



Ekspresija Bcl-2 proteina i amplifikacija c-myc gena kod bolesnika sa hroničnom granulocitnom leukemijom

Expression of Bcl-2 protein and the amplification of c-myc gene in patients with chronic myeloid leukemia

Milica Strnad*, Goran Brajušković*, Nataša Strelić†, Biljana Todorčić Živanović*,
Ljiljana Tukić‡, Dragana Stamatović‡

Vojnomedicinska akademija, *CPSM, Institut za patologiju, †Institut za medicinska
istraživanja, ‡Klinika za hematologiju, Beograd

Apstrakt

Uvod/Cilj. Hronična granulocitna leukemija (HGL) je maligna mijeloproliferativna bolest koja se razvija od pluripotentne matične ćelije hematopoeze koja nosi fuzioni bcr-abl gen. Poremećaji u procesu apoptoze predstavljaju jedan od mogućih molekularno bioloških mehanizama koji dovode do progresije bolesti. Cilj našeg istraživanja bio je da se izvrši analiza prisustva amplifikacije c-myc onkogene kao i promena u ekspresiji Bcl-2 proteina. **Metode.** Naše istraživanje je obuhvatilo 25 bolesnika sa HGL (18 u hroničnoj fazi, sedam u blastnoj transformaciji). Korišćenjem imunohistohemijske metode *alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase* (APAAP) analizirana je ekspresija Bcl-2 proteina u mononukleusnim ćelijama koštne srži. Genska amplifikacija c-myc gena u ćelijama periferne krvi ispitana je diferencijalnom PCR (*polymerase chain reaction*) metodom. **Rezultati.** Nivo ekspresije Bcl-2 proteina bio je značajno viši kod bolesnika koji su bili u blastnoj transformaciji bolesti. Amplifikacija c-myc onkogene je detektovana kod trećine bolesnika u blastnoj transformaciji bolesti. **Zaključak.** Povišena ekspresija Bcl-2 proteina i amplifikacija c-myc gena u korelaciji su sa kliničkim stadijumom bolesti.

Ključne reči:

leukemija, mijeloidna, hronična; proteini, protoonkogeni, c-bcl-2; geni, amplifikacija; prognoza.

Abstract

Background/Aim. Chronic myeloid leukemia (CML) represents a malignant myeloproliferative disease developed out of pluripotent hematopoietic stem cell that contains the fusion bcr-abl gene. Disorders that occur in the process of apoptosis represent one of the possible molecular mechanisms that bring about the disease progress. The aim of our study was to carry out the analysis of the presence of the amplification of the c-myc oncogene, as well as the analysis of the changes in the expression of Bcl-2 in the patients with CML. **Methods.** Our study included 25 patients with CML (18 in chronic phase, 7 in blast transformation). Using an immunohistochemical alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) method, we analyzed the expression of cell death protein in the mononuclear bone marrow cells of 25 CML patients. By a differential PCR (polymerase chain reaction) method, we followed the presence of amplified c-myc gene in mononuclear peripheral blood cells. **Results.** The level of the expression of Bcl-2 protein was considerably higher in the bone marrow samples of the patients undergoing blast transformation of the disease. The amplification of c-myc gene was detected in 30% of the patients in blast transformation of the disease. **Conclusion.** The expression of Bcl-2 protein and the amplification of c-myc gene are in correlation with the disease progression.

Key words:

leukemia, myeloid, chronic; proto-oncogene proteins c-bcl-2; gene amplification; prognosis.

Uvod

Hronična granulocitna leukemija (HGL) je maligna, mijeloproliferativna bolest sa klonalnom proliferacijom pluripotentne matične ćelije hematopoeze. Počinje relativno mirnom hroničnom fazom koja traje tri do pet godina, nakon koje sledi faza akceleracije koja se završava fatalnom blastnom transformacijom u kojoj bolesnik ima sve simptome

akutne leukemije. HGL čini oko 25% svih leukemija, a učestalost bolesti je oko 1,5 slučajeva u opštoj populaciji od 10⁵ osoba za godinu dana¹⁻³.

Centralnu ulogu u patogenezi HGL ima Filadelfija hromozom (Ph), koji nastaje kao rezultat recipročne translokacije između 9. i 22. hromozoma, pri čemu nastaje hibridni bcr-abl gen koji određuje sintezu proteina sa povišenom tirozin-kinaznom aktivnošću^{4,5}. Mehanizam koji dovodi do ovih

promena na molekulskom nivou još uvek je nepoznat, kao ni mehanizam povećane proliferativne sposobnosti ovih ćelija, niti mehanizam koji dovodi do progresije bolesti^{6,7}.

