

**PAPEL DE LOS GENES P16 Y SURVIVINA EN LA
PROGRESIÓN DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
A LA CRISIS BLÁSTICA**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

JUAN CARLOS HERNÁNDEZ BOLUDA

DIRECTOR DE TESIS:

FRANCISCO CERVANTES REQUENA

FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Barcelona, Junio de 2005

AGRADECIMIENTOS

A Paco, no sólo por ser el impulsor y director de esta tesis, sino también por ser mi Maestro y Amigo, siempre una referencia dentro y fuera del hospital.

A Dolors, por enseñarme las técnicas de biología molecular imprescindibles para el desarrollo de los distintos trabajos. Su paciencia y apoyo continuo me ayudaron a perseverar en la consecución de los objetivos de la tesis.

A Beatriz, por ser el mejor modelo que conozco de entusiasmo y capacidad de trabajo, trabajar junto a ella fue una delicia.

A Mari-Carmen Vela, por su inestimable colaboración en las técnicas moleculares desarrolladas en esta tesis.

A todo el personal de la Unidad de Hematopatología del Clínic, por su simpatía y ayuda durante el año transcurrido en su departamento.

A Jordi, porque “de pequeño” quise ser como él; a Armando, porque aúna el sentido común con un sentido poco común; a Joan Bladé, por demostrarme que la constancia y el trabajo te permiten alcanzar cualquier meta.

A mis padres, por todos los sacrificios que han hecho por mí a lo largo de su vida con el único objetivo de hacerme feliz.

A mi hermana, siempre próxima.

A Mari-Carmen, ¡qué paciencia has tenido conmigo!.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Etiología, incidencia e historia natural de la leucemia mieloide crónica (LMC)	... 2
1.2 Patogénesis de la LMC	
1.2.1 Introducción	... 6
1.2.2 Célula origen de la LMC	... 10
1.2.3 Estructura molecular del cromosoma Filadelfia (Ph)	... 11
1.2.4 Consecuencias biológicas de la translocación BCR-ABL	... 16
1.3 Patogénesis de la progresión de la LMC	
1.3.1 Introducción	... 23
1.3.2 Alteraciones citogenéticas	... 25
1.3.3 Alteraciones moleculares	... 26
1.3.4 Alteraciones de la biología celular	... 32
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	... 40
3. RESULTADOS	
3.1 Trabajo I. <i>Alteraciones genómicas del gen p16 en la progresión de la LMC: estudio secuencial de 42 pacientes</i>	... 44
3.1.1 Resumen	
3.1.2 Artículo	
3.2 Trabajo II. <i>Expresión de survivina en la progresión de la LMC: estudio secuencial de 16 pacientes</i>	... 48
3.2.1 Resumen	
3.2.2 Artículo	
4. DISCUSIÓN	... 51
5. CONCLUSIONES	... 61
6. BIBLIOGRAFÍA	... 63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ETIOLOGÍA, INCIDENCIA E HISTORIA NATURAL DE LA LMC

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas, caracterizado por la presencia en la mayoría de los pacientes de una alteración citogenética en las células proliferantes, el cromosoma Filadelfia (Ph)¹. Dicha alteración genética refleja la existencia de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)], que da lugar a la formación de un gen híbrido BCR-ABL, el cual desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad². Sin embargo, hasta el momento se desconocen tanto el fenómeno mutagénico inicial como los mecanismos moleculares implicados en la aparición del cromosoma Ph. A este respecto, cabe decir que el agente etiológico que más claramente se ha relacionado con el desarrollo de la LMC es la exposición a radiaciones ionizantes³, si bien pocas veces es posible registrar este antecedente en los pacientes. Así, los estudios realizados en supervivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki evidenciaron un incremento en la incidencia de LMC en esta población tras un período de latencia desde las explosiones (fase preclínica) de 6,3 años de mediana⁴. Asimismo, la aparición de la LMC se ha asociado a la administración de radioterapia para el tratamiento de la espondilitis anquilosante y el cáncer de cuello uterino. De hecho, algunos autores han calculado que la probabilidad de inducir una t(9;22) puede ser de 7×10^{-12} por Gy de radiación y célula expuesta⁵.

La LMC representa el 10-15% del total de leucemias en los individuos adultos y su incidencia se estima en un caso nuevo por 100.000 habitantes y

año. Puede aparecer a cualquier edad, pero la edad mediana en el momento del diagnóstico se sitúa alrededor de los 50 años, con un ligero predominio en varones. Desde el punto de vista clínico, la LMC sigue típicamente un curso evolutivo bifásico¹ (figura 1). La mayoría de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la enfermedad, en la cual las manifestaciones derivadas de la mieloproliferación (sintomatología constitucional, leucocitosis, esplenomegalia) son fácilmente controlables con diferentes agentes terapéuticos, permitiendo que los enfermos lleven una vida prácticamente normal. Sin embargo, la evolución natural de la enfermedad conduce a la aparición, tras un período variable, situado habitualmente entre 3 y 6 años, de la fase terminal o crisis blástica (CB) de la LMC, caracterizada por un cuadro de insuficiencia medular, similar al de las leucemias agudas y generalmente refractario al tratamiento^{6,7}. En alrededor de la mitad de los casos la transición de la LMC de la fase crónica a la CB no es brusca, intercalándose entre ambas fases un período intermedio, la fase de aceleración, cuya duración rara vez sobrepasa el año^{8,9}. En ella, los pacientes presentan un deterioro progresivo de su estado general, con aparición de sintomatología constitucional, dolores óseos persistentes y crecimiento progresivo del bazo a pesar del tratamiento. Junto a ello, el hemograma suele mostrar anemia y/o plaquetopenia no atribuibles al tratamiento, leucocitosis con blastosis progresiva y, en ocasiones, trombocitosis o basofilia intensas en sangre periférica. Por último, en aproximadamente un 5% de los casos la LMC se encuentra en fase de CB en el momento del diagnóstico, lo que sugiere la existencia de una fase crónica subclínica que ha pasado desapercibida.

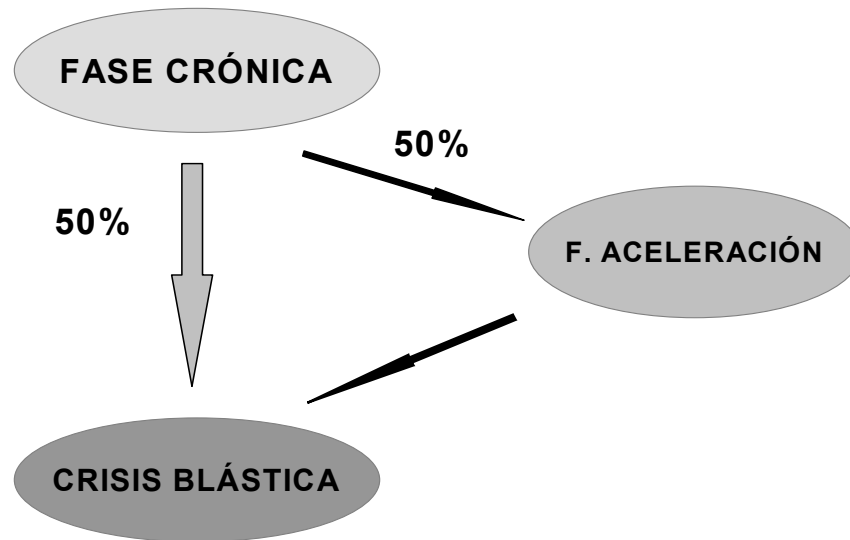


Figura 1. Fases clínicas de la LMC

Por lo que respecta a la CB de la LMC, se caracteriza por su heterogeneidad clínico-hematológica y su pronóstico desfavorable, dado que la supervivencia mediana de los pacientes desde el diagnóstico de esta fase es de sólo 4 a 5 meses. Desde el punto de vista fenotípico, las células blásticas pueden expresar marcadores de cualquier línea hematopoyética, lo que indica que la clona que da origen a la CB deriva de una célula madre pluripotencial muy indiferenciada¹⁰. Así, en la mayoría de los casos los blastos presentan un fenotipo mieloide, asociándose frecuentemente un componente minoritario de estirpe megacarioblástica, pero cerca de una cuarta parte presentan un fenotipo linfoide, mientras que son mucho más raras las CB de estirpe eritroide.

Esta variabilidad fenotípica de la CB tiene importantes implicaciones clínicas, terapéuticas y pronósticas. En efecto, las CB linfoides suelen tener un inicio brusco, habitualmente sin fase de aceleración previa, y presentan con menor frecuencia basofilia en sangre periférica, esplenomegalia y hepatomegalia que las de estirpe no linfoide¹¹. Por el contrario, la infiltración blástica de la médula ósea suele ser mayor. A su vez, la elevada tasa de respuestas obtenida en las CB linfoides con esquemas de tratamiento que incluyen vincristina y prednisona ha permitido que, históricamente, la supervivencia de este subgrupo de pacientes haya sido más prolongada que la del resto de enfermos (12 y 3-5 meses, respectivamente)¹¹⁻¹³. No obstante, la reciente introducción en el tratamiento de la LMC del imatinib, un inhibidor específico de la proteína tirosinasa BCR-ABL, podría modificar estos resultados, al ser capaz de inducir respuestas mantenidas en una cierta proporción de enfermos con CB de fenotipo mieloide, siendo menor su eficacia en aquellos con CB linfoide^{14,15}.

1.2. PATOGÉNESIS DE LA LMC

1.2.1. Introducción

El diagnóstico de LMC se establece habitualmente tras la detección del cromosoma Ph, presente en más del 95% de los pacientes¹⁶. Esta anomalía citogenética fue descrita inicialmente en 1960 por Nowell y Hungerford, al descubrir la existencia de un cromosoma del grupo G de un tamaño inferior al normal que se asociaba de forma consistente con un tipo específico de leucemia¹⁷. En 1973, Rowley demostró que el cromosoma Ph era en realidad el resultado de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)]¹⁸. No obstante, tuvieron que transcurrir diez años más para que se descubriera que los genes implicados en dicha translocación eran el protooncogén ABL y el gen BCR, localizados habitualmente en los cromosomas 9 y 22, respectivamente^{19,20} (figura 2). Asimismo, se comprobó que un 5-10% de los pacientes con LMC presentaban translocaciones variantes del cromosoma Ph²¹, en donde el reordenamiento BCR-ABL tenía lugar en cromosomas distintos al 9 y el 22. Con todo, los mecanismos moleculares implicados en la aparición del cromosoma Ph están todavía por dilucidar. En este sentido, recientemente se ha postulado el posible papel de las secuencias repetitivas Alu²² y de los duplicones²³ como mediadores de los intercambios genéticos que darían origen a la recombinación de los genes ABL y BCR durante el proceso de mitosis celular.

La consecuencia final del reordenamiento BCR-ABL es la síntesis de una proteína BCR-ABL con actividad tirosincinasa aumentada²⁴. Los avances

decisivos en la demostración de la implicación de dicha proteína en la patogénesis de la LMC se han realizado en estudios de modelos animales²⁵. Así, en modelos experimentales se comprobó que las células hematopoyéticas murinas manipuladas para expresar la proteína BCR-ABL desarrollaban semanas después cuadros leucémicos que compartían algunas características con la LMC humana, si bien su curso clínico era por lo general más agresivo²⁶. Asimismo, la infusión de células humanas BCR-ABL positivas en ratones inmunodeprimidos indujo la aparición en éstos de cuadros clínicos mieloproliferativos similares al de la LMC²⁷. Más recientemente, se ha podido confirmar el papel primordial de la proteína BCR-ABL en la patogénesis de la LMC, al comprobarse que su inhibición específica mediada por el imatinib impide la proliferación de los progenitores BCR-ABL positivos *in vitro*²⁸ e *in vivo*²⁹, sin influir de forma significativa en la viabilidad de los progenitores normales.

