

Familija Bcl 2 proteina kod malignih bolesti

Goran Brajušković*, Anđelija Škaro Milić*, Snežana Cerović*, Slobodan Marjanović†, Slavica Knežević Ušaj*, Milica Čizmić‡, Jovan Dimitrijević*

Vojnomedicinska akademija, *Institut za patologiju, †Klinika za hematologiju, ‡Klinika za endokrinologiju, Beograd

K l j u č n e r e č i : neoplazme; apoptoza; ćelija, neoplastička transformacija; proteini, protoonkogeni, c-bcl-2.

Key words : neoplasms; apoptosis; cell transformation, neoplastic; proto-oncogene proteins c-bcl-2.

Uvod

Programirana ćelijska smrt (apoptoza), zajedno sa rastom i diferencijacijom, predstavlja sastavni deo životnog ciklusa ćelije. Homeostatska kontrola ćelijskog broja ostvaruje se dinamičnim balansom dva suprotna procesa: ćelijske proliferacije i smrti ćelije po tipu apoptoze (1). Apoptoza je opisana kako u normalnim fiziološkim uslovima (tokom procesa embriogeneze, diferencijacije i u procesima razvoja i regulacije imunskog sistema) tako i u nizu patoloških stanja organizma (2). Poremećaji tokom programirane ćelijske smrti predstavljaju molekulsko-biološku osnovu mnogih oboljenja (3, 4). Postoji niz bolesti kod kojih dolazi do inhibicije procesa apoptoze. To su pre svega maligne bolesti koje karakteriše narušavanje homeostaze tkiva u pravcu nekontrolisane proliferacije neoplastički transformisanih ćelija. Procesi neoplastičke transformacije uzrokuju i poremećaje koji dovode do inhibicije ćelijskog umiranja apoptozom (5). Inhibicija procesa apoptoze detektovana je u brojnim autoimunskim oboljenjima (6). Istovremeno, postoje mnoge bolesti kod kojih dolazi do stimulacije procesa apoptoze. U prvom redu to su neurodegenerativna oboljenja kao što su Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest i amiotrofička lateralna skleroza (2, 7, 8). Progresivno umiranje CD4⁺ limfocita procesom apoptoze detektovano je kod HIV inficiranih bolesnika (9, 10). Ishemijska oštećenja srca, Hashimoto tireoiditis i eritematozni sistemski lupus samo su neke od bolesti koje takođe odlikuje stimulacija procesa apoptoze (11). Apoptoza kao genski regulisan proces glavna je tema brojnih molekulsko-bioloških studija koje se bave patofiziološkim mehanizmima nastanka i lečenja humanih bo-

lesti. Indukcija apoptoze antineoplastičkim agensima predstavlja povoljan prognostički parametar u lečenju malignih bolesti. Bcl 2 familija gena kodira heterogenu grupu proteina koji predstavljaju ključne intracelularne modulatore (regulatore) ćelijskog umiranja po tipu apoptoze (12). Otkrićem Bcl 2 gena, 1984. godine, Bcl 2 familija proteina postaje posebno istraživana oblast zbog izuzetnog značaja za razumevanje molekulsko-bioloških mehanizama koji leže u osnovi procesa apoptoze. Poslednjih godina naročito se istražuju antiapoptozni članovi Bcl 2 familije proteina i predstavljaju osnovu za razvoj nove generacije bioloških agensa koji bi se koristili u lečenju malignih bolesti (1–5).