Postoje brojni eksperimentni dokazi da poremećaji u procesu apoptoze mogu imati značajan efekat na proces maligne transformacije. Apoptoza predstavlja kontrolisani način ćelijskog umiranja u kome ćelija aktivno učestvuje, sprovodeći precizan, genski regulisan program autodestrukcije, tj. ćelijskog „suicida“⁸. Iako je do sada identifikovan čitav niz biohemijских događaja koji dovode do stereotipnih morfoloških promena, mnogi molekularni mehanizmi koji učestvuju u procesu apoptoze još uvek nisu poznati⁹. „Odluka ćelije“ da uđe u proces apoptoze je kompleksna i zavisi od interakcije niza intra- i ekstraćelijskih, pro- i antiapoptotskih signala¹⁰. Proteinski produkti bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) familije gena, tumor supresorni gen p53, neki onkogeni (c-myc, ras), geni regulatori ćelijskog ciklusa, razni transkripcioni faktori, određene klase fosfataza i kinaza predstavljaju značajne intracelularne regulatore procesa apoptoze¹¹.

Bcl-2 familija proteina svoju ulogu ostvaruje menjajući propustljivost membrane mitohondrija, pa tako indirektno regulišu proces apoptoze preko oslobađanja citohroma c i aktivnosti kaspaza¹². U okviru ove familije neki proteini imaju stimulatorni (Bax, Bid, Bad), a drugi inhibitorni efekat na proces apoptoze (Bcl-2, Bcl-Xl). Od odnosa pro- i antiapoptotskih članova familije zavisi i odluka ćelije da li će ući u proces apoptoze^{13–15}. Gen koji određuje sintezu Bcl-2 proteina, teškog 25–26 kD, lociran je na dugom kraku 18. hromozoma (q21.3 lokus). Bcl-2 je integralni protein mitohondrijalne membrane, a nalazi se i u membrani endoplazmatičnog retikuluma i membrani jedara. Otkriven je kod B-ćelijskih limfoma kod kojih je u 85% slučajeva povišeno ekspresiran kao rezultat hromozomske translokacije između 14. i 18. hromozoma [t(14;18)(q32;q21)]^{16,17}. Povišen nivo ekspresije bcl-2 gena prisutan je kod 90% bolesnika sa neoplazmama debelog creva. Uočen je i kod 60% karcinoma gastrointestinalnog trakta, 30% karcinoma prostate kao i 20% nesitnoćelijskih karcinoma pluća. U različitim procentima se uočava i kod melanoma, karcinoma štitaste žlezde kao i kod akutnih i hroničnih limfocitnih i mijeloidnih leukemija^{18,19}. U ovim slučajevima povećana ekspresija bcl-2 gena nije uvek rezultat hromozomske translokacije, već još uvek nedovoljno poznatih mehanizama¹⁸.

Protoonkogen c-myc (*cellular myelocytomatosis*) lociran je na dugom kraku hromozoma 8 u regionu q24.12. Sadrži tri egzona koji daju proteinski produkt molekulske mase od 64, 67 ili 45 kD, što zavisi od alternativne obrade primarnog transkripta²⁰. Otkriven je sedamdesetih godina prošlog veka kao ćelijski homolog retroviralnog v-myc onkogen. Pripada familiji myc gena koja obuhvata B-myc, L-myc, N-myc i s-myc. Sposobnost neoplastičke transformacije imaju c-myc, L-myc i N-myc²¹. C-myc je jedarni fosfoprotein koji svoju ulogu ostvaruje kao transkripcioni faktor učestvujući u regulaciji ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Ekspresiran je u skoro svim ćelijama embrionalnog i adultnog tkiva koje se dele i njegova ekspresija je u korelaciji sa ćelijskom proliferacijom^{22–24}. C-myc protoonkogen povećano je ekspresiran u različitim animalnim i humanim neopla-

stičkim promenama. Mogući mehanizmi aktivacije c-myc onkogeni su hromozomske translokacije, viralne insercije, amplifikacija gena i mutacije koje menjaju nivo transkripcije i elongaciju ili menjaju stabilnost iRNK²¹. Hromozomske aberacije koje uključuju i c-myc onkogen uočene su kod mnogih tumora i leukemija i često su povezane sa lošijom prognozom²⁵. Amplifikacija c-myc uočava se u mnogim tumorima uključujući i tumor dojke, debelog creva, skvamoznog ćelijskog karcinoma glave i vrata, mijeloma, non-Hodžkin limfoma, adenokarcinoma želuca, karcinoma ovarijuma i grlića materice. Uglavnom je u korelaciji sa uznapredovalim stadijumom bolesti, što ukazuje da se može koristiti kao negativni prognostički parametar²¹.