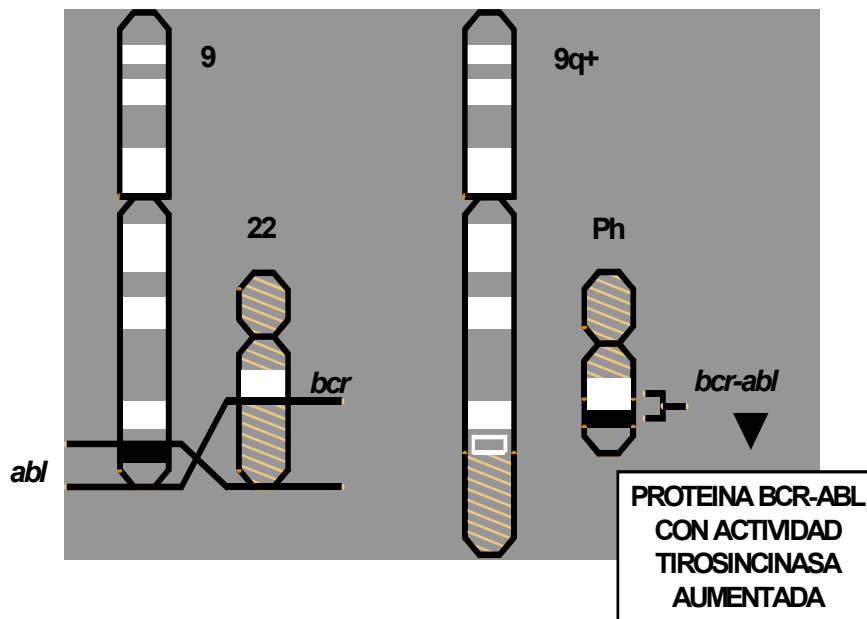


Figura 2. Estructura del cromosoma Filadelfia [t(9;22)]

A pesar de lo anterior, existen datos que apoyan la hipótesis de que la formación del gen híbrido BCR-ABL pueda no ser la alteración inicial o única responsable de la aparición de la LMC. En este sentido, diversos estudios han demostrado la existencia de células clonales Ph-negativas en la sangre periférica de pacientes con LMC Ph-positiva mediante el análisis de expresión de los isoenzimas de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa³⁰⁻³². Además, se ha descrito la adquisición del cromosoma Ph en el curso evolutivo de enfermos con LMC Ph-negativa³³. Más recientemente, diversos autores han referido la aparición de alteraciones citogenéticas en los progenitores Ph-negativos de

enfermos en respuesta citogenética completa obtenida tras tratamiento con interferón α (IFN)³⁴ o imatinib³⁵⁻³⁸. Como explicación a esto último se ha postulado la coexistencia desde el inicio del tratamiento de dos poblaciones, una correspondiente a la LMC y otra distinta mielodisplásica, esta última minoritaria al diagnóstico de la LMC pero que podría adquirir una ventaja proliferativa tras la inhibición farmacológica de los progenitores Ph-positivos. Con todo, no es posible descartar por ahora otras hipótesis, como la de que en la LMC existirían precursores leucémicos Ph-negativos cuya inestabilidad genética facilitaría la eventual adquisición de alteraciones citogenéticas, entre ellas el cromosoma Ph o, en el caso concreto del imatinib, que sea este fármaco el responsable de inducir dichas alteraciones en los progenitores hematopoyéticos sanos. Por otra parte, la expresión del gen BCR-ABL puede no ser suficiente para el desarrollo de la LMC, dado que en aproximadamente un 30% de las personas adultas sanas es posible detectar transcritos BCR-ABL en sangre periférica si se utilizan técnicas moleculares de alta sensibilidad^{39,40}. Con respecto a este punto, cabe recordar que para que una alteración molecular tenga potencial transformante es necesario que produzca una proteína oncogénica funcional en un progenitor inmaduro con capacidad de autorrenovación. Así, los transcritos BCR-ABL detectados en los leucocitos circulantes de los individuos sanos podrían haberse generado en células maduras, incapaces de autopropagarse, de forma que eventualmente acabarían desapareciendo de la sangre como consecuencia de los procesos normales de diferenciación y muerte celular. Por otra parte, se ha descrito que los transcritos BCR-ABL detectados en la sangre de sujetos sanos tienen con

frecuencia estructuras anómalas que probablemente impiden la formación de proteínas BCR-ABL funcionales⁴⁰. También cabe considerar el papel que podría desempeñar el sistema inmune, mediante su capacidad de eliminar precozmente las células BCR-ABL positivas que aparecen ocasionalmente en las personas sanas. Por último, podría suceder que fuera imprescindible la adquisición de mutaciones adicionales en la clona BCR-ABL para que pudiera producirse su expansión clonal efectiva, si bien en modelos animales la expresión de BCR-ABL es suficiente para la transformación leucémica^{26,27}.

1.2.2. Célula origen de la LMC

El origen de la LMC a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial se venía postulando desde principios de los años 50, en vista del incremento en el número de progenitores de las tres series hematopoyéticas que se observa en la médula ósea de los pacientes⁴¹. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente gracias a una serie de estudios que emplearon técnicas citogenéticas para demostrar el origen clonal de los precursores granulocíticos, eritroides, megacariocíticos y linfoides (B y T) de la LMC⁴². En época más reciente se ha observado la presencia del gen BCR-ABL en las células endoteliales de un paciente con LMC⁴³, lo que, de confirmarse en otros estudios, permitiría situar a la célula originaria de la LMC en un estadio madurativo muy precoz, con capacidad de diferenciación a tejido endotelial y hematopoyético (hemangioblasto).

Por otra parte, en la LMC es posible distinguir dos poblaciones de células madre Ph-positivas en función de su actividad mitótica⁴⁴. Un primer

subgrupo de progenitores tendría alterados los mecanismos de control del ciclo celular en favor de una intensa proliferación y diferenciación en células más maduras. En cambio, existiría un segundo grupo que estaría constituido por progenitores Ph-positivos quiescentes, en fase G₀, que podrían ser los responsables del mantenimiento de la LMC a largo plazo. De hecho, se ha comprobado la capacidad de los progenitores CD34+ Ph-positivos en fase G₀ de reproducir la leucemia a las 6-8 semanas de ser trasplantados a ratones irradiados⁴⁵.

1.2.3. Estructura molecular del cromosoma Ph

El gen ABL humano, situado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34), comprende 11 exones y codifica la síntesis de la proteína tirosincinasa ABL (p145^{ABL})⁴⁶. Estructuralmente, el extremo aminoterminal de ABL incluye dos dominios (SH2 y SH3) que regulan la acción de su dominio catalítico (SH1), mientras que su segmento carboxiterminal contiene dominios de unión al ADN, de localización nuclear y de fijación a la actina⁴⁷. En cuanto a sus funciones fisiológicas, la proteína ABL normal se localiza en el núcleo y en el citoplasma donde participa en los mecanismos de regulación del ciclo celular⁴⁸, de respuesta celular al estrés⁴⁹ y de transmisión de señales intracelulares⁵⁰. Por su parte, el gen BCR se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11), comprende 23 exones y codifica la síntesis de una proteína con un peso molecular de 160 kd, cuya función es desconocida⁵¹. La proteína BCR se expresa en múltiples tejidos humanos y el hecho de que se localice en el

citoplasma de células quiescentes o alrededor de los cromosomas en células en mitosis sugiere su posible implicación en la regulación del ciclo celular⁵².

Con la formación del cromosoma Ph el segmento 3' del gen ABL (9q34) se yuxtapone a la región 5' del gen BCR (22q11), dando origen al gen híbrido BCR-ABL⁵³. El punto de ruptura del gen ABL ocurre generalmente 5' (centromérico) al exón 2, de forma que los exones 2 al 11 (a2-a11) son transferidos a una región de 5,8 kb del gen BCR, denominada región M-bcr (*major breakpoint cluster region*), concretamente entre los exones 12 y 16 de éste (también identificados como b1-b5) (figura 3). En función del punto de ruptura de BCR se forman los genes de fusión b2a2 (e13a2) o b3a2 (e14a2), que a su vez se transcriben en un ARN mensajero (ARNm) de 8,5 kb, cuya lectura origina la síntesis de una proteína de 210 kd (p210^{BCR-ABL}). Generalmente las células de la LMC expresan uno de los dos transcritos (b2a2 o b3a2) de forma exclusiva, pero en un 5% de los casos se observan ambos tipos de ARNm, debido a la existencia de empalmes alternativos⁵⁴. Por otra parte, una pequeña proporción de pacientes con LMC presenta reordenamientos BCR-ABL cuyo sitio de ruptura en BCR es distinto de los anteriormente mencionados. Así, se han descrito casos esporádicos de LMC en los que el punto de ruptura de BCR se encuentra entre los exones 1 y 2, en un área denominada m-bcr (*minor breakpoint cluster region*)^{55,56}, dando origen a un transcrito de tipo e1a2, que sintetiza una proteína p190^{BCR-ABL}. Aunque infrecuente en la LMC, este tipo de ARNm se observa en el 60% de los casos de leucemia aguda linfoblástica Ph-positiva del adulto⁵⁴. Recientemente, se ha identificado una nueva variante del reordenamiento BCR-ABL en la que el

punto de ruptura del gen BCR está situado entre los exones e19 y e20 (región μ -bcr), lo que da lugar a la formación de un ARNm de tipo e19a2 que codifica una proteína de 230 kd ($p230^{BCR-ABL}$)⁵⁷. Por último, excepcionalmente se han detectado otros tipos de reordenamiento BCR-ABL en la LMC, como las formas b2a3, b3a3, e1a3, e6a2 y e2a2⁵⁴.

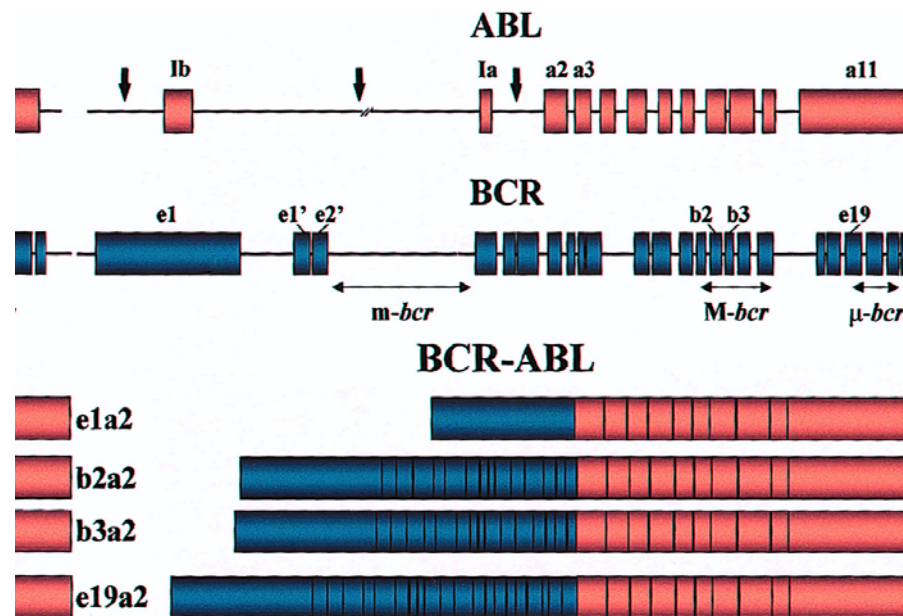


Figura 3. Formación de los diferentes transcritos BCR-ABL

De lo anteriormente expuesto cabe destacar que, mientras la parte ABL del gen BCR-ABL se mantiene casi invariablemente constante, el tamaño de la porción BCR difiere de unos enfermos a otros, lo que sugiere que sea posiblemente ABL el principio transformante de la molécula. En apoyo de esta hipótesis iría el hecho de que existen leucemias en las que el gen ABL se fusiona con genes distintos a BCR, como ocurre en la translocación TEL-ABL⁵⁸. Por otro lado, el diferente tamaño de las secuencias de BCR presentes en la translocación BCR-ABL parece dictar el perfil fenotípico de la LMC. En este sentido, los estudios realizados en modelos animales han evidenciado que, si bien las tres proteínas quiméricas BCR-ABL (p190, p210, p230) son capaces de inducir un cuadro clínico similar a la LMC, difieren entre sí en su capacidad de provocar una leucemia aguda linfoblástica⁵⁹. Así, p190 es el oncogén más potente, mientras que la capacidad de p230 para inducir independencia a los factores de crecimiento es incompleta. A este respecto, se ha sugerido que las diferencias en la capacidad transformadora podrían derivar de los sustratos específicos activados por cada una de las oncoproteínas. En esta línea, STAT6, un factor de transcripción que afecta a la respuesta proliferativa linfoide, sería preferentemente fosforilado por p190 y no por p210⁵⁹. Por otra parte, numerosos estudios han tratado de obtener correlaciones entre las distintas variantes moleculares y perfiles clínico-hematológicos característicos. En general, los transcritos b2a2/b3a2 constituyen los marcadores moleculares de la forma clínica “clásica” de la LMC y, si bien la presencia de b3a2 se ha asociado a una mayor trombocitosis^{60,61}, el pronóstico y la respuesta al tratamiento no difieren entre ambas formas. A su vez, el transcrito p190 se

asocia con monocitosis y una enfermedad de curso agresivo^{55,56}, mientras que p230 se observa principalmente, aunque no de forma exclusiva⁶²⁻⁶⁴, en casos con leucocitosis neutrofilica sin o con ligera mieleemia y frecuente trombocitosis (variante neutrofílica de la LMC)⁵⁷.

Por otra parte, la translocación recíproca t(9;22) da origen también a un gen quimérico de tipo ABL-BCR en el cromosoma 9 derivativo (9q+)⁵³. Cabe destacar, no obstante, que aunque es posible detectar ARNm ABL-BCR en un 60% de los casos de LMC⁶⁵, no se ha demostrado hasta el momento la existencia de ninguna proteína ABL-BCR viable, por lo que se desconoce el papel de estos transcritos en la patogénesis de la enfermedad. En cambio, recientemente se ha demostrado el significado pronóstico desfavorable que conlleva la existencia de deleciones submicroscópicas de secuencias del cromosoma derivativo 9q+, presentes en un 10-20% de los pacientes al diagnóstico de la LMC⁶⁶⁻⁶⁹. Estas deleciones parecen producirse de forma simultánea a la formación del cromosoma Ph, aparecen con mayor frecuencia en las translocaciones t(9;22) variantes y afectan a secuencias adyacentes al punto de ruptura de la translocación en 9q+. Pueden ser extensas, dando lugar a pérdidas de hasta 5,5 megabases (Mb) del cromosoma 9 y 17 Mb del segmento translocado desde el cromosoma 22. Si bien se ha postulado que la consecuencia biológica de las deleciones de 9q+ sería la pérdida de uno o más genes supresores de tumores, se desconoce todavía cuál de los aproximadamente 300 genes potencialmente implicados conferiría el pronóstico desfavorable asociado con esta alteración citogenética.

