

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (ang. *B-cell chronic lymphocytic leukaemia* – B-CLL) jest najczęściej spotykaną białaczką na półkuli zachodniej. Jest chorobą nieuleczalną, charakteryzującą się ekspansją monoklonalnych limfocytów B o błonowej ekspresji CD 19, CD22, CD79b, CD23, CD5, CD20 low, CD5, κ/λ (+) low. Komórki białaczki są obecne we krwi, szpiku i narządach limfatycznych. Przebieg kliniczny B-CLL cechuje się dużą indywidualną zmiennością w zakresie nasilenia szybkości progresji objawów chorobowych, a także przeżycia całkowitego. Zaburzenia procesu apoptozy i cyklu komórkowego odgrywają istotną rolę w patogenezie B-CLL. W pracy przedstawiono aktualne poglądy dotyczące kontroli procesu apoptozy w komórkach B-CLL przez białka rodziny Bcl-2. Szczególną uwagę poświęcono polimorfizmom genów *BCL-2*, *BAX*, *MCL-1* jako potencjalnym nowym czynnikom rokowniczym u chorych na B-CLL.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfatyczna, apoptoza, Bcl-2, polimorfizmy jednonukleotydomowe.

Prognostyczne znaczenie polimorfizmów genów białek rodziny Bcl-2 u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

Prognostic significance of Bcl-2 gene protein family polymorphisms in patients with chronic lymphocytic leukaemia

Monika Joks, Krzysztof Lewandowski

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wprowadzenie

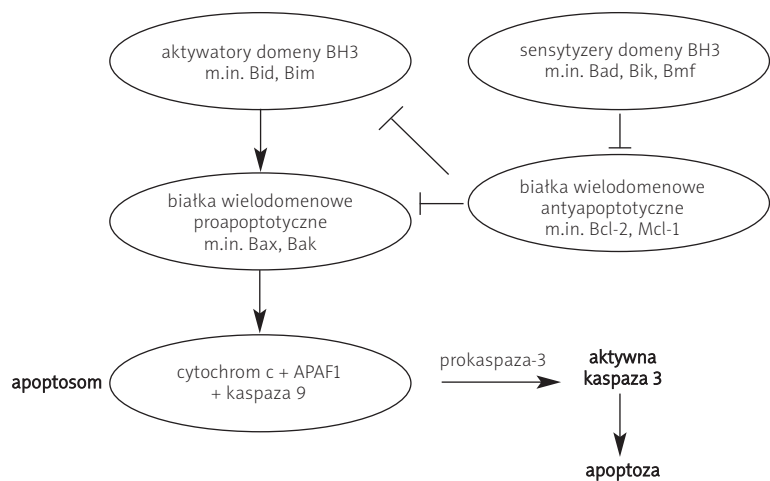
Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL) jest najczęściej spotykaną białaczką na półkuli zachodniej. Stanowi ok. 30% wszystkich białaczek. Występuje z częstością 2,3–3,3 na 100 tys. osób w ogólnej populacji [1]. Choroba cechuje się proliferacją i akumulacją limfocytów B CD19(+) z zachowaną błonową ekspresją CD23 oraz koekspresją CD5. W fazie G0/G1 cyklu komórkowego znajduje się 99% komórek B-CLL. Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa jest chorobą ludzi starszych. Mediana wieku wynosi 60 lat, ale 10–15% przypadków jest rozpoznawane przed 50. rokiem życia [2]. Przebieg kliniczny choroby charakteryzuje się skrajnie dużą zmiennością. U części pacjentów obserwuje się dynamiczną progresję objawów choroby. Inni w trakcie wieloletniej obserwacji nie wymagają leczenia. Do powszechnie uznanych niekorzystnych czynników rokowniczych B-CLL należą III–IV stopień zaawansowania wg Rai, stan mutacyjny genu dla regionu zmiennego łańcuchów ciężkich immunoglobulin, wysoka ekspresja ZAP-70, CD38, sCD23(+), dyfuzyjny typ nacieku w badaniu histologicznym szpiku, obecność aberracji chromosomowych del 17p13.1 oraz del 11q22.3. Akumulacja limfocytów B w B-CLL prawdopodobnie wynika z zaburzonej regulacji procesów apoptozy oraz zakłócenia mechanizmów cyklu komórkowego. Mniejsze znaczenie przypisuje się nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych. W prawidłowych limfocytach B istnieje stan dynamicznej równowagi pomiędzy nasileniem procesów proliferacji a apoptozą. Proces apoptozy jest kontrolowany przez produkty białkowe różnych, często przeciwstawnie działających genów, np. białek w rodziny Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) [3].