Bcl 2 familija proteina

Prvootkriveni član Bcl 2 familije gena bio je antiapoptotski protoonkogen bcl 2 (B-cell leukemia/lymphoma 2). Gen je lokalizovan na q kraku (q21.3 lokus) 18 hromosoma a otkrio ga je 1984. godine Tsujimoto sa saradnicima, tokom ispitivanja ćelijske linije akutne B leukemije sa t(14;18) (13). Dalja istraživanja na uzorcima periferne krvi bolesnika sa folikularnim limfomom pokazala su da se bcl 2 protoonkogen upravo aktivira ovom hromosomskom translokacijom (14, 15). Translokacija t(14;18)(q32;q21) se detektuje u oko 85% folikularnih i u 20–30% difuznih B ćelijskih limfoma. Ovom translokacijom bcl 2 gen se prebacuje u lokus teškog lanca imunoglobulina, što dovodi do visokog nivoa ekspresije gena, odnosno do uvećanja količine njegovog proteinskog produkta (16–18). Bcl 2 je intracelularni, 26kDa težak, membranski protein lokalizovan u membrana mitohondrija, endodoplazmatskog retikuluma i u spolja-

šnjoj membrani jedarnog ovoja (12, 19). Nakon Bcl 2 proteina otkrivena je čitava familija homologih proteina od kojih neki imaju stimulatorni, a drugi inhibitorni efekat na proces apoptoze (20).

Kao koimunoprecipitat Bcl 2 proteina, prvootkriveni proapoptozni homolog bio je Bax (Bcl 2-associated X) protein (21, 22). To je 21kDa težak intracelularni protein pretežno lociran u citoplazmi (23). U humanim ćelijama, do sada je otkriveno 19 članova ove familije proteina (Sl. 1) (24–26).

Svi članovi Bcl 2 familije proteina sadrže najmanje jedan od četiri visoko konzervisana Bcl 2 homologa (BH) do-

miraju heterodimere sa Bcl 2 proteinom (28). Zbog izuzetnog značaja, odnos pro- i antiapoptoznih homo- i heterodimera smatra se vrstom autonomnog „ćelijskog reostata“ koji određuje vrstu ćelijske reakcije na dejstvo apoptoznog stimulusa (22, 24, 31). Međutim, postoje i suprotna mišljenja. Na osnovu rezultata eksperimentnog rada na transgenim miševima, Knudson i Korsmeyer zaključuju da Bcl 2 i Bax proteini mogu funkcionalno nezavisno regulisati proces apoptoze (34).

Pojedini autori smatraju da ključnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze ćelija sisara ima bcl-X gen. Alternativnom

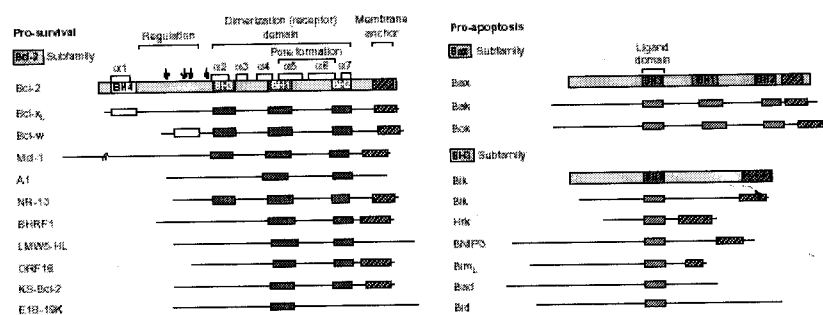
obradom primarnog transkripta ovog gena moguće je dobiti dva različita molekula iRNK, odnosno dva Bcl-X proteina: Bcl-XL i Bcl-Xs. Bcl-XL protein je strukturno i funkcionalno sličan Bcl 2 proteinu. Drugi protein Bcl-Xs u heterodimernoj kombinaciji sa Bcl 2 proteinom funkcioniše kao dominantni inhibitor Bcl 2 funkcije (35–37).