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi da li su povišeni nivo ekspresije Bcl-2 proteina i amplifikacija c-myc gena u korelaciji sa kliničkim stadijumom bolesti i da li mogu predstavljati negativne prognostičke parametre u lečenju HGL.

Metode

Analizirano je 25 bolesnika sa kliničkom dijagnozom HGL, lečenih u periodu od novembra 2000. do jula 2003. Prvu grupu analiziranih bolesnika činilo je 18 bolesnika u hroničnoj fazi HGL. Ostalih sedam bolesnika, koji su bili u stadijumu blastne transformacije bolesti, činili su drugu grupu. U kontroloj grupi, obrađeno je pet uzoraka kostne srži nehematoloških bolesnika.

Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska analiza APAAP (*alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase*) rađena je na razmazima mononukleusne frakcije kostne srži bolesnika sa HGL. Ćelijski razmazi pravljani su centrifugiranjem na 5 000 obrtaja u minuti u trajanju od pet minuta u citospin centrifugi (Beckman, SAD) i sušeni na sobnoj temperaturi. Za imunohistohemijsko dokazivanje Bcl-2 proteina ćelijski razmazi su fiksirani u acetonu, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Korišćeno je monoklonsko antitelo za Bcl-2 protein i komercijalni kit firme DAKO (DAKO, Danska), prema uputstvu proizvođača.

Analiza rezultata APAAP metode za detekciju proteinskih produkata rađena je brojanjem pozitivnih ćelija. Brojanje je vršeno na najmanje tri homogene vidna polja (ukupno ne manje od 1 000 ćelija), svetlosnim mikroskopom (uvećanje 120 ×). Broj pozitivnih ćelija pokazan je kao procenat od ukupnog broja izbrojanih ćelija. Kriterijumi za ocenjivanje reakcije bili su: 1. bez pozitivnih ćelija (-); 2. sa manje od 5% pozitivnih ćelija (±); 3. 5–30% pozitivnih ćelija (+); 4. 30–60% pozitivnih ćelija (++); 5. 60–90% pozitivnih ćelija (+++); 5. sa više od 90% pozitivnih ćelija (++++).

Analiza amplifikacije c-myc gena

DNK je izolovana iz mononukleusnih ćelija periferne krvi prema metodi Sammbrooka²⁶. Koncentracije DNK određivane je spektrofotometrijski (Pharmacia LKB, Švedska) na 260 nm, a kvalitet je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Diferencijalna PCR (*polymerase chain reaction*) metoda korišćena je za amplifikaciju c-myc gena i kontrolnog D2R (dopamin D2 receptor) gena koji se konstitutivno eksprimira. Diferencijalni PCR zasniva se na simultanoj amplifikaciji dve ciljne sekvencije u istoj reakcionoj smeši, pri čemu relativna količina PCR produkata ukazuje na relativni broj gena. Sekvencije prajmera za c-myc i D2R, dužine amplifikata i uslovi PCR-a prikazani su u tabeli 1²⁷. Relativan broj c-myc i D2R gena određivan je, nakon elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, denzitometrijski (LKB, Ultro Scan XL Laser Densitometer).

70% ćelija i definisana kao +++ pozitivnost. Kod šest bolesnika (24%) u hroničnoj fazi bolesti reakcija na Bcl-2 protein bila je pozitivna u oko 30% ćelija i definisana kao ++ pozitivnost. Kod 12 bolesnika (48%) u hroničnoj fazi bolesti reakcija na Bcl-2 protein bila je pozitivna u 2–10% ćelija i definisana je kao + ili ± pozitivnost.

Status c-myc gena

Diferencijalnom amplifikacijom c-myc i D2R gena pokazano je prisustvo amplifikovanog c-myc gena kod dva (8%) od 25 analiziranih bolesnika (slika 2).