Szlaki apoptozy

Obecnie wyodrębnia się 2 zasadnicze szlaki apoptozy – wewnątrzpochodny oraz zewnątrzpochodny. Do aktywacji drogi wewnątrzpochodnej – mitochondrialnej, dochodzi wskutek ekspozycji na promieniowanie jonizujące, leki cytotoksyczne, a także w wyniku stresu komórkowego. Inicjacja apoptozy w tej drodze prowadzi do aktywacji białek proapoptotycznych Bax, Bak, ich oligomeryzacji i utworzenia porów, co skutkuje nasileniem permeabilizacji zewnętrznej błony mitochondrium – MOMP (ang. *mitochondrial outer membrane permeabilisation*), i uwolnieniem białek wewnątrzmitochondrialnych, w tym cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy [4, 5]. W cytoplazmie cytochrom c tworzy kompleks zwany apoptosomem z czynnikiem APAF-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor*) oraz z nieaktywną prokaspazą 9. Efektem tej interakcji jest aktywacja inicjatoro-

B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) is the most frequent type of leukaemia in the western hemisphere. It is an incurable disease, and is characterized by expansion of monoclonal malignant lymphoid B cells expressing on the surface CD 19, CD22, CD79b, CD23, CD5, CD20 low, CD5 , κ/λ (+) low. Leukaemic cells are present in the peripheral blood, bone marrow, and lymphoid tissues. In patients with B-CLL survival and time to progression are highly variable. Failed apoptosis plays an important role in pathogenesis of B-CLL. We present recent data concerning the role of Bcl-2 family proteins in regulation of apoptosis in B-CLL. We focus special attention on the *BCL-2*, *BAX*, *MCL-1* genes polymorphisms as potential novel prognostic risk factors in B-CLL patients.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, apoptosis, Bcl-2 family, single nucleotide polymorphisms.



Ryc. 1. Schemat wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy [9]

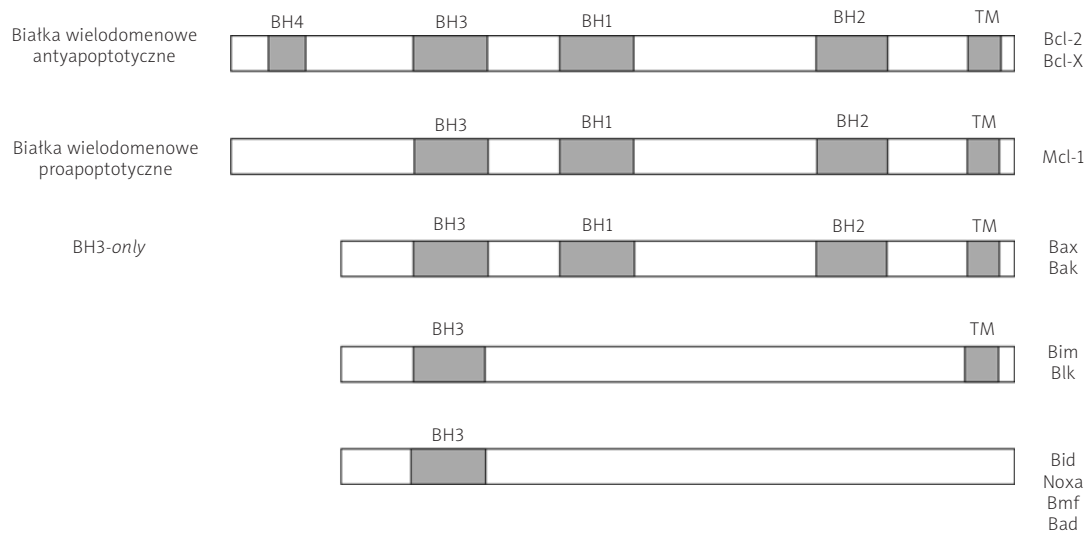
Fig. 1. Schema of the intrinsic programmed cell death pathway [9]