1.2.4. Consecuencias biológicas de la translocación BCR-ABL

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas ABL son tirosincinasas con un importante papel en la transmisión de señales y en el control del crecimiento celular, motivo por el cual en condiciones fisiológicas se encuentran estrictamente reguladas⁷⁰. Sin embargo, las alteraciones estructurales derivadas de la formación de la proteína BCR-ABL (dimerización proteica, localización citoplasmática exclusiva) tienen como consecuencia una desregulación del efecto tirosincinasa de ABL, de forma que la enzima está activada continuamente⁷¹. El resultado de ello es la activación anómala de una serie de vías de transmisión intracelular de señales en los progenitores Ph-positivos que conduce a una alteración de su adhesión al estroma medular, a un incremento de su actividad proliferativa y a una disminución de la apoptosis celular⁷² (figura 4). A continuación, se desarrollan estos tres aspectos fundamentales de la patogénesis de la LMC:

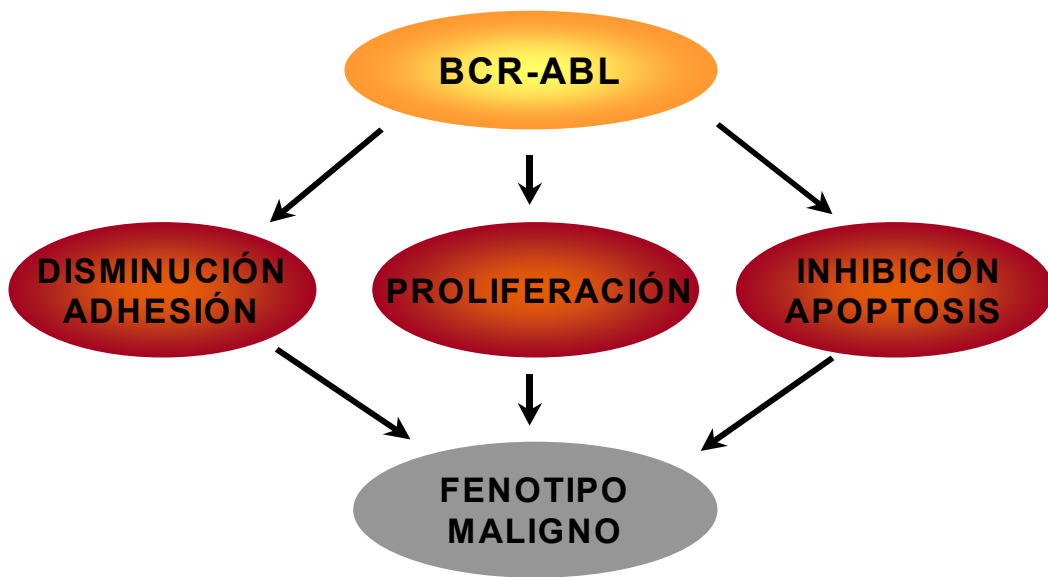


Figura 4. Patogénesis de la LMC en su fase crónica

a) Alteración de la adhesión al estroma medular:

El proceso de adhesión y anidamiento de los progenitores hematopoyéticos en el microambiente medular está mediado por una serie de receptores transmembrana denominados integrinas (fundamentalmente de tipo $\beta 1$) y diversas proteínas estructurales y del citoesqueleto, tales como la paxilina, la talina y la actina⁷³. A su vez, la proliferación y diferenciación de dichos progenitores está regulada en condiciones normales por las señales emitidas desde las células del estroma medular^{74,75}. En cambio, los progenitores Ph-positivos de la LMC presentan una disminución de su adhesión al estroma medular, lo que les permite migrar desde la médula ósea a los capilares sanguíneos en estadios precoces de maduración, escapando así de

los mecanismos inhibitorios de la proliferación celular ejercidos habitualmente a nivel medular^{76,77}. Datos recientes de laboratorio sugieren que las alteraciones cualitativas en el funcionalismo de las integrinas $\beta 1$ mediadas por la acción de la proteína BCR-ABL constituyen la causa más importante de los defectos de adhesión observados en los progenitores de la LMC⁷⁸. En este sentido, el efecto terapéutico del IFN en la LMC parece deberse, al menos en parte, a su capacidad de revertir los defectos de adhesión al estroma medular de los progenitores Ph-positivos, restableciendo de esta forma los mecanismos regulatorios de la proliferación celular⁷⁹.

b) Incremento de la proliferación celular:

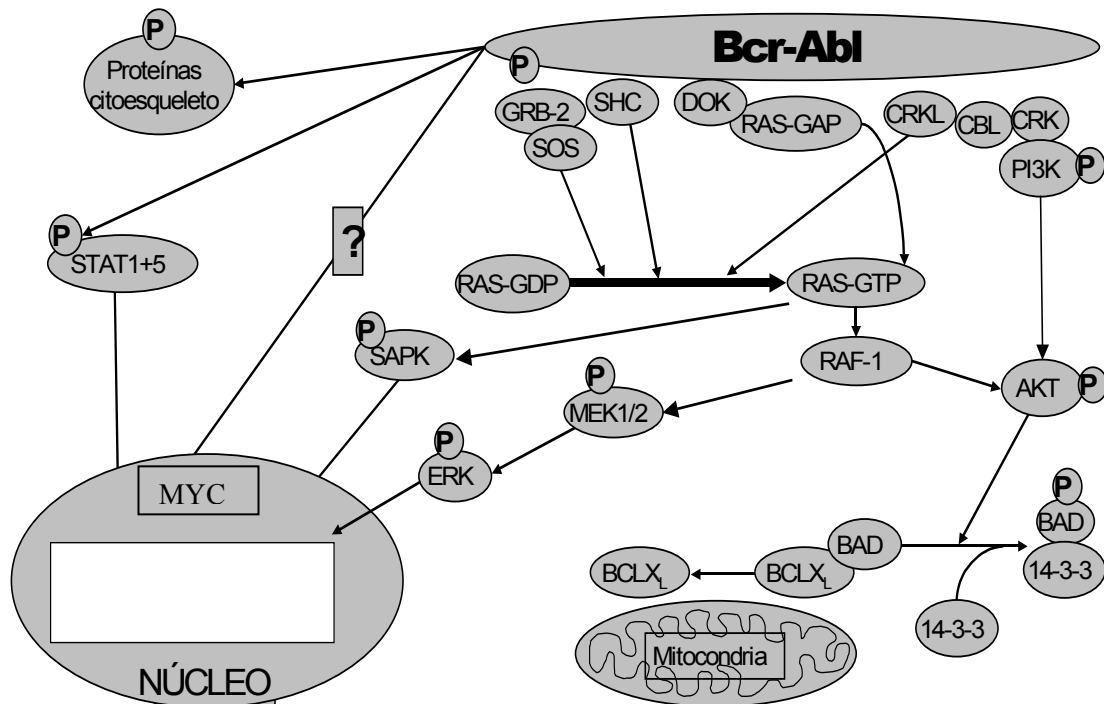
La supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas está controlada fisiológicamente por los factores de crecimiento (eritropoyetina, trombopoyetina, interleucinas, *stem cell factor*, G-CSF), moléculas capaces de activar de forma coordinada diversas rutas de transmisión intracelular de señales mediante su unión a receptores de la membrana celular⁸⁰. Por el contrario, las células leucémicas presentan característicamente una proliferación independiente de los factores de crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo que hace a la LMC, se desconoce en gran medida el efecto de BCR-ABL en la proliferación celular de los distintos progenitores leucémicos. En este sentido, se ha comprobado que los precursores más inmaduros ($CD34^+ CD38^-$) de la LMC tienen una mayor proporción de células en ciclo que los precursores inmaduros no leucémicos, mientras que las células más diferenciadas ($CD34^-$) de la LMC parecen tener

un menor potencial proliferativo que las células normales⁸¹. Una posible explicación al distinto efecto inducido por BCR-ABL en las células CD34⁺ y CD34⁻ podría radicar en sus diferentes niveles de expresión de la oncoproteína. Así, la mayoría de las células de la LMC expresan niveles bajos de BCR-ABL, que son suficientes para inducir un efecto antiapoptótico, pero no proliferativo; en cambio, niveles de expresión más elevados en los progenitores inmaduros CD34⁺ podrían activar señales tanto antiapoptóticas como proliferativas⁸². Por otro lado, el incremento de la proliferación celular inducido por BCR-ABL vendría mediado por la capacidad que tiene esta oncoproteína de activar de forma continua una serie compleja de vías intracelulares de señal, entre las que se encuentran las utilizadas por algunos receptores de los factores de crecimiento⁷². Entre éstas, las consideradas más relevantes en la patogénesis de la LMC son las siguientes (figura 5): 1) *la vía de RAS y de la cinasa MAP*, iniciada con la unión del dominio SH2 de la porción BCR de la proteína BCR-ABL a la proteína adaptadora GRB-2, provocando así la activación constitutiva de RAS⁸³; 2) *la vía de JAK-STAT*, en la que BCR-ABL fosforila las moléculas JAK2 y STAT1/STAT5, encargadas de la transmisión de señales desde los receptores de las citocinas al núcleo celular^{84,85}, 3) *la vía de la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3)*, cuya activación se realiza mediante la formación de complejos multiméricos entre BCR-ABL y la molécula adaptadora CRKL, el protooncogén CBL y la cinasa PI3⁸⁶ y, por último; 4) *la vía de MYC*, que parece activarse fundamentalmente a través de RAS/RAF⁸⁷.

La producción autocrina de IL-3 por los progenitores BCR-ABL positivos podría tener también un papel relevante en el desarrollo y mantenimiento de la

LMC⁸⁸. De hecho, las células de la LMC presentan alteraciones biológicas y bioquímicas similares a las que se observan en células normales expuestas a concentraciones elevadas de IL-3⁸⁹. Junto a ello, el trasplante de células de médula ósea de ratón manipuladas genéticamente para producir IL-3 puede inducir cuadros mieloproliferativos similares al de la LMC⁹⁰. Recientemente, el empleo de técnicas muy sensibles (RT-PCR, ELISA de alta sensibilidad) ha permitido demostrar la expresión genética y la producción de IL-3 y G-CSF por las células CD34+ de pacientes con LMC en fase crónica⁸⁸. De todo lo anterior se deduce que la producción autocrina de estas citocinas por los progenitores de la LMC podría explicar, al menos en parte, su proliferación “aparentemente” independiente de los factores de crecimiento⁴⁴.

Por último, hace poco se ha referido la elevación de los niveles séricos de elastasa granulocitaria en la LMC⁹¹. Esta enzima es una serincinasa capaz de digerir la molécula de G-CSF y otros factores de crecimiento, con lo que contribuye en condiciones fisiológicas a la regulación de la granulopoyesis mediante un mecanismo de *feedback* negativo. En cambio, la producción elevada de elastasa en la LMC podría suprimir preferentemente la hematopoyesis normal G-CSF-dependiente, favoreciendo así la ventaja proliferativa de los progenitores leucémicos, cuya expansión es independiente de los factores de crecimiento.



Adaptado de Kantarjian H et al. *Hematology* 2000.

Figura 5. Vías de transmisión intracelular de señales de la proteína BCR-ABL

c) Inhibición de la apoptosis celular:

La apoptosis es la muerte celular genéticamente controlada en respuesta a la desregulación de oncogenes, al estrés celular o al daño en el ADN. Diversos estudios de laboratorio han evidenciado una falta de apoptosis en las líneas celulares que expresan BCR-ABL tras la retirada de los factores de crecimiento⁹² o la inducción de daño en el ADN^{93,94}. En este sentido, la proteína BCR-ABL es capaz de bloquear la liberación del citocromo C desde la mitocondria, impidiendo de esta forma la acción de las caspasas⁹⁴. No

obstante, los mecanismos biológicos implicados en este fenómeno son complejos, dado que BCR-ABL activa múltiples vías de señal que pueden contribuir a la resistencia de las células leucémicas frente a la muerte programada. Entre ellas, una de las más importantes es la vía de la cinasa PI3, cuya activación resulta en la fosforilación y bloqueo de la proteína proapoptótica BAD, incluida en la familia de bcl-2⁹⁵. Asimismo, la acción antiapoptótica de BCR-ABL se ha relacionado con el incremento de transcripción de c-myc⁹⁶, bcl-2⁹⁷, bclx⁹⁸ y, más recientemente, de NF-κβ⁹⁹.

Paradójicamente, la proteína BCR-ABL es capaz de inducir apoptosis en células de LMC cuando es introducida experimentalmente y atrapada en el núcleo celular, preservando su actividad tirosincinasa. Así se ha demostrado en un estudio reciente¹⁰⁰, en el que se administró un tratamiento combinado con imatinib y leptomicina B a células de ratón transfectadas con el gen BCR-ABL. En la primera parte del experimento se comprobó que la localización citoplasmática exclusiva de la proteína BCR-ABL era dependiente de su actividad tirosincinasa, pues la inhibición de la enzima con imatinib permitía el paso de BCR-ABL al núcleo celular. Posteriormente se observó que la adición de leptomicina B al medio de cultivo bloqueaba la salida de BCR-ABL del núcleo celular, facilitando así su acumulación a dicho nivel. Finalmente, los autores demostraron que el efecto proapoptótico de BCR-ABL era consecuencia de su actividad tirosincinasa, dado que no se observó apoptosis celular hasta que no se eliminó el imatinib del medio de cultivo. El hecho de que la molécula BCR-ABL pueda inducir apoptosis en función de su localización intracelular concuerda con el papel que desempeña la proteína c-

ABL nuclear en la activación de la muerte celular en respuesta al daño del ADN en condiciones fisiológicas¹⁰¹.