Tabela 1

Nukleotidne sekvencije prajmera, dužine amplifikovanih fragmenata i uslovi PCR-a koji su korišćeni za amplifikaciju c-myc i D2R gena

Gen	Nukleotidna sekvencija prajmera	Dužina amplifikata (bp)	Uslovi PCR*
c-myc	5' GCTCCAAGACGTTGTGTGTTTCG 3'	150	95 °C 2min
	5' GGAAGGACTATCTGCTGCCAA 3'		35 ciklusa:
			95 °C 1min
			50 °C 1min
			72 °C 1min
D2R	5' CCACTGAATCTGTCCTGGTATG 3'	110	
	5' GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG 3'		

*PCR – polymerase chain reaction

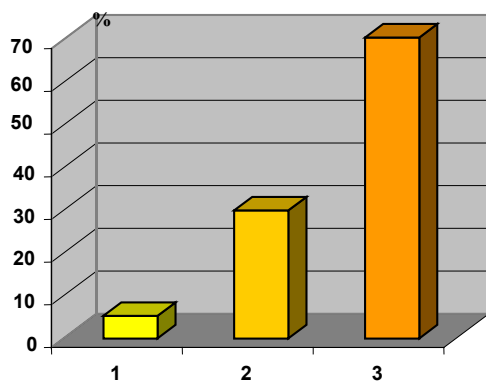
Statistička analiza

Podaci su analizirani primenom χ^2 testa. U ovoj analizi razlike su smatrane statistički značajnim kada je *p* vrednost bila manja od 0,05%.

Rezultati

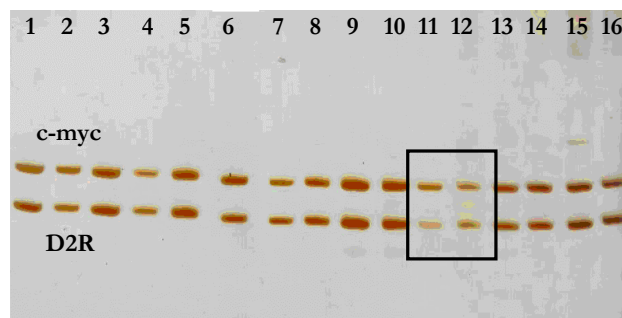
Rezultati imunohistohemijske analize

Reakcija na Bcl-2 protein bila je pozitivna kod svih bolesnika sa HGL, ali su uočene statistički značajne razlike između analiziranih grupa (*p* < 0,05) (slika 1).



Sl. 1 – Histogram prosečnih razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod bolesnika u hroničnoj fazi bolesti (1–5%, 2–30%) i blastnoj transformaciji (3–70%)

Kod sedam bolesnika (28%) u fazi blastne transformacije bolesti reakcija na Bcl-2 protein bila je pozitivna u oko



Sl. 2 – Poliakrilamid gel (10%) za detekciju amplifikacije c-myc gena. U koloni 11 i 12 detektovan je amplifikovani c-myc gen.

Diskusija

Proteini Bcl-2 familije imaju centralnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze. Oni svoje dejstvo ostvaruju preko kontrole aktivnosti kaspaza kroz mehanizam oslobađanja mitohondrijskog citohroma c. Još uvek se ne zna da li oslobađanje citohroma c nastaje kao rezultat direktnog delovanja proteina Bcl-2 familije ili je to nezavisni proces koji se dešava u sklopu amplifikacije apoptotskog signala. Sposobnost formiranja kanala, od strane proteina Bcl-2 familije pokazana je jedino na modelu sintetičke membrane pod nefiziološkim uslovima. Još uvek nije dokazano da ovi proteini mogu da otvaraju kanale na ćelijskim membranama pod fiziološkim uslovima. Prema drugoj hipotezi proteini ove familije regulišu potencijal unutrašnje membrane mitohondrija ($\Delta\psi$) i tako menjaju njenu propustljivost. Tačan mehanizam koji se nalazi između $\Delta\psi$ i oslobađanja citohroma c još nije definisan²⁸.