U mnogim ćelijskim linijama, pokazano je da kritičnu ulogu u procesu apoptoze indukovane

spoljašnjim stimulusom ima Bid protein (Bcl 2 interacting protein). Postoje eksperimentni dokazi, da slično Bax proteinu i Bid protein može da se veže za membrane mitohondrija i indukuje oslobađanje citohroma C (24, 38). Do istih rezultata došlo se za još jednog člana Bid subfamilije – Bik protein (Bcl 2 interacting killer) (39). Proapoptozni Bad protein (bcl-XL/bcl 2 associated death promoter homolog) sa visokim afinitetom vezivanja za Bcl-XL protein, podstiče stimulatorno dejstvo homodimera Bax/Bax na indukciju procesa apoptoze. U uslovima kada na ćeliju deluju faktori koji inhibišu proces apoptoze, dolazi do inaktivacije Bad proteina. Tako je Korsmeyer pokazao, da u uslovima kada na ćeliju deluje interleukin 3, dolazi do inaktivacije Bad proteina i to fosforilacijom pomognutom enzimom nazvanim protein 14-3-3. Fosforilacija Bad proteina na pozicijama Ser-112 i Ser-136 indirektno favorizuje antiapoptozno dejstvo Bcl-XL proteina na proces apoptoze (12, 22, 30, 36).

Pored formiranja dimera (protein – protein interakcije) i neka druga intracelularna dešavanja utiču na funkcionalnost Bcl 2 familije proteina u uslovima delovanja apoptoznog stimulusa. Uz post-translacione modifikacije (kao što je fosforilacija) i konformacione promene proteinskog lanca utiču na njegovu funkcionalnost. Do tog zaključka se došlo nakon ispitivanja trodimenzionalne strukture dva proapoptozna proteina Bax i Bid. Rezultati ovih studija pokazali su da konformacione promene u strukturi peptidnih lanaca značajno utiču na biološku funkciju ova dva proteina (22).

Pored posttranslacionih modifikacija na nivou proteina i protein – protein interakcija, dokazani su i direktni mehanizmi regulacije genske ekspresije proapoptoznih članova bcl 2 familije gena u uslovima dejstva apoptoznog stimulu-



Sl. 1 – Struktura proteinskih lanaca subfamilija Bcl 2 familije proteina (BH1 – BH4 homologi domeni). Modifikovano prema Adamsu (12).

mena (BH1-BH4) (12, 24–28). Većina antiapoptoznih članova Bcl 2 familije proteina, kao što su na primer Bcl 2 i Bcl –XL proteini, sadrže sva četiri homologa domena. Na osnovu broja homologih domena, proapoptozni proteini su podeljeni u dve subfamilije. Tri proteina Bax, Bak (BCL2-antagonist/killer) i Bok (Bcl-2-related ovarian killer) sadrže tri homologa domena BH1, BH2 i BH3 i oni pripadaju Bax subfamiliji proteina (12, 25). Ostalih 7 humanih proapoptoznih proteina (Bid subfamilija proteina) sadrže samo jedan BH domen. To je BH3 domen po kome su dobili i naziv proteini sa BH3 domenom (BH3 – only proteins) (12, 26, 28, 29).

Bcl 2 homologni domeni odgovorni su za procese homodimerizacije i heterodimerizacije članova Bcl 2 familije proteina. Zahvaljujući ovim BH domenima, heterodimere formiraju i proteini sa suprotnim dejstvom na proces apoptoze (12, 24, 27–30). Korsmeyer i sar., su dokazali da Bcl 2 i Bax proteini, zahvaljujući BH domenima, mogu formirati homodimere i heterodimere (21). Antiapoptozno dejstvo Bcl 2 proteina zasniva se na mogućnosti da veže Bax protein (u formi heterodimera) i tako onemogućiti stvaranje proapoptoznih Bax/Bax homodimera. Tokom indukcije procesa apoptoze, homodimeri Bax proteina formiraju kanale na membranama mitohondrija. Putem ovih kanala, mitohondrije napuštaju molekuli citohroma C koji je jedan od ključnih aktivatora izvršne faze procesa apoptoze (30). Na osnovu ovih saznanja, većina autora kao glavnu biološku ulogu Bcl 2 proteina u inhibiciji procesa apoptoze smatra njegovu sposobnost vezivanja za Bax protein i heterodimerizaciju neutralizaciju njegovog proapoptoznog dejstva (31–33). Slično Bax proteinu, i ostala dva člana njegove subfamilije for-