1.3. PATOGÉNESIS DE LA PROGRESIÓN DE LA LMC

1.3.1. Introducción

En contraste con el amplio conocimiento de la patogénesis de la fase crónica de la LMC, los mecanismos implicados en la progresión de esta enfermedad permanecen todavía en gran medida por dilucidar¹⁰². Además, la heterogeneidad fenotípica de las células blásticas de la crisis blástica (CB) sugiere que puedan existir diferentes anomalías moleculares implicadas en cada caso. De cualquier forma, las alteraciones de la biología celular presentes en la fase crónica de la LMC (disminución de la apoptosis, inestabilidad genómica) parecen contribuir de forma decisiva a la transformación aguda de la enfermedad¹⁰³. Así, el efecto antiapoptótico de la proteína BCR-ABL podría facilitar que la población neoplásica proliferante presentara el riesgo de desarrollar nuevas alteraciones moleculares hasta que, en un momento dado, alguna de las subclonas anómalas resultantes adquiriera una ventaja proliferativa y diera origen a la CB. Asimismo, la expresión continuada de BCR-ABL parece conferir *per se* inestabilidad genómica, acentuada en los casos (10-20%) que presentan deleciones del cromosoma 9 derivativo, dado que estos pacientes progresan más rápidamente a la CB, desarrollando el mismo tipo de alteraciones citogenéticas secundarias que el resto de enfermos⁶⁶⁻⁶⁸.

A continuación se repasan las diferentes alteraciones citogenéticas, moleculares y celulares que se han involucrado en la patogénesis de la progresión de la LMC a su fase de CB. Un esquema general simplificado de dicho proceso puede verse en la siguiente figura (figura 6).

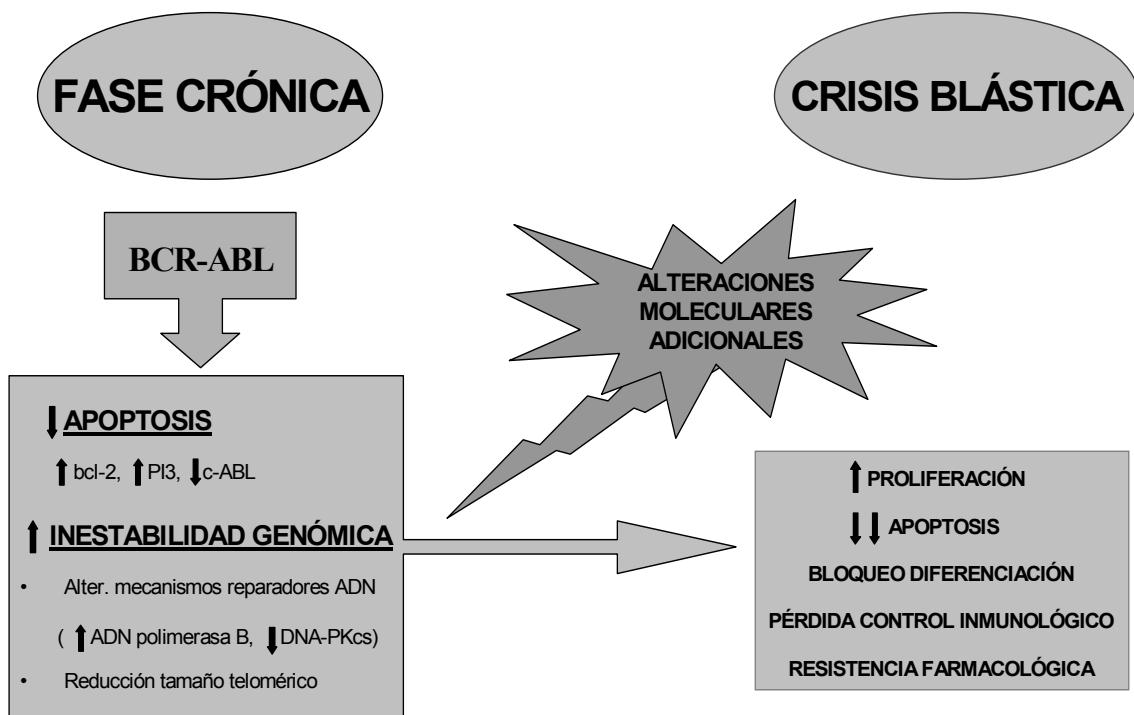


Figura 6. Esquema general de la patogénesis de la progresión de la LMC

1.3.2. Alteraciones citogenéticas

Mientras al diagnóstico de la LMC menos de un 10% de los pacientes presentan alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Ph, la progresión de la enfermedad a la fase de CB se acompaña de nuevas anomalías en un 60-80% de los casos, siendo las más frecuentes la duplicación del Ph, la trisomía 8 y el isocromosoma 17q (i17q)^{18,104,105}. También se observan de forma recurrente trisomías de los cromosomas 19, 21 y 17, monosomía del 7 y diversas alteraciones de 3q, si bien su incidencia es mucho menor. El grado de complejidad de las alteraciones citogenéticas de la CB resulta aún mayor si se aplican técnicas de alta sensibilidad, como la hibridación genómica comparada, mediante la cual se detectan también pérdidas frecuentes de material genético en 1p, 7p, 9p, 19p y 20q. Junto a ello, en muchas ocasiones se observan cariotipos complejos en la CB, que reflejan la coexistencia de múltiples subclonas leucémicas. A pesar de toda esta información, las anomalías moleculares que se derivan de estos cambios citogenéticos son desconocidas en su mayoría. Desde el punto de vista clínico, la evolución clonal es casi siempre un marcador de progresión de la LMC, pero no todas las alteraciones citogenéticas anteriormente mencionadas tienen el mismo significado pronóstico. En este sentido, el i17q parece ser un fenómeno tardío en la evolución de la LMC, de forma que su detección podría anunciar una rápida progresión a CB¹⁰⁶. Típicamente, los pacientes con i17q presentan basofilia intensa en sangre periférica y tienen casi siempre una CB de fenotipo mielóide¹⁰⁷. Por otra parte, se ha descrito la asociación entre determinadas alteraciones citogenéticas y el esquema de tratamiento utilizado en la LMC.

Así, la trisomía 8 se ha registrado con mayor frecuencia en pacientes tratados con busulfán (44%) que con hidroxiurea (12%)¹⁰⁸. A su vez, la incidencia de alteraciones citogenéticas secundarias parece ser menor en los enfermos tratados con IFN que con busulfán, lo que sugiere que el tratamiento con agentes que dañan el ADN incrementa la inestabilidad genética derivada de la actividad tirosincinasa anómala de BCR-ABL. Por todo ello, será interesante comprobar qué tipo de evolución clonal desarrollan los pacientes que progresen a CB tras el tratamiento con imatinib.

1.3.3. Alteraciones moleculares

En general, la información disponible acerca de las alteraciones moleculares implicadas en la progresión de la LMC es limitada. Si bien se han descrito múltiples anomalías moleculares en la CB, tales como la inactivación de p53, de p16 o del gen del retinoblastoma (Rb), éstas ocurren en un número relativamente pequeño de casos y, además, no son específicas de esta enfermedad². A continuación, se enumeran las más frecuentes según la bibliografía.

a) Inactivación de genes supresores de tumores:

En las células de los organismos eucariotas el daño en el ADN induce la activación de una serie de proteínas, entre las que se encuentra p53, cuya misión es bloquear el ciclo celular en la fase G₁-S, de forma que puedan actuar los mecanismos reparadores del ADN. En este sentido, p53 funciona como un

gen supresor de tumores capaz de detener el ciclo celular y facilitar la apoptosis de las células con alteraciones genéticas¹⁰⁹. El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y su inactivación debido a mutaciones, deleciones o reordenamientos constituye la anomalía molecular más frecuentemente observada en la CB de la LMC¹¹⁰⁻¹¹⁴. Así, las alteraciones de p53 se observan en un 20-30% de los pacientes con CB, principalmente en las de fenotipo mieloide, mientras que son excepcionales en la fase crónica de la enfermedad. Junto a ello, existen datos de laboratorio que apoyan la implicación de la pérdida de función de p53, incluso de uno solo de sus alelos, en la patogénesis de la progresión de la LMC. Así, en un estudio en que se cruzaron dos tipos de ratones transgénicos, unos manipulados para expresar BCR-ABL y otros heterocigotos para las mutaciones de p53 (p53^{+/-}), se comprobó que la progenie quimérica BCR-ABL⁺-p53^{+/-} desarrollaba una progresión a CB en menor espacio de tiempo que sus progenitores BCR-ABL⁺¹¹⁵. De forma similar, en otro modelo murino el trasplante de médula ósea con células deficientes de p53 que tenían insertado el gen BCR-ABL ocasionó la aparición precoz de la CB¹¹⁶.

Las alteraciones del locus INK4A/ARF (9p21) se han implicado en la patogénesis de la progresión de diversas neoplasias hematológicas¹¹⁷, incluida la LMC¹¹⁸⁻¹²⁰. Este locus codifica la síntesis de dos genes supresores de tumores derivados de la transcripción del exón 2, común a ambos, con secuencias alternativas del exón 1 (exón 1 α y exón 1 β para p16^{INK4A} y p14^{ARF}, respectivamente)¹²² (figura 7). P16 bloquea el ciclo celular en la fase tardía de G1 impidiendo la fosforilación de la proteína del Rb por el complejo ciclina

D/cdk4/6¹²³. En cambio, la expresión de p14 detiene el ciclo celular en G1 y G2 mediante su interacción con MDM2, lo que permite la estabilización de p53 en el núcleo celular, evitando así su transporte y degradación en el citoplasma¹²⁴. Con respecto a la LMC, diversos estudios han demostrado la existencia de deleciones homocigotas de p16 en un 20-50% de los pacientes con CB de fenotipo linfoide, mientras que este gen estaría conservado tanto en la fase crónica como en las CB de estirpe mieloide¹¹⁹⁻¹²³. No existe información específica sobre el estado de p14 en esta enfermedad, si bien las alteraciones del exón 2 del locus INK4A/ARF afectarían tanto a p16 como a p14. De acuerdo con estos datos, las deleciones de p16 constituirían la alteración molecular más frecuentemente observada en las CB linfoides.

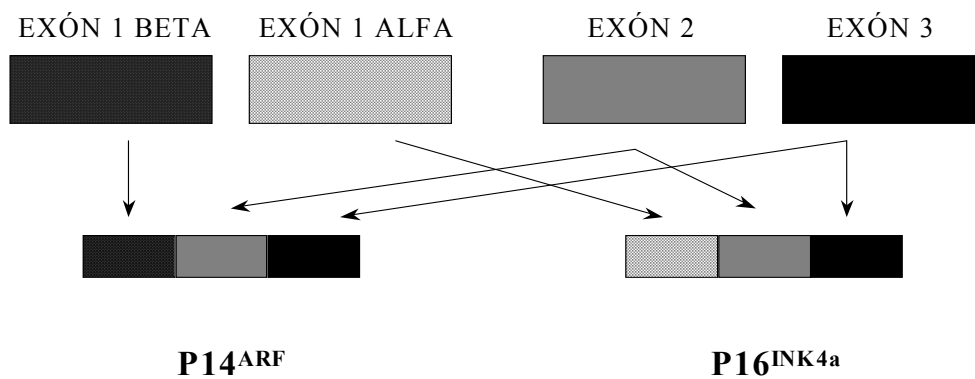


Figura 7. Estructura del locus INK4A/ARF (9p21)

Uno de los mecanismos implicados en la patogenia de las neoplasias humanas es la inactivación de genes involucrados en el control del ciclo celular por hipermetilación de sus promotores. En este sentido, la hipermetilación del promotor proximal del gen c-ABL (9q34) implicado en la t(9;22) se ha asociado de forma consistente y específica con la progresión de la LMC¹²⁵⁻¹²⁶. Durante la fase crónica, el promotor del gen c-ABL permanece hipometilado, permitiendo así la síntesis de la proteína p145^{ABL}, cuya actividad a nivel del núcleo celular promueve la reparación del ADN y la inducción de apoptosis. En cambio, la inactivación de c-ABL por metilación de su promotor tiene como consecuencia un defecto en la producción de p145^{ABL}, que podría contribuir a la inestabilidad genómica observada conforme progresa la LMC. Otro gen cuyo promotor se encuentra con frecuencia hipermetilado en las fases avanzadas de la LMC es el de la calcitonina¹²⁷, pero no está bien establecido el papel de esta alteración en la progresión de la enfermedad.

De forma similar, se desconoce el significado de la falta de expresión de la proteína codificada por el gen del Rb (13q14) en la progresión de la LMC, alteración observada en casi todos los casos de CB megacarioblástica, pero no en los de estirpe mieloide o linfoide¹²⁸.

b) Activación de oncogenes:

El incremento en la expresión de ARNm de BCR-ABL se ha asociado de forma consistente con la progresión de la LMC¹²⁹⁻¹³⁰. Esta alteración puede ser consecuencia bien de un aumento en la actividad transcripcional del gen BCR-

ABL o de su amplificación secundaria a la duplicación del cromosoma Ph^{18,104,105}, anomalía citogenética registrada en el 20-30% de los pacientes con CB. Aunque la sobreexpresión de BCR-ABL se acompaña de una mayor actividad antiapoptótica y del desarrollo de resistencia a diversos agentes citolíticos¹³¹, el mecanismo íntimo por el cual esta alteración podría contribuir a la progresión de la LMC no está clarificado.