wej kaspazy 9, co doprowadza do uruchomienia kaskady kaspaz efektorowych (kaspaza 3, kaspaza 7) i śmierci komórki. Aktywacja drogi zewnątrzpochodnej – receptorowej, jest zapoczątkowywana przez stymulację błonowych receptorów śmierci, np. FAS czy też receptorów śmierci dla TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) – DR4, DR5. Proces ten prowadzi, po uczynieniu inicjatorowej kaspazy 8, do aktywacji kaskady ww. kaspaz efektorowych [6]. Aktywacja kaspazy 8 może prowadzić także do proteolizy białka Bid, skutkującej powstaniem aktywnej formy t-BID (ang. *truncated Bid*). Białko t-Bid również uwalnia cytochrom c z mitochondrium. Zjawisko to łączy obie drogi aktywacji apoptozy [7]. Aktywacja procesu apoptozy może zachodzić także na drodze niezależnej od kaspaz, wskutek działania mitochondrialnego czynnika aktywującego apoptozę (AIF) bądź też stresu komórkowego [8] (ryc. 1).

Rodzina białek Bcl-2

Białka rodziny Bcl-2 cechuje obecność do 4 stosunkowo krótkich sekwencji aminokwasowych nazywanych domenami homologicznymi do Bcl-2 (BH)-BH1-BH4. Do tej rodziny należy ponad 20 białek. W zależności od struktury i funkcji zostały one podzielone na 3 podrodziny. Do pierwszej należą białka działające antyapoptotycznie: Bcl-2, Bcl_w, Bcl-X_L, oraz Mcl-1 (ang. *myeloid cell leukaemia 1*). Wykazują one pełną homologię w zakresie domen BH1, BH2, BH3, BH4. Nieco odmienną budowę ma białko Mcl-1, prawdopodobnie wskutek braku domeny BH4.

Do podrodziny drugiej zalicza się proapoptotyczne, wielodomenowe białka Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), Bak (ang. *Bcl-2-antagonist/killer*), Bok (ang. *Bcl-2 related ovarian killer*). Białka te zbudowane są z domen BH1-BH3 [4, 9, 10]. Podrodzina trzecia zawiera białka proapoptotyczne wykazujące homologię tylko w zakresie domeny 3 (BH3-only). Wśród nich wyodrębniono m.in.: Bim (ang. *Bcl-2-interacting mediator of cell death*), Bad (ang. *Bcl-2-antagonist of cell death*), Bid (ang. *BH3 interacting domain death antagonist*), Bik (ang. *Bcl-2-interacting killer*), Noxa, Hrk (ang. *harakiri Bcl-2 interacting protein*), Bmf (ang. *Bcl-2 modifying factor*) [11, 12]. Białka Bid i Bim są nazywane aktywatorami [13, 14]. Ich aktywacja prowadzi do zmian allosterycznych i oligomeryzacji białek Bax i Bak. Białka Bik, Noxa, Bmf nazywane są sensyterami. Ich działanie polega na kompetycyjnym wiązaniu białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, co zapobiega sekwestracji aktywatorów apoptozy. Monomery Bax, Bak mieszczą się odpowiednio na zewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz w przestrzeni pomiędzy jej blaszkami. Są białkami pełniącymi kluczową funkcję na szlaku wewnątrzpochodnej apoptozy. Ich oligomeryzacja prowadzi, jak uprzed-



Ryc. 2. Schemat budowy wybranych białek rodziny Bcl-2 wg Danial [16]. Zaznaczono lokalizację domen BH oraz domeny przezbłonowej (TM) [6, 16]

Fig. 2. Classification of Bcl-2 family according to conserved domains according to Danial [16]. Localisation of BH and transmembranes (TM) domains [6, 16]

nio wspomniano, do zwiększenia przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrium, wytworzenia kanałów i uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej licznych białek, przede wszystkim cytochromu c. Wynikiem tych procesów jest następcza aktywacja kaspaz i inicjacja programowanej śmierci komórki.