Andreeff i sar.²⁹ pratili su ekspresiju proteina Bcl-2 familije na normalnim i leukemijskim hematopoetskim ćelijama i utvrdili da nezrele hematopoetske ćelije (CD34+/33-/13-) ne ekspimiraju Bcl-2 protein za razliku od većine CD34+ ćelija. Leukemijske CD34+ progenitorske ćelije ekspimiraju Bcl-2 protein i nivo ekspresije je u skladu sa lošijim postizanjem kompletne remisije bolesti. Povišeni nivo ekspresije Bcl-2 proteina uočava se kod mnogih solidnih tumora kao i u akutnim i hroničnim limfocitnim i mijeloidnim leukemijama¹⁸. Nagy i sar.³⁰ su pratili ekspresiju bcl-2, bax i myc gena kvantitativnom RT-PCR metodom kod bolesnika sa ALL, AML, HGL i HLL. Povišeni nivo ekspresije sva tri gena uočen je kod svih analiziranih grupa bolesnika. Prema rezultatima Klobusicka i sar.³¹ broj Bcl-2 pozitivnih ćelija nije bio različit kod različitih tipova leukemije, T-ALL, B-HLL, B-ALL, AML i HGL. An i sar.³² su imunohistohemijskim analizama uočili ekspresiju Bcl-2 proteina u 67% leukemijskih ćelija dobijenih od 52 bolesnika sa AML i ALL.

Imunohistohemijski, korišćenjem metode APAAP, uočili smo prisustvo proteinskog produkta bcl-2 gena, kod svih analiziranih bolesnika sa HGL. Rezultati su pokazali visok nivo ekspresije ovog proteina kod bolesnika u blastnoj transformaciji u preko 70% mononukleusnih ćelija kostne srži. Kod šest bolesnika u hroničnoj fazi uočena je ekspresija Bcl-2 proteina u oko 30% ćelija. Povećana ekspresija bila je u korelaciji sa dužinom bolesti, odnosno svih šest bolesnika su se nalazili u kasnoj hroničnoj fazi bolesti (> 12 meseci od postavljanja dijagnoze). Kod ostalih bolesnika u hroničnoj fazi nivo ekspresije Bcl-2 proteina je bio kao i na uzorcima kostne srži dobijene od zdravih kontrola odnosno ekspresija je uočena u 2–10% ćelija.

Rezultati analize prisustva Bcl-2 proteina ukazuju da je njegova ekspresija u korelaciji sa stadijumom bolesti. Povišeni nivo ekspresije ovog proteina bi mogao da predstavlja negativan prognostički parametar u lečenju HGL. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima An i sar.³² koji su pokazali da je nivo Bcl-2 proteina bio viši kod bolesnika sa HGL koji se nalaze u blastnoj transformaciji nego u hroničnoj fazi bolesti. Visoka ekspresija Bcl-2 proteina kod bolesnika u hroničnoj fazi HGL ukazuje da dolazi do blastne transformacije bolesti. Sui i sar.³³ koristili su metode APAAP i FISH (*fluorescence in situ hybridization*) za određivanje ekspresije Bcl-2 proteina i bcl-2 informacione RNK u ćelijama kostne srži kod 60 bolesnika sa HGL. Pokazano je da je ekspresija ovog proteina povišena u blastnoj transformaciji bolesti i da je u korelaciji sa brojem nezrelih ćelija u perifernoj krvi i kostnoj srži. Visok nivo genske ekspresije ovog proteina daje lošu prognozu i predstavlja važan parametar u ranoj dijagnozi i tretmanu blastne krize HGL. I prema rezultatima Handa i sar.³⁴ nivo ekspresije Bcl-2 je značajno viši u blastnoj transformaciji HGL nego u hroničnoj fazi.

Suprotno ovim rezultatima Ravandi i sar.³⁵ određivanjem ekspresija Bcl-2 u mononukleusnim ćelijama kostne srži Western Blot analizom i kvantitativnim radioimunoesejem nisu pokazali korelaciju ekspresije ovog proteina i progresije bolesti.

Diferencijalnom PCR amplifikacijom c-myc i D2R gena analizirali smo prisustvo amplifikovanog c-myc gena kod svih bolesnika sa HGL. Kod dva bolesnika u blastnoj transformaciji bolesti uočeno je prisustvo amplifikovanog c-myc

gena. Ovi rezultati su u skladu sa podacima drugih istraživača koji ukazuju na povećanu ekspresiju c-myc u blastnoj transformaciji HGL, dok je nepromenjena u hroničnoj fazi bolesti^{36, 37}. Kod ostalih analiziranih bolesnika u blastnoj transformaciji i hroničnoj fazi bolesti nije uočena amplifikacija c-myc gena.