El oncogén c-myc, localizado en los brazos largos del cromosoma 8 (8q24), se encuentra sobreexpresado en alrededor de un 20% de los enfermos con CB, mientras su expresión es normal en la fase crónica de la LMC¹³². Distintos mecanismos se han involucrado en la sobreexpresión de c-myc de la CB, como el aumento de transcripción del gen¹³³, su amplificación tras la formación de la trisomía 8¹³⁴ o la estabilización del ARNm de c-myc mediante poliadenilación¹³⁵. Existen datos experimentales que apoyan la implicación de la sobreexpresión de c-myc en la transformación de la LMC, como el hecho de que el bloqueo de c-myc con oligonucleótidos antisentido en un modelo murino permitiera suprimir la formación de colonias *in vitro* y la leucemogénesis *in vivo* de células blásticas de la LMC¹³⁶. En cuanto a la capacidad transformante de c-myc, ésta parece derivar de la activación anómala de una vía de transducción de señal independiente de la de la proteína BCR-ABL^{137,138} y de su efecto antagónico sobre la función de p53^{133,139}.

El gen Evi-1 (*ectopic virus integration site-1*), localizado en 3q26, es un regulador de la transcripción cuyo potencial leucemógeno se ha demostrado en estudios de transfección del gen en fibroblastos. La sobreexpresión de este gen bloquea la diferenciación mieloide normal, al parecer mediante la interferencia

con los factores de transcripción GATA¹⁴⁰. No obstante, únicamente un 5-15% de los pacientes con CB mieloide presentan reordenamientos de 3q26¹⁴¹⁻¹⁴³, por lo que las alteraciones de Evi-1 podrían contribuir a la progresión de la LMC en tan sólo una pequeña proporción de casos. Por otra parte, la sobreexpresión de Evi-1 en la CB de la LMC se ha asociado con la presencia de displasia megacariocítica¹⁴¹.

Por último, aunque la activación de Ras tiene un papel central entre las alteraciones biológicas provocadas por la proteína BCR-ABL^{144,145}, únicamente un 7% de los pacientes con CB presenta mutaciones de la familia de protooncogenes Ras^{146,147}.

c) Alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN:

Algunos autores han sugerido que las alteraciones citogenéticas y moleculares observadas en la transformación de la LMC son en realidad consecuencia de la inestabilidad genómica de la clona Ph-positiva. Pese a ello, hasta el momento no se ha demostrado que la inestabilidad de los microsatélites juegue un papel relevante en la progresión de la LMC^{148,149}, a diferencia de lo que sucede en otras neoplasias. En cambio, en los últimos años se han descrito una serie de alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN de las células Ph-positivas que podrían ser responsables de la inestabilidad genómica de la clona proliferante, facilitando la acumulación de lesiones moleculares adicionales cuyo resultado final sería el desarrollo de la CB. Así, en líneas celulares se ha comprobado la capacidad de la proteína BCR-ABL de interactuar con las proteínas B del xeroderma pigmentoso^{150,151}

aumentando la expresión de la polimerasa de ADN beta, que es la polimerasa humana de menor fidelidad. Junto a ello, la molécula BCR-ABL puede disminuir la expresión de diversas proteínas reparadoras del ADN en células humanas y de ratón¹⁵², entre las que se encuentra la subunidad catalítica del complejo cinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs). En este sentido, la reducción de los niveles de DNA-PKcs en células BCR/ABL-positivas se ha asociado en un estudio a un incremento en la frecuencia de alteraciones citogenéticas adquiridas tras exposición a radiaciones ionizantes¹⁵². Recientemente, los mismos autores han comunicado la existencia de una correlación inversa entre los niveles de expresión de BCR-ABL y de BRCA-1, proteína implicada en el mantenimiento de la integridad del genoma¹⁵³. Por último, la hipermetilación del gen c-ABL podría asimismo contribuir a los defectos de reparación del ADN observados en la CB^{125,126,154}.

1.3.4. Alteraciones de la biología celular

a) Incremento de la proliferación celular:

Los telómeros consisten en secuencias repetitivas T₂AG₃ situadas en los segmentos terminales de cada cromosoma cuya función es estabilizar el ADN durante el proceso de división celular¹⁵⁵. Fisiológicamente, las células somáticas humanas pierden secuencias teloméricas con cada división celular, de forma que el tamaño de los telómeros va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un punto crítico en el cual el incremento de la inestabilidad cromosómica contribuye a la pérdida de la viabilidad celular. En este sentido, el

tamaño de los telómeros podría ser considerado como un reloj biológico, indicativo del número de replicaciones que una célula ha realizado. A diferencia de las células somáticas, las células germinales y los progenitores hematopoyéticos inmaduros con capacidad de autorrenovación disponen de una enzima, denominada telomerasa, que es capaz de añadir secuencias teloméricas distales que permiten mantener la viabilidad celular a pesar de una elevada actividad proliferativa.

Por lo que respecta a la LMC, diversos estudios han demostrado la reducción del tamaño de los telómeros de las células leucémicas conforme la enfermedad progresa¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. En concreto, recientemente se ha comprobado que el tamaño de los telómeros en los granulocitos de pacientes en fase crónica de la LMC es alrededor de 1 kb menor que el de los granulocitos de controles sanos¹⁵⁹. Esto implicaría que la clona leucémica de la fase crónica ha completado 10 divisiones celulares más que los progenitores sanos, dado que con cada mitosis se pierden cerca de 100 pares de bases de ADN telomérico. Si asumimos además la existencia de un período de latencia de 6-7 años entre el fenómeno mutagénico inicial y el diagnóstico de la LMC, se puede deducir que durante todo ese tiempo los progenitores malignos habrían realizado entre 1 y 2 divisiones extra cada año⁴⁴. No obstante, cabe reseñar que la validez de estas estimaciones depende de que no exista actividad telomerasa durante las fases iniciales de la LMC, como parece desprenderse de los datos de la bibliografía. En cambio, en la CB se observa frecuentemente la sobreexpresión de esta enzima, cuya actividad podría contribuir a mantener la integridad

celular a pesar del rápido incremento en la actividad mitótica observado en esta fase de la enfermedad¹⁵⁶.

Teniendo en cuenta lo anterior, algunos autores han postulado un modelo de patogénesis de la progresión de la LMC basado en la importancia de las alteraciones en los telómeros cromosómicos. Según este modelo, el tamaño de los telómeros de las células leucémicas iría disminuyendo progresivamente a lo largo de la evolución de la LMC hasta alcanzar un punto crítico en el cual la inestabilidad genómica facilitara la adquisición de alteraciones moleculares adicionales al cromosoma Ph. En ese momento, sólo las subclonas Ph-positivas con actividad telomerasa aumentada podrían continuar dividiéndose sin reducción del tamaño de sus telómeros, de forma que la ventaja proliferativa de éstas pudiera acabar originando el desarrollo de la CB de la LMC⁴⁴.

b) Disminución de la apoptosis:

Como ya se comentó en el apartado correspondiente a la patogénesis de la LMC en su fase crónica, la proteína BCR-ABL ejerce un efecto inhibitorio de la apoptosis celular que está mediado principalmente, aunque no de forma exclusiva, por el incremento de expresión de diversas proteínas antiapoptóticas de la familia de bcl-2¹⁶⁰⁻¹⁶². A su vez, la cantidad de proteína BCR-ABL activa a nivel citoplasmático parece guardar relación con el grado de protección frente a la muerte celular programada¹⁶⁰. Así, el incremento de expresión de BCR-ABL que se observa en muchos pacientes conforme la enfermedad progresa podría facilitar el desarrollo de una mayor resistencia a la apoptosis celular. Junto a

ello, la progresiva metilación del promotor de c-ABL a lo largo de la evolución de la LMC^{125,126} podría contribuir también a la desregulación del ciclo celular, al comprometer el efecto proapoptótico que la proteína c-ABL (p145) ejerce a nivel del núcleo celular. Por otra parte, en la CB se observan con frecuencia alteraciones moleculares que conducen a la pérdida de función de genes supresores de tumores, como p53¹⁰⁹⁻¹¹¹ o p16¹¹⁸⁻¹²¹, cuya actividad se relaciona con el control del ciclo celular y la inducción de apoptosis en respuesta a las lesiones en el ADN.

c) Bloqueo de la diferenciación celular:

Durante la fase crónica de la LMC la expresión de la proteína BCR-ABL no parece influir de forma significativa en el proceso de diferenciación normal de los progenitores hematopoyéticos en las distintas líneas celulares. En cambio, en la CB dicho proceso está abolido y la proliferación celular conduce a una acumulación de las células más inmaduras o blásticas¹⁶¹⁻¹⁶³. De lo anterior se deduce que los mecanismos implicados en el bloqueo de la diferenciación celular que aparece en la CB son probablemente independientes al reordenamiento BCR-ABL. Así, distintos autores han postulado que la formación de nuevos oncogenes, la elevación en los niveles de citocinas o la inactivación de genes supresores de tumores podrían ser los responsables de este fenómeno¹⁶⁴. En esta línea, un trabajo reciente ha demostrado la inactivación postranscripcional de la proteína C/EBP α , principal regulador de la diferenciación granulocítica, coincidiendo con la transición de la LMC de la fase crónica a la CB mieloide¹⁶⁵. Paralelamente, otro grupo ha demostrado que la

expresión ectópica de la proteína C/EBP α en una línea celular de CB (KCL22) deficiente de dicha proteína es suficiente para inducir la diferenciación granulocítica terminal de las células blásticas¹⁶⁶. Al comparar mediante *microarrays* el perfil de expresión génica de las células KCL22 transfectadas con C/EBP α con el de aquéllas sin vector, se observó que C/EBP α regulaba al alza la expresión de genes implicados en la maduración granulocítica (CXCR4, TIM) y a la baja la de genes codificadores de factores de transcripción involucrados en la proliferación celular (GATA2, MYC)¹⁶⁶.

Por otra parte, recientemente se ha descrito una nueva alteración biológica de las células de la CB: la adquisición de capacidad de autorrenovación por parte de los progenitores granulo-monocíticos a través de la activación de la vía de la β -catenina¹⁶⁷. En general, esta fracción de progenitores carece habitualmente de capacidad de autorrenovación, a diferencia de lo que ocurre con las *stem cells* hematopoyéticas. Sin embargo, según este trabajo, la activación anómala de la vía de la β -catenina podría aumentar la proliferación, impedir la diferenciación y promover la autoperpetuación de los progenitores granulo-monocíticos, contribuyendo de esa forma a elevar su potencial leucémico.

d) Pérdida de control inmunológico:

Diversos mecanismos inmunes restringidos o no al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ejercen un importante papel en el control de la clona leucémica durante la historia natural de la LMC¹⁶⁸. Entre los mecanismos dependientes del CMH se encuentra la lisis de células diana por linfocitos T

mediante la vía del receptor Fas. Así, en los pacientes con LMC existen linfocitos T citotóxicos circulantes anérgicos que pueden ser reactivados *ex vivo* tras su incubación en medios con dosis altas de interleucina-2 (IL-2), de forma que actúen de forma selectiva frente a los progenitores de la LMC¹⁶⁹. Sin embargo, mientras en la fase crónica de la LMC este mecanismo inmunológico parece contribuir al control de la enfermedad, las células de los pacientes con CB son refractarias a la apoptosis mediada por Fas^{170,171}. Un mecanismo alternativo de control inmunológico no restringido por el CHM es el mediado por las células NK. De este modo, las células NK activadas con IL-2 pueden suprimir de forma selectiva el crecimiento de los progenitores neoplásicos de la LMC, respetando a su vez los progenitores benignos¹⁷². Es más, en un estudio realizado con líneas celulares de CB de la LMC la sobreexpresión de BCR-ABL incrementó la susceptibilidad a la citólisis mediada por células NK¹⁷³. Con todo, en la CB existe una disminución del funcionalismo NK, si bien se desconoce si esta alteración contribuye a la progresión de la enfermedad o es tan sólo una consecuencia de la misma¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

e) Resistencia farmacológica:

Históricamente, la evolución natural de la LMC a la fase de CB se ha caracterizado por el desarrollo progresivo de resistencia a los fármacos (busulfán, hidroxiurea, IFN) que permiten controlar adecuadamente la enfermedad durante la fase crónica⁶⁻⁸. En general, dicha resistencia está mediada por una interferencia con la adecuada distribución e interacción del agente citotóxico con las células diana o por una alteración en los mecanismos

moleculares implicados en la respuesta celular al daño en el ADN inducido por el tratamiento. En esta línea, se ha observado una asociación entre la refractariedad al tratamiento quimioterápico de la CB y la sobreexpresión de glicoproteína P, molécula implicada en la expulsión de agentes citotóxicos del interior celular¹⁷⁷. De la misma forma la pérdida de p53, cuya actividad conduce al bloqueo del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN, se ha relacionado con la resistencia farmacológica de una proporción de pacientes con CB¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. A su vez, el efecto de la sobreexpresión de BCR-ABL retrasando la progresión del ciclo celular a nivel del punto de control G2/M podría también contribuir al desarrollo de resistencias, facilitando la reparación del daño en el ADN inducido por los agentes citotóxicos y seleccionando así aquellas subclonas con un cariotipo anómalo¹⁷⁸.