sa. U prvobitnim eksperimentnim istraživanjima pokazano je da je za transkripcionu aktivaciju humanog bax gena direktno odgovoran transkripcioni faktor p53 (40). U kasnijim istraživanjima je pokazano da je i ekspresija nekih članova Bid subfamiliije proteina regulisana transkripcionom aktivnošću proteinskog produkta proapoptoznog tumor supresornog gena p53 (41). Međutim, rezultatima najnovijih istraživanja na transgenim životinjama utvrđeno je da, za razliku od proteina Bid subfamiliije, ekspresija Bax proteina nije direktno regulisana p 53 proteinom (25).

Uloga Bcl 2 familije proteina u nastanku i lečenju malignih bolesti

Detekcija ekspresije Bcl 2 proteina predstavlja jednu od prvih savremenih molekulske-bioloških procedura koja svoju primenu nalazi u molekularnoj patologiji, savremenoj grani medicinske dijagnostike. Poslednjih 14 godina, detekcija t(14;18) i/ili povišeni nivo ekspresije Bcl 2 proteina predstavljaju biološki parametar u diferencijalnoj dijagnostici i prognostički parametar u lečenju folikularnih limfoma. Nalaz visoke ekspresije Bcl 2 proteina predstavlja negativan prognostički parametar za ishod lečenja bolesnika sa B ćelijskim limfomom visokog stepena malignosti (16, 42–45). Međutim, detekcija t(14;18) nije sama po sebi sinonim neoplastičke transformacije (45). Prema podacima iz literature ova translokacija je detektovana i u nekim uzorcima periferne krvi zdravih osoba (46). Jasno je da t(14;18) predstavlja samo jedan od genetskih (mutacionih) događaja tokom neoplastičke transformacije limfocita B u nastanku folikularnog limfoma (45).

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je maligna bolest koju karakteriše progresivna akumulacija zrelih, monoklonalnih, CD 5+ B ćelija u ranoj fazi (G₀/G₁) ćelijskog ciklusa. Smatra se da do akumulacije neoplastički transformisanih limfocita B (HLL ćelija) dolazi primarno zbog poremećaja, odnosno blokade procesa apoptoze (47–49). Konstantna i visoka ekspresija Bcl 2 proteina predstavlja jedan od bitnih faktora koji omogućavaju akumulaciju HLL ćelija (50–52). Brojnim istraživanjima je pokazano da citostatska terapija može da indukuje proces apoptoze HLL ćelija, što predstavlja pozitivan prognostički parametar u lečenju HLL (53, 54). Kolenko i saradnici smatraju da je visoka i konstantna ekspresija Bcl 2 proteina istovremeno odgovorna i za razvitak rezistencije ćelija HLL na antitumorske tretmane (55).

Eksperimentnim istraživanjima na transgenim miševima sa konstantno povišenom ekspresijom bcl 2 gena pokazano je da Bcl 2 protein indukuje neoplastičku transformaciju T limfocita, mijeloidnih ćelija i epitelnih ćelija sisara. Istraživanja drugih antiapoptoznih članova Bcl 2 familije proteina na istom model sistemu pokazala su da je konstantna i povišena ekspresija Bcl-Xl proteina u stanju da indukuje tumor β ćelija pankreasa, a ekspresija Mcl-1 gena da indukuje pojavu limfoma B ćelija (25).

Pored hematoloških neoplazmi, visok nivo ekspresije Bcl 2 proteina predstavlja negativan prognostički parametar

u lečenju malignog melanoma i kancera kolona. Eksperimentnim istraživanjima je pokazano da je visoka i konstantna ekspresija ovog proteina u tumorskim ćelijama u pozitivnoj korelaciji sa razvitkom njihove rezistencije na antitumorske tretmane (55).

