal evolution enhances leukemia-propagating cell frequency in T cell acute lymphoblastic leukemia through Akt/mTORC1 pathway activation. *Cancer Cell*. 2014;25(3):366-78.
33. Küçükçankurt F, Erbilgin Y, Fırtına S, Ng ÖH, Karakaş Z, Çelkan T, et al. *PTEN* and *AKT1* variations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Hematol*. 2020;37(2):98-103.
34. Naderali E, Valipour B, Khaki AA, Rad JS, Alihemmati A, Rahmati M, et al. Positive effects of PI3K/Akt signaling inhibition on *PTEN* and P53 in prevention of acute lymphoblastic leukemia tumor cells. *Adv Pharm Bull*. 2019; 9(3):470-80.
35. Chan CH, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou PC, Logothetis C, et al. Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci*. 2014;4(1):59.
36. Piovan E, Yu J, Tosello V, Herranz D, Ambesi-Impimato A, DaSilva AC et al. Direct Reversal of Glucocorticoid Resistance by AKT Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2013;24(6):766-76.
37. Mao Z, Zhou J, Luan J, Sheng W, Shen X, Dong X. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2013;68(2):179-83.
38. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014;28(4):739-48.
39. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):2938-48.
40. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013; 381(9881):1943-55.
41. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of *PTEN* induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*. 2007;13(10):1203-10
42. Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, et al. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(1):83-9.