En los últimos años se han producido importantes avances en el tratamiento de la LMC, entre los que destaca la reciente introducción de una molécula capaz de inactivar de forma específica la proteína BCR-ABL, el imatinib (Glivec®, Novartis). La elevada eficacia y excelente tolerancia demostradas por imatinib en los diferentes ensayos clínicos han motivado un cambio radical en el enfoque terapéutico de la LMC, de forma que en la actualidad este agente constituye el tratamiento de elección para la mayoría de los pacientes¹⁷⁹⁻¹⁸². Sin embargo, desgraciadamente no todos los enfermos con LMC responden de entrada a este tratamiento, mientras que en algunos casos la respuesta es sólo transitoria. En este sentido, la frecuencia de resistencias varía en función de la fase evolutiva de la LMC y de la definición de respuesta escogida¹⁸³. Si se considera como respuesta únicamente la normalización de los valores

hematológicos, el porcentaje de pacientes que presentan resistencia hematológica de entrada es inferior al 5% en la fase crónica de la LMC, pero aumenta hasta el 66% y el 85% en las fases de aceleración y de CB, respectivamente. A su vez, mientras que en la fase crónica menos de un 10% de los enfermos que responden al imatinib progresan durante el primer año de tratamiento, esta proporción se incrementa hasta casi el 50% en la fase de aceleración y a más del 90% en la CB¹⁸¹. De forma resumida, los mecanismos fundamentales de resistencia al imatinib referidos en la bibliografía son los siguientes: a) las mutaciones del dominio catalítico de BCR-ABL¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, que constituyen el mecanismo más frecuentemente implicado en las resistencias adquiridas a este fármaco y cuya consecuencia es la menor afinidad de la oncoproteína por el imatinib; b) la amplificación del gen BCR-ABL¹⁸⁷, c) la inhibición subóptima de la proteína BCR-ABL, debida a la inactivación del imatinib en el plasma por la glicoproteína α -1 ácida¹⁸⁸ o a la administración de dosis infraterapéuticas de imatinib (< 300 mg/día); y d) la existencia de alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Ph, cuya presencia se ha relacionado con la falta de respuesta al imatinib desde el inicio del tratamiento¹⁸³.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Desde hace años se intentan identificar los mecanismos moleculares responsables de la progresión de la LMC a su fase final de CB. A pesar de ello, poco se sabe hasta el momento del tema, lo que contrasta con el amplio conocimiento acerca de la patogénesis de la fase crónica de la enfermedad. A este respecto, la adquisición de anomalías cromosómicas (casi siempre siguiendo un patrón típico) en la CB sugiere que ésta aparecería como resultado de uno o más cambios genéticos y/o moleculares en una subclona de la fase crónica. A su vez, serían estas alteraciones moleculares adicionales las responsables de la refractariedad al tratamiento que se observa con la progresión de la LMC. En este sentido, la reciente introducción con éxito de un agente farmacológico capaz de bloquear de forma específica la proteína BCR-ABL, el imatinib, ha suscitado un enorme interés por conocer las alteraciones moleculares que coexisten junto al cromosoma Ph en la clona leucémica de la LMC, pues su papel en el eventual fracaso a este tratamiento puede ser crucial. Asimismo, parece importante profundizar en la biología molecular de la LMC como un primer paso para poder identificar nuevas dianas moleculares que puedan ser utilizadas en las futuras estrategias terapéuticas de esta enfermedad. Por último, resulta de interés conocer el posible significado pronóstico de las distintas alteraciones moleculares adquiridas en la CB, de cara a seleccionar de forma óptima el tratamiento en cada paciente.

En este contexto, nos planteamos realizar dos trabajos de investigación con los siguientes objetivos:

- a) Determinar la frecuencia de alteraciones genómicas (deleciones y metilaciones) del gen supresor de tumores p16 en una serie de 42 pacientes con LMC Ph-positiva estudiados de forma secuencial en la fase crónica y en la de CB. Además, investigar la posible relación de las alteraciones del citado gen con las características clínico-hematológicas de los pacientes y el pronóstico de la CB.

- b) Determinar el patrón de expresión de la proteína antiapoptótica survivina en las distintas fases evolutivas de la LMC y analizar las posibles correlaciones entre la expresión de survivina, el índice de proliferación celular y el perfil clínico de la LMC.

3. *RESULTADOS*

3.1. TRABAJO I:

ALTERACIONES GENÓMICAS DEL GEN P16

EN LA PROGRESIÓN DE LA LMC:

ESTUDIO SECUENCIAL DE 42 PACIENTES

3.1.1. RESUMEN

Recientemente se han detectado alteraciones del locus INK4A/ARF (9p21) en diversas neoplasias hematológicas, incluida la LMC. Este locus parece desempeñar un papel fundamental en el control del ciclo celular, debido a que codifica la síntesis de dos genes supresores de tumores, p16^{INK4A} y p14^{ARF}. Así, p16 bloquea el ciclo celular en la fase tardía de G1, impidiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) por el complejo ciclina D/cdk4/6. A su vez, la expresión de p14 detiene el ciclo celular en G1 y G2 mediante su interacción con MDM2, lo que permite la estabilización de p53 en el núcleo celular, evitando así su transporte y degradación en el citoplasma. Por tanto, las alteraciones genómicas del locus INK4A/ARF pueden interferir con dos vías distintas de control del ciclo celular, p16/Rb y p14/p53, cuya desregulación podría contribuir a la progresión tumoral.

Por lo que respecta a la LMC, se ha descrito la presencia de deleciones homocigotas de p16 en una proporción significativa de pacientes con CB linfoide mientras que, por el contrario, éstas no se detectan en la fase crónica ni en la CB de estirpe mieloide. Con todo, los trabajos publicados al respecto presentan una serie de limitaciones metodológicas que impiden establecer conclusiones firmes acerca del estado de p16 en la LMC. Así, el número de pacientes estudiados es reducido y falta un análisis secuencial del estado de p16 en las distintas fases de la LMC. Además, la información disponible acerca de las deleciones de p16 se basa en la aplicación de técnicas moleculares no cuantitativas, como el Southern Blot o la PCR convencional, con la consecuente limitación que ello supone a la hora de detectar deleciones en

muestras celulares heterogéneas. Por otra parte, la hipermetilación del promotor de p16 no figura entre los mecanismos involucrados en la inactivación de este gen en la LMC, si bien el número de casos estudiados hasta el momento es muy limitado.

Por todo ello, el objetivo principal del presente estudio fue analizar mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (“real-time” PCR) y de PCR convencional semicuantitativa la presencia de deleciones de p16 en una serie de 42 pacientes con LMC Ph-positiva estudiados de forma secuencial en su fase crónica y en la CB. Además, se determinó el estado de metilación de p16 en las distintas fases de la enfermedad y se investigó la posible relación de las alteraciones del citado gen con las características clínico-hematológicas de los pacientes y el pronóstico de la CB.

Los resultados mostraron que 6 de las 21 muestras (29%) de pacientes con CB linfoide tenían deleciones homocigotas de p16, frente a la ausencia total de éstas en la fase crónica y en la CB mieloide. Se comprobó la buena correlación existente (97,8%) entre los datos obtenidos mediante las técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real y de PCR convencional semicuantitativa, observándose discrepancias en tan sólo dos casos. Por otra parte, ninguno de los casos analizados presentó hipermetilación del promotor de p16. A su vez, no se observó la existencia de un perfil clínico-hematológico característico de la CB con deleción de p16, a excepción de su fenotipo linfoide exclusivo. Por último, la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes con CB linfoide no dependió de la existencia de deleciones de p16.

En conclusión, cerca de una tercera parte de los pacientes con CB linfoide tienen deleciones homocigotas de p16, cuya presencia no parece asociarse con un perfil clínico característico de la CB ni tiene valor pronóstico. La técnica de PCR a tiempo real constituye un método simple y seguro para determinar el estado delecional del gen p16.

Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: A sequential study in 42 patients

Juan-Carlos Hernández-Boluda^a, Francisco Cervantes^a, Dolors Colomer^b, Mari-Carmen Vela^b, Dolors Costa^c, María-Fe Paz^d, Manel Esteller^d, and Emilio Montserrat^a

^aHematology Department, ^bHematopathology Unit and ^cDepartment of Genetics, Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain;

^dCancer Epigenetics Laboratory, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain

(Received 13 June 2002; revised 21 October 2002; accepted 12 November 2002)

Objective. The molecular abnormalities involved in the progression of chronic myeloid leukemia (CML) are poorly understood. Genetic alterations of the INK4A/ARF locus have been implicated in the lymphoid blast crisis (BC), but sequential studies are not available. The aim of this study was to contribute to a better knowledge of the status of such locus in the different phases of CML and to analyze the prognostic significance of its inactivation.

Materials and Methods. Sequential assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and conventional semiquantitative PCR of p16 exon 2 deletions was performed in 42 CML patients in whom paired DNA samples from the chronic phase and the BC were available. Samples of 10 healthy donors and 30 patients with nonleukemic myeloproliferative syndromes served as controls. The methylation status of the promoter region of the p16 gene was also studied by methylation-specific PCR.

Results. The concordance rate between the two PCR techniques was 97.8% (87/89). By real-time PCR, homozygous p16 deletions were found in 6 of 21 patients (29%) with lymphoid BC, whereas they were not observed in chronic-phase CML nor in 21 myeloid BC patients. Hypermethylation of the p16 gene was not detected in any of the lymphoid BC. No specific clinical profile was associated with homozygous p16 deletions. Therapeutic response and survival did not significantly differ in p16-deleted and p16 germline lymphoid BC patients.

Conclusion. P16 gene deletions are detected in a substantial proportion of lymphoid BC of CML by quantitative real-time PCR analysis, but this is not associated with any clinico-hematological feature other than lymphoid phenotype and does not influence the patients' outcome. Such technique is simple and reliable to assess the p16 gene status. © 2003 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Science Inc.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by the clonal expansion of a pluripotent hemopoietic stem cell containing the Philadelphia (Ph) chromosome, result of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, whose molecular counterpart is the BCR-ABL fusion gene [1]. The disease typically follows a biphasic evolutive course, in which an initial easily controlled chronic phase invariably evolves into a terminal, acute leukemia-like phase, the blast crisis (BC) of CML, refrac-

tory to treatment [2]. The role of the BCR-ABL oncogene in the pathogenesis of CML has been demonstrated [3]. However, although secondary nonrandom cytogenetic abnormalities are observed in 50 to 80% of patients coincidentally with the appearance of the BC, the underlying molecular mechanisms responsible for CML progression are poorly understood [4,5]. In this sense, the phenotypic heterogeneity of the blast cells in the BC might indicate that different molecular pathways could operate in its development [5].

Recently, several abnormalities of the human INK4A/ARF locus (9p21) have been detected in different hematological malignancies [6,7]. This locus seems to play an important role in the control of the cell cycle, since it encodes for two different tumor suppressor genes, p16^{INK4A} and

Offprint requests to: Francisco Cervantes, M.D., Hematology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; E-mail: fcervan@clinic.ub.es

p14^{ARF} (p19^{ARF} in mice) [8]. As far as CML is concerned, p16 abnormalities consist mainly of homozygous deletions, which have been detected in lymphoid BC but not in the chronic phase, nor in the myeloid BC [9–12]. This observation would therefore support a possible implication of the p16 abnormalities in the pathogenesis of lymphoid BC. However, before any definitive conclusion can be drawn, several limitations of the available studies must be taken into account. Firstly, data on sequential analysis of paired samples from both the chronic phase and the BC are scarce. Moreover, in most published studies nonquantitative techniques, mainly Southern blotting and conventional polymerase chain reaction (PCR) analysis, have been employed, which not only yield a positive/negative result but also require a high tumor/normal cell ratio to allow detection of gene deletions. In this regard, the recent introduction of real-time PCR techniques could represent an important step towards the accurate quantification of the gene status.

The primary aim of the present study was to assess, by means of a quantitative real-time PCR assay, the possible existence of deletions of the p16 exon 2 in 42 CML patients with available paired DNA samples from both the chronic phase and the BC, in order to contribute to a better knowledge of the status of the INK4A/ARF locus in the different phases of the disease. To validate the results of quantitative real-time PCR, a side-by-side comparison analysis was performed with conventional semiquantitative multiplex PCR. Beside this, the possible prognostic significance of p16 deletions for the outcome of BC patients was also analyzed.

Materials and methods

Patient population, diagnostic criteria, and treatment

Forty-two patients diagnosed with BC of Ph⁺ CML from July 1988 to October 2001, in whom paired DNA samples were available from both the chronic phase and the BC, are the subject of the present study. In 5 patients DNA samples were also available from the accelerated phase. Twenty-one patients had myeloid BC and 21 lymphoid BC. The diagnosis of the accelerated phase and the BC was established according to conventional criteria [13,14]. Blast cell phenotype was determined by immunological studies with terminal deoxynucleotidyl transferase and antibodies specific for the myeloid, lymphoid, megakaryocytic, and erythroid cell lineages.

Treatment of the chronic phase of CML changed over the years, reflecting the progresses achieved in the therapy of this disease, and consisted of busulfan (n = 8), hydroxyurea (n = 16), interferon- α (n = 13), or allogeneic stem cell transplantation (n = 5). Treatment of BC consisted of either oral 6-mercaptopurine (n = 20) [15] or acute myeloid leukemia-like regimens (n = 1) in patients with myeloid BC, and vincristine, prednisone, and adriamycin in those with lymphoid BC (n = 21) [16].

Study samples and DNA extraction

The mean percentage of blast cells in the BC samples as determined by morphologic assessment was 50% (range, 15–100%), and the blast cell population was further enriched with a Ficoll-Hypaque density gradient separation. DNA samples obtained from

peripheral mononuclear cells of 10 healthy donors and three groups of 10 patients each with essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis were also analyzed as controls.