Povećana ekspresija c-myc uočena je i kod mnogih solidnih tumora i leukemija. Uloga c-myc u proliferaciji leukemijskih ćelija još nije poznata, ali su dobijeni rezultati koji sugerišu da je c-myc važan i neophodan za rast patohistološki pozitivnih leukemijskih ćelija^{38, 39}. Daheron i sar.⁴⁰, analizirajući gene uključene u progresiju i prelaz bolesti iz hronične faze u blastnu transformaciju HGL, uočili su povećanu transkripciju maz gena u blastnoj transformaciji. Kako je ovaj protein poznat kao transkripcioni faktor odgovoran za regulaciju transkripcije myc gena, indirektno ukazuje i na njegovu ulogu u terminalnoj fazi bolesti.

Yang i sar.⁴¹ pratili su ekspresiju c-myc u ćelijama kostne srži bolesnika sa AML i HGL. Uočeno je da je ekspresija c-myc veća za vreme blastne transformacije nego u remisiji AML ili u hroničnoj fazi HGL. Takođe je pokazano da bolesnici kod kojih nije uočena ekspresija ovog proteina brže ulaze u remisiju bolesti. To sugeriše da se praćenje aktivnosti ovog onkogeno može koristiti kao prognostički faktor pri lečenju AML i HGL. Povećana ekspresija c-myc se češće uočava u relapsu AML nego pri dijagnozi. Takvi rezultati su dobijeni merenjem transkripcionog nivoa RNK u perifernoj krvi 16 bolesnika⁴².

C-myc protein povećava proliferaciju ćelije, ali u isto vreme stimuliše ćeliju da uđe u apoptozu, što predstavlja zaštitni mehanizam ćelije od prekomerne deobe i ulaska u neoplastičnu transformaciju. Uloga c-myc u malignoj transformaciji ćelije dešava se zapravo kada dođe do inhibicije procesa apoptoze mehanizmima kao što su prisustvo mutiranog P53 proteina ili povećana ekspresija Bcl-2. Upravo je tako objašnjen kooperativni odnos između Bcl-2 proteina i c-myc u mišjoj limfogenezi^{10, 28}. Povećana ekspresija c-myc i bcl-2 u limfocitima transgenih miševa dovodi do tumorogeneze brže nego kod transgenih miševa kod kojih je došlo do ekspresije samo jednog od ova dva gena⁴³. Handa i sar.³⁴ su pokazali da povećanu ekspresiju Bcl-2 proteina prati i povećana ekspresija c-myc gena u blastnoj transformaciji HGL i ukazuju na moguću ulogu c-myc u evoluciji bolesti.

I prema rezultatima dobijenim u našim istraživanjima postoji pozitivna korelacija ekspresije Bcl-2 i amplifikacije c-myc gena. Ovaj rezultat je u skladu sa *dual signal* modelom koji pretpostavlja da c-myc generiše i proliferaciju i apoptozu. Proliferacija koja nastaje kao rezultat c-myc ekspresije zavisi od supresije apoptoze koja može da bude regulisana faktorima rasta ili povećanom regulacijom antiapoptotskih proteina u koje spada i povećana ekspresija Bcl-2⁴⁴.

Sposobnost c-myc da vodi i povećava proliferaciju ćelija sugeriše da deregulacija dovodi i do narušavanja sinteze DNK i genomske nestabilnosti. Nekoliko studija ukazuje da deregulacija c-myc ekspresije povećava genomsku nestabilnost preko amplifikacije gena ili dolazi do razvoja aneuploidija. Ta izučavanja su važna za otkrivanje uloge c-myc u genomskoj nestabilnosti kao i sam mehanizam tog procesa²¹.

Zaključak

Na osnovu rezultata našeg rada može se zaključiti, da su povišena ekspresija Bcl-2 proteina i amplifikacija c-myc gena u korelaciji sa kliničkim stadijumom bolesti.

Bolje razumevanje bioloških mehanizama koji su u osnovi procesa apoptoze i dalja analiza proteina relevantnih za ovaj proces pružilo bi mogućnost za uočavanje indikatora progresije bolesti, što bi bilo od neprocenjivog značaja u kliničkoj praksi.