Istraživanja van Golena i saradnika su pokazala da je povišeni nivo ekspresije Bcl 2 proteina u pozitivnoj korelaciji sa agresivnijim tumorskim rastom neuroblastoma (56). Kod bolesnika sa sitnoćelijskim karcinomom pluća povišen nivo ekspresije Bcl 2 i Bax proteina nije u korelaciji sa preživljavanjem bolesnika i/ili kliničkim odgovorom na primenu terapiju (57). Suprotno tome, ekspresija antiapoptoznih Bcl 2 i Bcl-Xl proteina koji su odgovorni za blokadu apoptozne reakcije na dejstvo antitumorskih tretmana (radijacija, citostatska terapija) predstavljaju negativne prognostičke parametre u lečenju tumora testisa (58).

Poslednjih godina u naučnoj javnosti preovladava mišljenje da svaki antiapoptozni član ove familije predstavlja protonkogen koji može biti uključen u razvoj maligne bolesti, a svaki proapoptozni član ove familije proteina može svoje biološko dejstvo u ćeliji ostvariti kao supresor tumora (12, 25, 45).

Bcl 2 familija proteina kao novi terapijski cilj u lečenju malignih bolesti

Bcl 2 familija proteina kao ključni regulator procesa apoptoze predstavlja glavni cilj u razvoju nove generacije terapijskih agensa koji bi se samostalno ili u kombinaciji sa poznatim antineoplastičkim agensima, koristili u lečenju malignih bolesti. To se posebno odnosi na tumore rezistentne na dejstvo antineoplastičkih agensa koji su danas u širokoj kliničkoj upotrebi (59–61).

Strategija novih istraživanja je usmerena u dva pravca. Prvi je povećanje osetljivosti tumorskih ćelija na indukciju apoptoze dejstvom drugih antineoplastičkih agensa. Drugi pravac istraživanja je usmeren na otkriće i komercijalnu proizvodnju novih bioloških agensa koji bi selektivno delovali na proteine Bcl 2 familije i koji bi se kao takvi samostalno koristili u lečenju malignih bolesti (59–62).

Kolenko i saradnici smatraju da redukcija Bcl 2 proteina na celularnom nivou (korišćenjem antisens tretmana ili intracelularnom ekspresijom antitela na ovaj protein) može olakšati dejstvo antineoplastičkog agensa u smislu indukcije procesa apoptoze tumorskih ćelija (55). Zahvaljujući poznavanju strukture bcl 2 gena sintetisano je nekoliko antisens oligonukleotida koji su u stanju da blokiraju i/ili redukuju ekspresiju bcl 2 gena (63). Preliminarna istraživanja *in vivo* dala su dobre rezultate. Upotreba antisens oligonukleotida na prvih šest kodona tzv. otvorenog okvira čitanja bcl 2 gena (G3139) pokazala je minimalnu toksičnost i izvesnu antitumorsku aktivnost kod bolesnika sa non-Hodžkinovim limfomom. Ovaj oligonukleotid, korišćen u kombinaciji sa citostatikom dakarbazinom, dao je još bolje rezultate kod bolesnika sa malignim melanomom. Prema skorašnjim publikovanim podacima kod bolesnika sa tumorom mokraćne be-

ške koji je bio rezistentan na hemioterapiju, primena anti-sens oligonukleotida na bcl 2 gen dovela je do redukcije mase tumora (61, 63).

Poslednjih godina ulažu se veliki naponi u otkrivanju tzv. malih molekula koji bi imali mogućnost istovremenog prepoznavanja površine proteinskog lanca antiapoptoznih Bcl 2 ili Bcl-Xl proteina i neutralizacije njihove biološke funkcije.