Bone marrow or peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation over a Ficoll-Hypaque gradient and high-molecular-weight DNA was extracted by standard methodology as previously described [17]. Occasionally, DNA was obtained from slides of bone marrow smears as reported elsewhere [18]. Briefly, slides were washed once with xylene and then with decreasing ethanol concentrations. Afterwards, cells were stripped off the slides and incubated at 37°C overnight with TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 8, 1 mmol/L EDTA), 0.5% Tween-20, and proteinase K (100 μ g/mL). Subsequently, the DNA was extracted by the phenol-chloroform method and precipitated in ethanol. Finally, the DNA pellets were dissolved in 30 μ L of TE.

Real-time PCR analysis in multiplex format

Fifty nanograms of genomic DNA template were used in each reaction. The sequences of primers and probes for human p16 and β -actin were obtained from Carter et al. [19] and are as follows: p16 exon 2 forward (F): (5'-GGCTCTACACAAGCTTCCTTTCC-3'); p16 exon 2 reverse (R): (5'-TCATGACCTGCCAGAGAGAACA-3'); β -actin F: (5'-AGCGCGGTACAGCTTCA-3'); and β -actin R: (5'-CGTAGCACAGTTCTCCTTAATGTC-3'). Taqman probe for p16 (5'-CCCCACCCTGGCTCTGACCA-3') was labeled with FAM, whereas the probe for β -actin (5'-ATTTCCCGCTCGCCGTGGT-3') was labeled with VIC, and both probes were synthesized by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The reaction was performed in a final volume of 25 μ L using 200 nM of each probe and 50 ng/ μ L of each primer. All the reactions were performed in the ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) using universal PCR conditions. For each test sample, PCR was run in duplicate. The target gene copy number in samples is quantified by measuring the Ct value. Thus, in tumors with a homozygous deletion of p16 the Ct value will depend on the proportion of contaminating normal cells present. Since the precise amount and the quality of genomic DNA used in each reaction are unknown, β -actin was used as a reference gene for all samples to normalize the Ct values for p16 gene. The quantitation was done by employing a comparative Ct method, using the arithmetic formulas provided by the manufacturer and using DNA from healthy donors as an endogenous reference.

Standard semiquantitative multiplex PCR analysis

Deletions of exon 2 of the INK4a/ARF locus were analyzed by multiplex PCR using the amplification of β -actin gene as an internal control. The primers used for β -actin were 5'-TCCTTAATGTCACG-CACGATTTC-3' and 5'-GTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', and the primers for exon 2 of the INK4a/ARF were 5'-CTCTACA-CAAGCTTCCTTTC-3' and 5'-CGGGCTGAACITTTCTGTGCTGG-3'. A "touchdown" PCR strategy for the amplification was used as previously described [20]. Conditions were: DNA denaturation at 95°C for 5 minutes; four cycles at 94°C for 45 seconds, at 68°C for 1 minute, and at 72°C for 1 minute; four cycles at an annealing temperature of 67°C, and 30 cycles at an annealing temperature of 66°C. PCR products were resolved on a 2% agarose gel. Homozygous deletions were considered when the normalized intensity in any sample was lower than 20% of the intensity of a normal control case [21]. In order to confirm the results, each sample with a suspicion of having a deletion was independently tested at least three times.

Cytogenetic and Southern blot analyses

To confirm the possible p16 gene deletions detected by real-time PCR and conventional semiquantitative PCR, those cases suspected to be homozygously p16 deleted and their paired samples from the different CML phases were assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH) or Southern blot analyses.

FISH studies were carried out on interphase cells using a commercial directly labeled 9 centromere probe (CEP9; Vysis, Downers Grove, IL, USA). The technique was performed as described in the proceedings supplied by the manufacturer, with a total of 50 to 300 evaluable interphase nuclei being analyzed per sample.

Southern blot analysis was performed from genomic DNA digested with EcoRI and HindIII and analyzed as previously described [22]. The p16^{INK4a} probe used was a 0.8-kb EcoRI-Xho I fragment of the p16^{INK4a} cDNA clone. The β -actin probe was also used as a loading control. The probes were radiolabeled using a random primer DNA labeling kit (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) with [α -³²P]dCTP.

Methylation analysis

DNA methylation patterns in the 5'-CpG island of the p16^{INK4a} gene were determined by methylation-specific PCR (MSP) as previously described [23]. Ten μ L of each PCR reaction were directly loaded onto nondenaturing 6% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide, and visualized under UV illumination. To confirm the results, each sample was independently tested twice.

Statistical analysis

The following clinico-hematological features of patients with and without p16 deletions were compared by means of the Mann-Whitney *U*- and Chi-square tests: gender, Sokal's risk group, length of chronic phase, treatment for the chronic phase, age at BC diagnosis, presence or not of an accelerated phase prior to BC, blast-cell phenotype of the BC, presence of karyotypic abnormalities in addition to the Ph chromosome, response to BC treatment, and survival from BC diagnosis. The survival curves from BC diagnosis of patients with lymphoid BC showing or not p16 deletions were plotted by the Kaplan and Meier method [24] and compared by the log-rank test [25].

Results

P16 gene analysis in healthy donors and nonleukemic myeloproliferative syndromes

A dilution test was performed to determine the sensitivity of the real-time PCR assay using serially diluted DNA from K562 cells (homozygously p16 deleted). Mixtures ranging from 2 to 100% of normal cells (germline for p16) relative to concentrations of K562 cells (homozygously p16 deleted) were made. When the Ct value was plotted against the copy number, a linear correlation was obtained with a correlation coefficient of 0.971 (Fig. 1). The dynamic range obtained was sufficient for clinical application of the assay. The amount of target, normalized to an endogenous reference and relative to a calibrator, is given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $-\Delta\Delta C_t$ is the difference in threshold cycles for target and reference from the samples and the calibrator. On the basis of the above formula, the absolute median value and range

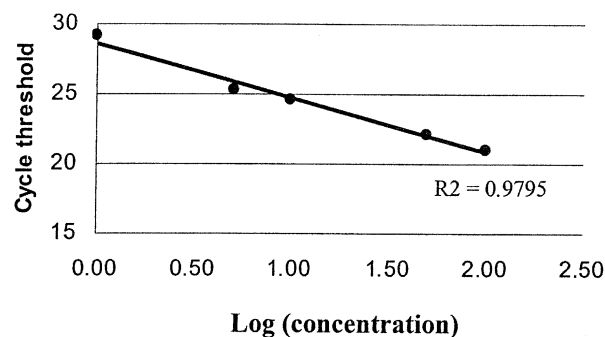


Fig. 1. Accuracy of quantitative real-time PCR. A mixture of DNA from normal donors and from K562 cells (homozygously p16 deleted) at various ratios was used for quantitative real-time PCR.

for p16 quantitation of 10 healthy donors were 100 and 67–303, respectively (Fig. 2). Since our samples were inevitably contaminated with a normal cell component, it was difficult to determine accurately the threshold value indicating a homozygous gene deletion. Values below 40 were interpreted as corresponding to p16 homozygously deleted cases, whereas it was decided not to consider hemizygos p16 deletions in

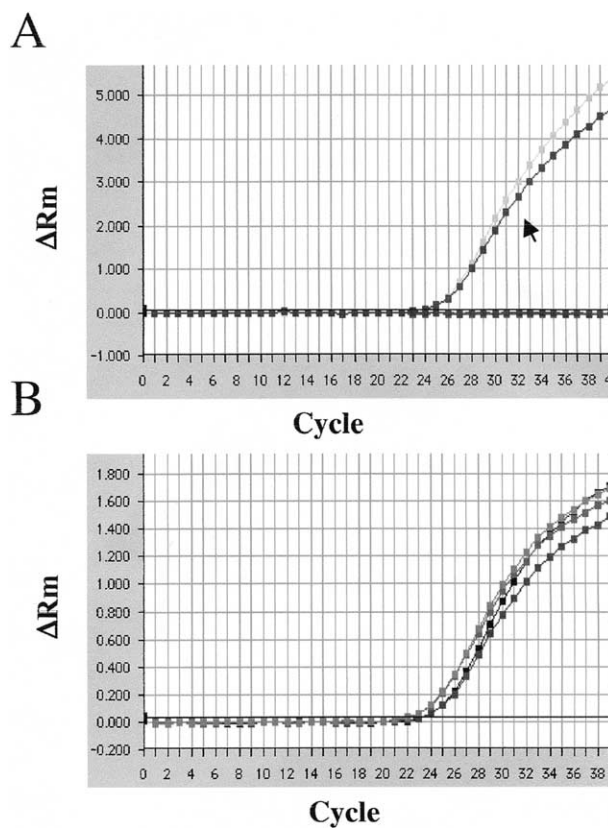


Fig. 2. P16 analysis by quantitative real-time PCR: (A) p16 exon 2 amplification plots (done in duplicate) for the samples of a healthy donor (arrow) and the K562 cell line (homozygously p16 deleted); (B) Co-amplification of a control gene (β -actin).

Table 1. Results of p16 gene analysis by real-time PCR in healthy donors and nonleukemic myeloproliferative syndromes

Diagnosis	No. of cases	Median ^a	Range
Healthy donors	10	100	67–303
Polycythemia vera	10	100	58–228
Idiopathic myelofibrosis	10	123	70–241
Essential thrombocythemia	10	157	91–318

^aNormalized Ct value

the present study because of the low blast-cell purity of some BC samples. No abnormalities of p16 were detected in any of the samples from patients with nonleukemic myeloproliferative syndromes (Table 1).

P16 gene analysis in

sequential paired samples of CML patients

Table 2 summarizes the p16 status, as determined by real-time PCR and conventional semiquantitative PCR assays, at chronic-phase CML and at BC. The overall concordance rate between the two techniques was 97.8% (87/89). As shown, no deletions of p16 gene were detected in the chronic phase or in the myeloid BC as determined by both methods. In contrast, homozygosity for p16 deletion was observed in 6 out of 21 patients (29%) with lymphoid BC. In two of the homozygously p16-deleted cases, as detected by real-time PCR analysis, the estimated p16/ β -actin ratio by semiquantitative multiplex PCR were slightly higher than the limit established for a homozygous deletion (one of these samples had less than 50% blast cells). However, deletions of the p16 gene were confirmed in the four cases studied by either FISH analysis ($n = 2$) or Southern blotting ($n = 2$), including one of the discordant cases. Unfortunately, confirmatory studies could not be performed in the remaining two cases due to the lack of material.

With regard to the accelerated phase of CML, a significant increase in the p16 DNA number of copies was detected in 3 out of the 5 samples analyzed, with a subsequent reduction being observed in their respective samples from BC. No abnormalities of the p16 gene were found in two of such cases studied by FISH analysis.

To determine whether different mechanisms of p16 gene inactivation could be involved in lymphoid BC cases, the methylation status of the CpG island in the 5' region of the gene was studied by MSP, with hypermethylation of the p16 gene not found in any of the 21 cases.

P16 deletions, clinical correlations, and outcome of the BC

Patients with germline p16 ($n = 36$) were compared for their main clinico-hematological characteristics with those with homozygously deleted p16 ($n = 6$) (Table 3). As can be observed, p16 deletions were detected in lymphoid BC exclusively, with no other specific clinical profile being associated with such molecular abnormality. The lack of accelerated phase in the patients with deletion of p16 should be related to the lymphoid phenotype of the BC in such cases, as has been previously reported [16]. Because of the well-known better outcome of patients with lymphoid BC as compared with those with myeloid BC, the prognostic impact of p16 deletions was evaluated separately in the subgroup of patients with lymphoid BC patients. In this latter subgroup, 3 out of 6 patients with p16 deletion achieved a complete response to chemotherapy, vs 8 of the 15 with germline p16 ($p = \text{NS}$). No significant difference was observed between the survival of p16-deleted and p16 germline patients ($p = 0.8$, Fig. 3).

Discussion

The molecular events underlying the progression of CML from the chronic phase to the BC remain largely unknown. Thus, although a broad spectrum of molecular abnormalities have been reported to occur in the BC, they have been detected in only a minority of patients [5]. Disruption of the p53 gene, which occurs in 20 to 30% of BC cases, is the abnormality most frequently found, being observed in myeloid BC only [26]. Other abnormalities, such as the amplification of the c-myc [27] or EVI-1 genes [28], RAS mutations [29], inactivation of the RB1 tumor suppressor gene [30], or methylation of the calcitonin gene [31], are less frequent.