Białko Bcl-2 oraz inne białka działają antyapoptotycznie, zapobiegając oligomeryzacji Bax i Bak w mechanizmie sekwestracji białek BH-only. Najlepiej poznanym białkiem tej grupy jest Bcl-2. Zarówno w komórkach prawidłowych, jak i apoptotycznych jest ono obecne w błonie zewnętrznej mitochondrium, a także w błonach retikulum endoplazmatycznego. Podobną lokalizację komórkową wykazuje białko Mcl-1 [15]. Głównym punktem działania białek Bcl-2 jest błona mitochondrium. Mniej poznany jest wpływ białek rodziny Bcl-2 na funkcję innych organeli komórkowych.

Apoptoza w B-CLL

Większość komórek B-CLL znajduje się w fazie G0/G1 cyklu komórkowego. Nie wiadomo, czy oporność komórek B-CLL na apoptozę ma charakter autonomiczny – wtórny do zmian genetycznych, epigenetycznych, czy też jest wynikiem stymulacji środowiskowej. W warunkach *in vitro* komórki B-CLL w dużym odsetku podlegają *spontanicznej* apoptozie, co potwierdza rolę czynników środowiskowych w warunkowaniu oporności *in vivo* [17, 18].

W większości przeprowadzonych badań eksperymentalnych wykazano wysoki poziom ekspresji Bcl-2 w komórkach B-CLL. Ekspresja Bcl-2 w komórkach B-CLL jest porównywalna ze stwierdzaną u osób z chłoniakiem foliularnym, z obecną aberracją t(14,18)(q32; q21.3). Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny. U 3–10% chorych na B-CLL wykazano obecność translokacji t(14,18) skutkującej nasileniem aktywności promotora genu *BCL-2*. W większości przypadków translokacja

ta jest jednak nieobecna. Rodzi to pytanie, czy wzmożona ekspresja Bcl-2 jest zjawiskiem wtórnym, nabytym w procesie leukemogenezy, czy też jest rezultatem pochodzenia klonu białaczkowego CLL-B z komórek o dużej ekspresji Bcl-2. W większości przypadków B-CLL region promotora genu *BCL-2* jest hipometylowany. Może to prowadzić do wzmożonej transkrypcji i ekspresji białka Bcl-2 i zakłóceń procesu apoptozy [19]. Sugeruje się także, że w regulacji procesów apoptozy dużą rolę odgrywają mikro-RNA (miRs). Mikro-RNA należą do klasy małych (ok. 19–23 nukleotydów), niekodujących czynnościowych RNA. Mikro-RNA prawdopodobnie uczestniczą w regulacji wielu procesów komórkowych, modulując nasilenie zjawisk epigenetycznych, strukturę chromatyny jądrowej, posttranslacyjne wyciszanie genów oraz translacyjną represję [20–24]. Mikro-RNA wiążą 3'UTR (ang. *3 untranslated region*) określonych mRNA, hamując proces ich translacji. Około 50% genów dla miRs jest zlokalizowane w regionach chromosomów, których aberracje mogą wiązać się z występowaniem nowotworów, lub w miejscach potencjalnych złamań chromosomów. Sugeruje to ich związek z rozwojem nowotworów u ludzi [25–30]. W przypadku B-CLL klastery miRs-15a-miRs16-1 jest zlokalizowany w chromosomie 13q14. Delecję ww. regionu potwierdzono u większości chorych (ok. 68%) z B-CLL [31]. Cimmino i wsp. sugerują, iż w B-CLL zachodzi odwrotna korelacja pomiędzy ekspresją Bcl-2 a miR-15a oraz miR-16-1 [32]. Autorzy twierdzą, że miR-15 i miR-16 mają zdolność indukowania apoptozy przez regulację komórkowej ekspresji mRNA dla Bcl-2 na poziomie posttranskrypcyjnym, co prowadzi do obniżenia komórkowego stężenia białka Bcl-2. W przypadkach delecji w obszarze chromosomu 13q14 dochodzi do spadku ekspresji miRs-15 i miRs16, co skutkuje nadekspresją białka Bcl2. Wynikiem tych zmian jest zakłócenie równowagi pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi na korzyść tych ostatnich.