Dosadašnja istraživanja su usmerena u tri pravca: sintetska konstrukcija BH3 peptida i njihovih modifikovanih analoga koji bi imali mogućnost prodora kroz plazma membranu ćelija; otkriće prirodnih supstanci sa inhibitornim efektom na Bcl 2 protein i to studijama koje se baziraju na

metodama slučajnog izbora; i veštačkog konstruisanja ne-peptidskih molekula na osnovu poznate strukture antiaptoznih peptidnih lanaca korišćenjem novih tehnika sintetske tehnologije uz pomoć kompjutera (60, 64).

Pored krupnih koraka učinjenih na otkriću novih bioloških agensa, do danas nema odgovora na jedno od osnovnih pitanja vezanih za nove terapijske procedure u lečenju malignih bolesti: kojim mehanizmima se može postići selektivnost u dejstvu novih antitumorskih agensa? U ovom slučaju, selektivnost se odnosi na blokadu aktivnosti antiapoptoznih članova Bcl 2 familije proteina odnosno na aktivaciju procesa apoptoze samo tumorskih, a ne i normalnih ćelija jednog tkiva (1).

L I T E R A T U R A

1. Makin G, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1): 143–52.
2. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456–62.
3. Katoch B, Sebastian S, Sahdev S, Padh H, Hasnain SE, Begum R. Programmed cell death and its clinical implications. *Indian J Exp Biol* 2002; 40(5): 513–24.
4. Rutledge SE, Chin JW, Schepartz A. A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6(4): 479–85.
5. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 337–76.
6. Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Pathol Res Pract* 1996; 192(7): 676–83.
7. Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(2): 245–50.
8. Pompl PN, Yemul S, Xiang Z, Ho L, Haroutunian V, Purohit D, et al. Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003; 60(3): 369–76.
9. Razik MA, Cidlowski JA. Molecular interplay between ion channels and the regulation of apoptosis. *Biol Res* 2002; 35(2): 203–7.
10. Sperber K, Beuria P, Singha N, Gelman I, Cortes P, Chen H, et al. Induction of apoptosis by HIV-1-infected monocytic cells. *J Immunol* 2003; 170(3): 1566–78.
11. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107(5): 489–506.
12. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381): 1322–6.
13. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226(4678): 1097–9.
14. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228(4706): 1440–3.
15. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(14): 5214–8.
16. Pezzella F, Mason DY. The bcl-2 gene and 14;18 translocation in lymphoproliferative disorders. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; 32(6): 397–9.
17. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P, et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992; 140(5): 1089–95.
18. Corbally N, Grogan L, Dervan PA, Carney DN. The detection of specific gene rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma using the polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1992; 66(5): 805–9.
19. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53(19): 4701–14.
20. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.
21. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609–19.
22. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306(3): 347–61.