L I T E R A T U R A

1. Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1995.
2. al-Amin A, Lennart K, Runde V, Seiber S, Opalka B, Kloeke O. Frequency of clonal B lymphocytes in chronic myelogenous leukemia evaluated by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 104(1): 45–7.
3. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsabn U. Williams Hematology. 6th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2001.
4. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 2000; 5(5): 405–15.
5. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 2001; 7(2): 228–34.
6. Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S, Talpaž M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000; : 90–109.
7. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 349(15): 1451–64.
8. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57–70.
9. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood* 2004; 103(11): 4010–22.
10. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 485–95.
11. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997; 11(4): 457–65.
12. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(15): 1899–911.
13. Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, et al. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13): 7124–9.
14. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59(7 Suppl): 1693s–1700s.
15. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris 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.
16. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* 1996; 87(7): 2615–20.
17. Bensi L, Longo R, Vecchi A, Messori C, Garagnani L, Bernardi S, et al. Bcl-2 oncoprotein expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1995; 80(2): 98–102.
18. 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.
19. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(2): 115–23.
20. Spotts GD, Patel SV, Xiao Q, Hann SR. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* 1997; 17(3): 1459–68.
21. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 1–11.
22. Lee LA, Dolde C, Barrett J, Wu CS, Dang CV. A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J Clin Invest* 1996; 97(7): 1687–95.
23. Lee TC, Ziff EB. Mxi1 is a repressor of the c-Myc promoter and reverses activation by USF. *J Biol Chem* 1999; 274(2): 595–606.
24. Tidd DM, Giles RV, Broughton CM, Clark RE. Expression of c-myc is not critical for cell proliferation in established human leukemia lines. *BMC Mol Biol* 2001; 2: 13.
25. Babram F, von der Lehr N, Cetinkaya C, Larsson LG. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 2000; 95(6): 2104–10.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Preparation of organic reagents. In: Ford N, Nolan C, Ferguson M, editors. *Molecular cloning; A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. B4–B5.
27. Abou-Elella A, Gramlich T, Fritsch C, Gansler T. c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mod Pathol* 1996; 9(2): 95–8.
28. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999; 93(11): 3587–600.
29. Andreff M, Jiang S, Zhang X, Konopleva M, Estrov Z, Snell VE, et al. Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 1999; 13(11): 1881–92.
30. Nagy B, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T, et al. Abnormal expression of apoptosis-related genes in hematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 120(3): 434–41.
31. Klobusicka M, Kusenda J, Babusikova O. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in relation to p53 and bcl-2 protein expression in leukemia patients. *Neoplasma* 2003; 50(6): 408–15.
32. An G, Song Z, Dong X, Wang X, Lian S. Expression of Bcl-2 and P53 Gene Proteins on Leukemia Cells and Its Correlation with Chemotherapeutic Efficacy. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2000; 8(2): 101–103. (Chinese)
33. Sui X, Su L, Chu J. Expression of bcl-2 gene in the evolution of chronic myelogenous leukemia to blast crisis and its implication. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 1999; 20(1): 27–9. (Chinese)
34. Handa H, Hegde UP, Kotelnikov VM, Mundle SD, Dong LM, Burke P, et al. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leuk Res* 1997; 21(6): 479–89.
35. Ravandi F, Kantarjian HM, Talpaž M, O'Brien S, Faderl S, Giles FJ, et al. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. *Cancer* 2001; 91(11): 1964–72.

36. *Shet AS, Jabagirdar BN, Verfaillie CM.* Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 2002; 16(8): 1402–11.
37. *Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB.* Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene*. 2002; 21(47): 7137–46.
38. *Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Perrotti D, Martinez R, Wasik MA, et al.* Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(23): 13137–42.
39. *Ceballos E, Delgado MD, Gutierrez P, Richard C, Muller D, Eilers M, et al.* c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21WAF1 transactivation in K562 leukemia cells. *Oncogene* 2000; 19(18): 2194–204.
40. *Daberon L, Salmeron S, Patri S, Brizard A, Guilhot F, Chomel JC, et al.* Identification of several genes differentially expressed during progression of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1998; 12(3): 326–32.
41. *Yang E, Korsmeyer SJ.* Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2): 386–401.
42. *Strassburg CP, Neubauer V, Poliwoda H, Benter T.* Regulation of the proto-oncogenes c-sis, c-fos, c-myc and c-myb in acute myeloid leukemias. *Neoplasma* 1992; 39(6): 343–7.
43. *Bain BJ, editor.* Chronic Myeloproliferative Disorders: Cytogenetic and Molecular genetic abnormalities. Basel: Karger; 2003.
44. *Rudin MR, Thompson CB.* Apoptosis and Cancer. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 163–76.

Rad je primljen 7. X 2005.