Istotną rolę w regulacji stężenia białek rodziny Bcl-2 wydaje się też odgrywać stan mutacyjny genu dla regionów zmiennych łańcucha ciężkiego immunoglobulin. Nieobecności mutacji IgVH w komórkach B-CLL oraz nasilona ekspresja ZAP-70 są ściśle powiązane z agresywnym przebiegiem choroby i krótszym przeżyciem. W tych postaciach B-CLL wykazano większą zdolność do przekazywania sygnałów przez receptor BCR limfocytów [33–39]. U chorych z niezmutowanym genem *IgVH* potwierdzono przewlekłą stymulację receptora BCR, skutkującą przetrwałą aktywacją dróg PI3K/Akt i MEK/ERK oraz wzmożoną ekspresją komórkowych antyapoptotycznych białek Mcl-1, BCL-xL i XIAP (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) [40–43].

Nadekspresję białek antyapoptotycznych potwierdzono u chorych z del (17q13.1) prowadzącą do utraty ekspresji genu p53 (ang. *tumour suppressor gen*) [44]. Dowiedziono, iż w warunkach *in vitro* u pacjentów z obecnością del 17p13.1 stwierdza się oporność na apoptozę spontaniczną oraz indukowaną przez fludarabinę [44].

W porównaniu z limfocytami osób zdrowych, w większości przypadków w komórkach B-CLL stosunek Bcl-2/Bax jest zwiększony. W licznych opracowaniach wykazano, że wskaźnik Bcl-2/Bax oraz poziom ekspresji Mcl-1 negatywnie korelują z apoptozą i przebiegiem klinicznym B-CLL. Saxena i wsp. [45] oraz Kitada [46] i wsp. stwierdzili, że wzmożona ekspresja białka Mcl-1 wiąże się z wtórną do chemiooporności tendencją do progresji objawów B-CLL. Niektórzy postulują, że białko Bcl-2 również chroni komórki nowotworowe przed działaniem cytostatyków, a jego wysoka ekspresja w komórkach nowotworowych jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u pacjentów poddawanych chemioterapii [47, 48]. Grever i wsp. [49] w prospektywnym badaniu III fazy przeprowadzonym na grupie 235 pacjentów z B-CLL nie wykazali prognostycznego znaczenia ekspresji Bcl-2, Mcl-1, XIAP i kaspazy 3. U chorych z B-CLL leczonych schematami zawierającymi fludarabinę, poziom ekspresji ww. białek nie miał także żadnego wpływu na odsetek odpowiedzi klinicznych (OR) oraz czas wolny od progresji (PFS). W cytowanym badaniu jedynie obecność del (17p13.1) oraz del (11q22.3) korelowała ze skróceniem PFS. Prognostycznego znaczenia wysokiej ekspresji komórkowej białek Bcl-2 nie potwierdzili także Majid i wsp. [50], wykazując dużą różnorodność przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z porównywalnym stężeniem białka Bcl-2.