23. *Brady HJ, Gil-Gomez G, Bax.* The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(6): 647–50.
24. *Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.* The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57–70.
25. *Coultas L, Strasser A.* The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(2): 115–23.
26. *Tsujimoto Y.* Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 2003; 195(2): 158–67.
27. *Lutz RJ.* Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* 2000; 28(2): 51–6.
28. *van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P.* The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002; 9(10): 1031–42.
29. *Huang DC, Strasser A.* BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000; 103(6): 839–42.
30. *Korsmeyer SJ.* Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59(7 Suppl): 1693s–1700s.
31. *Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN.* Bcl 2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4(6): 327–32.
32. *Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, et al.* Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60(1): 23–32.
33. *Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavalalis M, Lock RB.* Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(1): 102–11.
34. *Knudson CM, Korsmeyer SJ.* Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 1997; 16(4): 358–63.
35. *Boise LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al.* bcl x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74(4): 597–608.
36. *McConkey DJ, Zhivotovsky B, Orrenius S.* Apoptosis – molecular mechanisms and biomedical implications. *Mol Aspects Med* 1996; 17(1): 1–110.
37. *Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR.* Bax-induces caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 1999; 274(4): 2225–33.
38. *Esposito MD.* The roles of Bid. *Apoptosis* 2002; 7(5): 433–40.
39. *Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Cusseau D, Chittenden T, et al.* The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther* 2001; 1(2): 95–102.
40. *Miyashita T, Reed JC.* Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80(2): 293–9.
41. *Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288(5468): 1053–8.
42. *Lim LC.* Molecular genetics of B-cell lymphomas: a review. *Ann Acad Med Singapore* 1996; 25(1): 37–41.
43. *Cook JR, Craig FE, Swerdlow SH.* bcl-2 expression by multicolor flow cytometric analysis assists in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(1): 145–51.
44. *Ladetto M, Drandi D, Compagno M, Astolfi M, Volpato F, Voena C, et al.* PCR-detectable nonneoplastic Bcl-2/IgH rearrangements are common in normal subjects and cancer patients at diagnosis but rare in subjects treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21(7): 1398–403.
45. *Mullauer L, Gruber P, Seibinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A.* Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; 488(3): 211–31.
46. *Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al.* Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1998; 85(9): 2528–36.
47. *Matutes E, Polliack A.* Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4(1): 22–47.
48. *Chiarugi V, Cinelli M, Magnelli L, Dello SP.* Apoptosis: molecular regulation of cell death and hematologic malignancies. *Mol Biotechnol* 2002; 20(3): 305–14.
49. *Brajušković G, Milić AS, Vukosavić S, Romac S, Cerović S, Knežević-Ušaj S, et al.* Apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(6 Suppl): 47–52. (in Serbian)
50. *Aviram A, Rabizadeh E, Zimra Y, Yesharon M, Marmelstein M, Shaklai M, et al.* Expression of bcl-2 and bax in cells isolated from B-chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease. *Eur J Haematol* 2000; 64(2): 80–4.
51. *Brajušković G, Vukosavić S, Cerović S, Knežević-Ušaj S, Marjanović S, Romac S, et al.* Expression of Bcl-2 protein family in B-lymphocytes of peripheral blood in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Vojnosanit Pregl.* 2004; 61(1): 41–6. (in Serbian)

52. Brajušković G, Marjanović S, Škaro-Milić A. In vivo monitoring of therapy-induced apoptotic process in patients with chronic lymphocytic leukemia and acute non-lymphoblastic leukemia. *Arch Oncol* 2002; 10(2): 55–60.
53. Brajušković G, Marjanović S, Škaro-Milić A. Effect of chlorambucil on B-lymphocytes in the peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia – study of cellular ultrastructure. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(2): 175–80. (in Serbian)
54. Marjanović S, Brajušković G, Škaro-Milić A, Malešević M. In vivo study of spontaneous and therapy-induced apoptosis in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with chlorambucil. *Vojnosanit Pregl* 1999; 56(4): 377–82. (in Serbian)
55. Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, Finke JH. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 2000; 5(1): 17–20.
56. van Golen CM, Castle VP, Feldman EL. IGF-I receptor activation and BCL-2 overexpression prevent early apoptotic events in human neuroblastoma. *Cell Death Differ* 2000; 7(7): 654–65.
57. Krug LM, Miller VA, Filippa DA, Venkatraman E, Ng KK, Kris MG. Bcl-2 and bax expression in advanced non-small cell lung cancer: lack of correlation with chemotherapy response or survival in patients treated with docetaxel plus vinorelbine. *Lung Cancer* 2003; 39(2): 139–43.
58. Arriola EL, Rodriguez-Lopez AM, Hickman JA, Chresta CM. Bcl 2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-XL and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene* 1999; 18(7): 1457–64.
59. Kliche KO, Hoffken K. The role of apoptosis in hematologic malignancies and modulation of apoptosis as a new therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(3–4): 226–31.
60. Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 2000; 19(56): 6627–31.
61. Makin G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6(1): 73–84.
62. Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol* 2001; 11(11): S22–6.
63. Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug desing. *Drug Discov Today* 2003; 8(2): 67–77.
64. Baell JB, Huang DC. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5–6): 851–63.

Rad je primljen 24. IV 2003. god.