Polimorfizmy genów białek rodziny Bcl-2

Gen BCL-2, złożony z 3 eksonów i 2 regionów promotorowych, jest zlokalizowany na chromosomie 18q21.3. Promotor pierwszy jest zlokalizowany 1386–1423 par zasad od początku translacji. Jest bogaty w sekwencje G-C. Nie zawiera elementu TATA, wykazuje jednak obecność licznych miejsc inicjacji transkrypcji [52]. Promotor drugi zlokalizowany jest 1400 par zasad od miejsca inicjacji translacji. Zawiera CCAAT box, motyw oktameryczny i element TATA. Działa jako element negatywnej regulacji transkrypcji, hamując aktywność promotora P1 [51–54]. Na drodze alternatywnego składowania transkryptu genu dochodzi do powstania 2 izoform białka Bcl-2- α i β , różniących się w odcinkach C-końcowych. W prawidłowych limfocytach B znaczenie dominujące ma promotor P1. Ostatnio twierdzi się, że obec-

ność polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) genu *BCL-2* może zmieniać ekspresję i funkcję białka Bcl-2. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów definiuje się jako substytucję pojedynczego nukleotydu w określonej pozycji genu, występującą w populacji z częstością alleliczną powyżej 1% [54]. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów są najczęstszym typem polimorfizmu, odpowiadającym za ponad 90% różnic genomowych występujących u ludzi. Tylko część z nich prowadzi do zmiany sekwencji białek. SNPs zlokalizowane w niekodujących regionach DNA również mogą powodować defekty czynnościowe. Dzieje się tak zwłaszcza wtedy, gdy SNPs występują w sekwencjach regulatorowych DNA-, np. promotorach genów. Obecność takich polimorfizmów zmienia powinowactwo promotorów genów do czynników transkrypcyjnych, wpływając bezpośrednio na poziom ekspresji genu [54]. Polimorfizm 43G>A genu *BCL-2* zlokalizowany w eksonie 2 jest powiązany z mniejszym ryzykiem zachorowania na choroby autoimmunizacyjne w populacji japońskiej [55], a także ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka przetyku w populacji indyjskiej [56]. Polimorfizm ten rzadko występuje w populacji osób rasy białej. W 2004 r. Park i wsp. wykazali obecność 6 SNPs w genie *BCL-2*. Analiza haplotypów wykazała znaczną nierównowagę sprzężeń pomiędzy obecnością SNP (-938C>A) w promotorze P2 i *cichego* SNP w eksonie 1 (+21A>G) genu *BCL2* [57]. Nückerel i wsp. wykonali badania częstości występowania polimorfizmu (-938C>A) w populacji ludzi zdrowych i pacjentów z B-CLL [3]. Stwierdzili podobną częstość występowania genotypów AA, AC i CC. Dane te zaprzeczają hipotezie o związku ww. polimorfizmu ze zwiększoną skłonnością do zachorowania na B-CLL. Autorzy zaobserwowali jednak, że w grupie chorych z genotypem (-938AA) znacząco krótsze są czas do rozpoczęcia leczenia (ang. *time to treatment*, TTT) oraz całkowite przeżycie (ang. *overall survival*, OS). Co więcej, ekspresja białka Bcl-2 była większa u osób z genotypami -938AC i CC. Wielowariantowa analiza regresyjna metodą Coxa uwzględniająca stopień zaawansowania choroby (wg Bineta) ekspresję CD38 i ZAP 70, obecność polimorfizmu -938A>C *BCL2*, wykazała, że genotyp *BCL2*-938AA, obok ZAP 70, jest niezależnym wskaźnikiem prognostycznym dla TTT. Z czasem całkowitego przeżycia (OS) korelowała natomiast aktywność ZAP-70. Przeciwnie Majid i wsp. [50] w badaniu 276 chorych na B-CLL wykazali podobną częstość występowania poszczególnych genotypów SNP -938A>C genu *BCL-2*. Szczegółowa ocena nie potwierdziła korelacji pomiędzy występowaniem określonego genotypu a ekspresją białka Bcl-2, TTT, przeżyciem, obecnością stanu mutacyjnego ani obecnością aberracji chromosomowych. Także Bachmann i wsp. [58] wykazali, że obecność genotypu CC w miejscu -938 promotora genu *BCL-2* jest niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym dla przeżycia chorych na raka piersi bez zajęcia węzłów chłonnych.

Dane dotyczące znaczenia SNP w genu *BAX* są także niejednoznaczne. Saxena i wsp. [59], a także Starczyński i wsp. [60] potwierdzili występowanie polimorfizmu G>A w pozycji -248 od miejsca inicjacji translacji genu *BAX* u chorych na B-CLL, ale także w populacji osób zdrowych. Jego obecność korelowała z obniżoną ekspresją białka Bax, szybką progresją objawów choroby, skróceniem czasu całkowitego przeżycia oraz czasu przeżycia od rozpoczęcia leczenia.

Związek ten był szczególnie widoczny u pacjentów poddanych terapii [60]. Badanie Skosberga i wsp. [61] nie potwierdziło istnienia ww. korelacji.

Analizie została także poddana struktura i zmienność genu *MCL-1* [62–66]. Zidentyfikowano obecność 2 nowych wariantów tego genu. Dotyczą one insercji +6 i +18 nukleotydów w regionie promotorowym. W większości prac stwierdzono ich obecność także w populacji osób zdrowych, z częstością powyżej 1%. Dlatego traktowane są jako polimorfizmy genu *MCL-1*. Miejsce inicjacji transkrypcji genu *MCL-1* jest trudne do jednoznacznego określenia. Insercje +6 i +18 mogą występować w -190 lub -180 pozycji od miejsca rozpoczęcia transkrypcji. Obecność ww. polimorfizmów genu *MCL-1* wiąże się z większym stężeniem mRNA oraz białka *Mcl-1*. Ich obecność okazała się także niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z B-CLL CD 38(-) [63]. Istnieją jednak opracowania, w których nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy obecnością polimorfizmu ins +6 i +18 genu *MCL-1* a poziomem transkryptu tego genu [63]. Podobne rozbieżności dotyczą znaczenia rokowniczego. Nenning i wsp. [66] nie wykazali różnic pomiędzy przeżyciem chorych na B-CLL z ww. insercjami w porównaniu z pacjentami wolnymi od wspomnianych defektów.

Podsumowanie

Przedstawione dane na temat polimorfizmów białek zaangażowanych w proces apoptozy komórek B-CLL mogą sugerować ich wpływ na OS, TTP, a także odpowiedź na stosowane leczenie. Nie można wykluczyć, że jedynie kompleksowa ocena występowania ww. polimorfizmów genów *BCL-2*, *BAX* oraz *MCL-1* pozwoli określić ich znaczenie prognostyczne u chorych na B-CLL.

Piśmiennictwo

- Hartge P, Devessa SS. Quantification of the impact of known risk factors on time trends in non-Hodgkin lymphoma incidence. *Cancer Res* 1992; 52 (19 suppl): 5566s-69s.
- Foon KA. Chronic lymphoid leukaemias: recent advances in biology and therapy. *Stem Cells* 1995; 13: 1-21.
- Nüchel H, Frey UH, Bau M, et al. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the *BCL2* gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 290-7.
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-9.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-33.
- Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005; 114: 441-9.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 491-501.
- Smolewski P. Mechanizmy regulujące apoptozę jako cel w leczeniu chorób nowotworowych układu krwiotwórczego: kluczowa rola białek rodziny *bcl2*. *Acta Haematol Pol* 2006; 37 suppl. 4: 131-44.
- Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukaemia requires *BCL2* to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to *BCL2* antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007; 117: 112-21.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl 2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-607.
- Kirkin V, Joos S, Zoring M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 229-49.
- Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002; 9: 505-12.
- Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 324-30.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2: 183-92.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17: 525-35.
- Danial NN. Bcl-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7254-63.
- Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 2000; 79: 157-73.
- Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia following their culture in vitro. *Br J Haematology* 1989; 71: 343-50.
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. Bcl2 gene hypomethylation and high level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82: 1820-8.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by doublestranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-9.
- Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 2004; 431: 364-70.
- Mello CC, Conte Jr D. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; 431: 338-42.
- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-8.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431: 356-63.
- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-91.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 micro-RNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-6.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 167-9.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3627-32.
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. Identification and characterisation of a novel gene, *C13orf25*, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 2004; 64: 3087-95.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. Micro RNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down regulation of micro-RNA genes miRNA15 and miRNA16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting *BCL2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-9.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD 38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with more aggressive form in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor

- of disease progression in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 893-901.
37. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2003; 101: 1987-93.
38. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2002; 100: 4609-14.
39. Mockridge JC, Potter KN, Wheatley I, Neville LA, Packham G, Stevenson FK. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 2007; 109: 4424-31.
40. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. *Blood* 2005; 105: 4820-7.
41. Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, et al. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* 2003; 4: 280-6.
42. 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.
43. Dan HC, Sun M, Kaneko S, et al. Akt phosphorylation and stabilisation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 2004; 279: 5405-12.
44. Klobusicka M., Kusenda J, Babusickova O. Immunohistochemical detection of bcl-2 and p53 proteins in B-chronic lymphocytic leukemia patients. *Neoplasma* 2002; 49: 387-93.
45. Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl1 and Bcl2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hem* 2004; 75: 22-23.
46. Kitada S, Andersen K, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphatic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-89.
47. Jamrozak K, Smolewski P, Balcerzak E i wsp. MDR1 gene polymorphism associated with susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and determines P-glycoprotein activity in B-CLL tumor cells. *Blood* 2003; 102: 598a.
48. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003; 22: 1117-21.
49. Grever MR, Lucas DM, Gordon W, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukaemia: results from the US intergroup phase III trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 799-804.
50. Majid A, Tsoulakis O, Walewska R, Gesk S, Siebert R, Kennedy DB, Dyer MJ. BCL 2 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Lack of association with the BCL2>C promoter single nucleotide polymorphism (SNP). *Blood* 2007;
51. Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennett S, Goldman P, Korsmeyer SJ. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl2-fusion gene in lymphoma. *EMBO J* 1988; 7: 123-31.
52. Young RL, Korsmeyer SJ. A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3686-97.
53. Woszczek G, Borowiec M, Kowalski ML. *Immunologia kliniczna*. Kowalski ML (red.). *Mediton* 2005; 853-71.
54. Sachidanandam R, Weisman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, et al.; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1,42 milion single nucleotide polymorphism. *Nature* 2001; 409: 928-93.
55. Komaki S, Kohno M, Matsuura N, Shimazu M, Adachi N, Hoshida R, Nishiyama S, Matsuda I. The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: an analytical evaluation. *Hum Genet* 1998; 103: 435-40.
56. Jain M, Kumar S, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, Mittal B. Role of BCL2 (ala43thr), CCND1 (G870A) and FAS (A-670G) polymorphisms in modulating the risk of developing esophageal cancer. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 225-32.
57. Park BL, Kim LH, Cheong HS, et al. Identification of variants in cyclin D1 (CCND1) and B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2). *J Hum Genet* 2004; 49: 449-54.
58. Bachmann HS, Otterbach F, Callies R, Nüchel H, Bau M, Schmid KW, Siffert W, Kimmig R. The AA genotype of the regulatory BCL2 promoter polymorphism (938C>A) is associated with favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5790-7.
59. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A in the 5' UTR of BAX gene chronic lymphocytic with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 2002; 187: 199-205.
60. Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P, Fegan C. Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the BAX gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1514-21.
61. Skosberg A, Tobin G, Krober A, et al. The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the bax gene doesn't correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 77-81.
62. Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 673-82.
63. Dicker F, Rauhut S, Kohlmann A, et al. Correspondence- Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1092-3.
64. Freeman SN, Bepler G, Haura E, Sutphen R, Cress WD. Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2007; 97: 1088-9.
65. Vargas RL, Pelgar RE, Rothberg PG. Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1089-90.
66. Uta CF, Nanning, Eckert C, Wellmann S, Barth A, Henze G, Seeger K. Re: Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1091-2.

Adres do korespondencji

lek. **Monika Joks**

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych
Układu Krwiotwórczego
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań
e-mail: monikajoks@tlen.pl