Recently, abnormalities of the INK4A/ARF locus have been implicated in the pathogenesis of the progression of

Table 2. p16 deletions and chromosome 9 abnormalities in 42 Ph⁺ CML patients studied sequentially in the different phases of the disease

CML phase	No. of patients	Real-time PCR no. of deletions	Semiquantitative PCR no. of deletions	Chr. 9 abnormalities ^a
Chronic phase	42	0	0	0
Accelerated phase	5	0	0	0
Blast crisis				
Myeloid	21	0	0	1
Lymphoid	21	6	4	1 ^b

^aOther than the 9q⁺ derivative from the Philadelphia translocation^bHomologue p16 allele in germline

Table 3. Patient's main clinical features at BC presentation according to the status of the p16 gene

Characteristic	p16 deleted (n = 6)	Germline p16 (n = 36)	p value
Age (years) ^a	54 (39–78)	52 (16–76)	NS
Gender (M/F)	3/3	21/15	NS
Sokal's risk group ^b			NS
Low risk	3	12	
Intermediate risk	1	11	
High risk	2	12	
Length chronic phase (months) ^a	66.5 (6.1–152.3)	51.2 (5.9–111.9)	NS
Accelerated phase	0	10	NS
BC phenotype			0.02
Myeloid	0	21	
Lymphoid	6	15	
Additional karyotypic abnormalities ^c	3/5	14/28	NS
Survival from BC diagnosis (months) ^a	6.4 (1.2–10.6)	5.6 (0.1–23.2)	NS

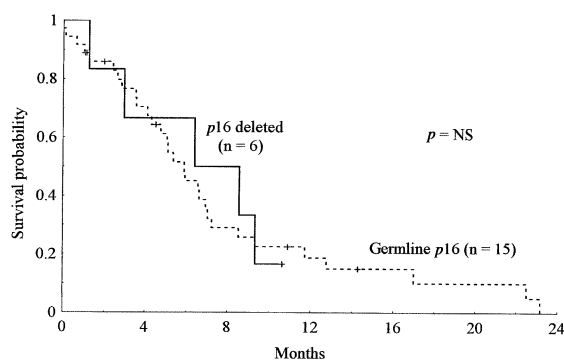
^aMedian (range)^bNot available in one case^cNo. with abnormally/total no. of assessable patients

several hematological malignancies [6,7,32], among them CML [9–12]. Such locus encodes for two different tumor suppressor genes, both derived from a common exon 2, which is joined to sequences of alternative first exons (exon 1 α and exon 1 β for p16^{INK4A} and p14^{ARF}, respectively) [33]. P16^{INK4A} expression blocks the cell cycle at late G1 by inhibiting Rb phosphorylation by the cyclin Ds-cdk4/6 complexes, while p14^{ARF} overexpression induces a cell-cycle arrest in both G1 and G2 by its interaction with MDM2, stabilizing the p53 protein in the nucleus of the cell by blocking its cytoplasmic transport and MDM2-mediated degradation [34]. Therefore, genetic alterations of the INK4A/ARF locus can impair both p16^{INK4A}/Rb and p14^{ARF}/p53 pathways, resulting in dysregulated cell proliferation potentially leading to tumor development or progression.

In the current study, nearly a third of patients with lymphoid BC had homozygous p16 exon 2 deletions, which had been acquired at some time during the progression of CML, since they were not observed in their matched samples from

the chronic phase of the disease. By contrast, no deletions of such gene were detected in non-CML myeloproliferative disorders or in the chronic phase of CML or the myeloid BC. Besides, inactivation of p16 gene by hypermethylation of its promoter region was not detected in any of the lymphoid BC cases. These results therefore confirm previously published data suggesting a critical role of INK4A/ARF deletions in the pathogenesis of lymphoid BC of CML [9–12]. It should be noted, however, that the present study represents the largest CML series in which the status of p16 gene has been analyzed in paired samples from both the chronic phase and the BC, as well as the first study in which real-time quantitative PCR analysis has been used to assess p16 gene zygosity in this disease. Previously, Sill et al. [9] detected homozygous p16 deletions in 5 of 10 lymphoid BC samples studied by Southern blotting and semiquantitative multiplex PCR analysis, whereas they observed a germline p16 status in all myeloid BC studied. Similarly, Serra et al. [10], using a semiquantitative PCR assay, observed homozygous p16 deletions in 3 of 8 lymphoid BC, but no p16 abnormalities in 9 myeloid BC and 22 chronic-phase CML samples. In the latter study, however, matched samples from the chronic and the blastic phases were available in only 6 patients. By contrast, no inactivation of p16 was observed (either by hypermethylation or by deletion assessed by Southern blotting analysis) by Herman et al. [11] in CML patients at any disease stage (11 in chronic phase, 2 in accelerated phase, and 8 in BC, mostly of myeloid phenotype). Finally, Iolascon et al. [12], using a semiquantitative PCR assay, detected homozygous p16 deletions in 1 of 5 lymphoid BC, vs no p16 gene alteration in 10 chronic-phase and 5 myeloid BC specimens.

Of note, in the present study an increased number of copies of p16 DNA from patients in the accelerated phase of CML was observed as compared with their paired samples

**Fig. 3.** Actuarial survival curves of lymphoid BC according to the status of p16.

from the chronic phase and the BC. One attractive explanation for such findings could be that the molecular mechanisms controlling the cell proliferation might be activated at that stage of the disease, whereas they are completely overcome once the BC develops.

In the present study, a high concordance rate was found between the results obtained by quantitative real-time PCR and conventional semiquantitative multiplex PCR assays. There were only two discrepant cases in which homozygous deletions of p16 gene, as detected by real-time PCR, were not considered so by conventional PCR. In one such case, FISH analysis was compatible with the presence of p16 gene deletion. The high amount of contaminating normal cells in the remaining one could have accounted for the discrepancy between both assays but, unfortunately, additional techniques could not be performed due to unavailability of adequate material. Nevertheless, these results indicate that both methods have similar sensitivity and specificity, with real-time PCR analysis being more convenient for its simplicity and cost effectiveness [35].

Besides their occurrence in lymphoid BC exclusively, no other clinico-hematological characteristics were associated with the presence of p16 deletions. In this regard, no abnormalities on chromosome arm 9p were seen in the five homozygously p16 deleted cases in which the G-banded cytogenetic studies were informative. Conversely, the single patient showing loss of one chromosome 9 in lymphoid BC was found to keep the homologue p16 allele germline. On the other hand, the presence of p16 deletions did not influence the response to treatment or the survival of lymphoid BC patients. This is in contrast with previous observations in acute leukemia, both myeloid [36] and lymphoid [37], in which a negative effect of such molecular abnormality on the patients' outcome has been reported. However, the relatively small number of lymphoid BC analyzed in the present study could pose a limitation to the statistical power for detecting differences in the patients' outcome, therefore precluding definitive conclusions.

In conclusion, p16 gene deletions are detected in a substantial proportion of cases of lymphoid BC of CML. Such molecular abnormality is not associated with any particular clinico-hematological feature other than the lymphoid blast-cell phenotype and does not seem to influence the patients' outcome.

Acknowledgments

We thank Dr. J. Nomdedeu, from the Hematology Department, Hospital Sant Pau, Barcelona, for kindly providing samples from five patients. This work was supported in part by grants "Premi Fi de Residència" from the Hospital Clínic and FIS-99/0103 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, and José Carreras International Foundation (EM/02&CR/02).

References

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;340:1330–1340.
2. Cervantes F, Rozman M, Rosell J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1990;76:27–32.
3. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr/abl} gene of Philadelphia chromosome. *Science.* 1990;247:824–830.
4. Anastasi J, Feng J, LeBeau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW. The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 1995;9:628–633.
5. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341:164–172.
6. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia.* 1998;12:845–859.
7. Taniguchi T, Chikatsu N, Takahashi S, et al. Expression of p16^{INK4A} and p14^{ARF} in hematological malignancies. *Leukemia.* 1999;13:1760–1769.
8. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995;83:993–1000.
9. Sill H, Goldman JM, Cross CP. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1995;85:2013–2016.
10. Serra A, Gottardi E, Della Ragione F, Saglio G, Iolascon A. Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1995;91:625–629.
11. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res.* 1997;57:837–841.
12. Iolascon A, Della Ragione F, Giordani L, Serra A, Saglio G, Faienza MF. Expression of cell cycle regulatory genes in chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 1998;83:771–777.
13. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1988;61:1441–1446.
14. Cervantes F, López-Guillermo A, Bosch F, Terol MJ, Rozman C, Montserrat E. An assessment of the clinicohaematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 1996;57:286–291.
15. Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Alvarez A, Costa D, Montserrat E. Single-agent therapy with oral mercaptopurine for nonlymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2001;80:516–520.
16. Cervantes F, Villamor N, Esteve J, et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. *Br J Haematol.* 1998;100:123–128.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* In: Nolan C, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. New York, 1989.
18. Mori N, Morosetti R, Lee S, et al. Allelotype analysis in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *Blood.* 1997;90:2010–2014.
19. Carter TL, Watt PM, Kumar R, et al. Hemizygous p16^{INK4A} deletion in pediatric acute lymphoblastic leukemia predicts independent risk of relapse. *Blood.* 2001;97:572–574.
20. Pinyol M, Hernández L, Martínez A, et al. *INK4a/ARF* locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type *p53* gene. *Am J Pathol.* 2000;156:1987–1996.
21. Gronbaek K, de Nully Brown P, Moller MB, et al. Concurrent disruption of p16^{INK4a} and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia.* 2000;14:1727–1735.
22. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al. Deletions and loss of expression of p16^{ink4a} and p21^{waf1} genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* 1997;89:272–280.

23. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9821–9826.
24. Kaplan G, Meier P. Nonparametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1985;53:457–463.
25. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation $E(O-E)^2/E$ in the logrank test for survival data on tumor incidence data. *Biometrics*. 1973;29:579–584.
26. Neubauer A, He M, Schmidt CA, Huhn D, Liu ET. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain based techniques. *Leukemia*. 1993;4:593–600.
27. McCarthy DM, Rassool FV, Goldman JM, Graham SV, Birnie GD. Genomic alterations involving the c-myc proto-oncogene locus during the evolution of a case of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet*. 1984;2:1362–1365.
28. Ogawa S, Kurokawa M, Tanaka T, et al. Increased evi-1 expression is frequently observed in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia*. 1996;10:788–794.
29. LeMaistre A, Lee MS, Talpaz M, et al. Ras oncogene mutations are rare late stage events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1989; 73:889–891.
30. Gaidano G, Serra A, Guerrasio A, Rege-Cambrin G, Mazza U, Saglio G. Genetic analysis of p53 and RB1 tumor-suppressor genes in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 1994;68:3–7.
31. Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson SE. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation. *Blood*. 1991;77:2435–2440.
32. Haidar MA, Cao X, Manshoury T, et al. P16^{INK4A} and p15^{INK4B} gene deletions in primary leukemias. *Blood*. 1995;86:311–315.
33. Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:22–30.
34. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The INK4a tumor-suppressor gene product, p19ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92:713–723.
35. Lee WI, Kantarjian H, Glassman A, Talpaz M, Lee MS. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. *Ann Oncol* 2002;13:781–788.
36. Faderl S, Kantarjian HM, Estey E, et al. The prognostic significance of p16^{INK4a}/p14^{ARF} locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2000;89:1976–1982.
37. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Slater RM, et al. In vitro drug resistance and prognostic impact of p16^{INK4A}/P15^{INK4B} deletions in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001; 112:680–690.

3.2. TRABAJO II:

EXPRESIÓN DE SURVIVINA EN

LA PROGRESIÓN DE LA LMC:

ESTUDIO SECUENCIAL DE 16 PACIENTES

3.2.1. RESUMEN

El gen de la survivina, ubicado en 17q25, es un miembro de la familia de genes inhibidores de la apoptosis que actúa como inhibidor de la apoptosis y regulador de la división celular. En condiciones normales, la survivina es prácticamente indetectable en las células de los individuos adultos, si bien algunas ellas, como las que conforman el timo, las células endoteliales activadas o los progenitores hematopoyéticos CD34+, expresan survivina en pequeña cantidad durante la fase de mitosis únicamente. Por el contrario, la survivina está sobreexpresada en la mayoría de las neoplasias, en las cuales una expresión elevada se asocia en general con una mayor proliferación tumoral y un peor pronóstico. El hecho de que la survivina se exprese de forma casi exclusiva en células neoplásicas, junto con su contribución al mantenimiento de la viabilidad celular, hacen que esta molécula sea una diana potencial para el tratamiento del cáncer.

El objetivo principal de este segundo trabajo fue analizar mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real el patrón de expresión del gen de survivina en una serie de 16 pacientes con LMC Ph-positiva estudiados de forma secuencial en las distintas fases evolutivas de la enfermedad. Asimismo, se investigaron las posibles correlaciones entre la expresión de survivina, el índice de proliferación celular y el perfil clínico de la LMC.

Los resultados evidenciaron una sobreexpresión significativa de survivina tanto en la fase crónica como en la CB de la LMC, en comparación con los niveles detectados en granulocitos de donantes sanos. Con todo, los niveles de expresión de survivina fueron considerablemente mayores en la CB

que en la fase crónica, con una mediana siete veces superior, siendo el incremento de expresión más pronunciado en las CB de estirpe mieloide (17 veces mayor) que en las linfoides (tres veces mayor). Por otro lado, se observó un incremento significativo de la proliferación celular en la CB, con una mediana de expresión de Ki-67 casi tres veces superior a la de la fase crónica, sin registrarse diferencias significativas en función del fenotipo de la CB. A pesar de que tanto survivina como Ki-67 experimentaron un incremento de expresión en la CB, no se observó una correlación significativa entre ambos parámetros. Tampoco se observó una asociación significativa entre los niveles de survivina y el perfil clínico-hematológico de la CB.

Estos resultados sugieren un posible papel de la sobreexpresión de survivina en la patogénesis de la progresión de la LMC. Sin embargo, dadas las limitaciones derivadas del pequeño tamaño de la serie analizada, será necesario extender el estudio de este gen a un grupo más amplio de pacientes de cara a determinar su significado pronóstico en la LMC. De confirmarse estos datos, la survivina podría pasar a constituir una nueva diana terapéutica para la LMC.

Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: A sequential study in 16 patients

JUAN-CARLOS HERNÁNDEZ-BOLUDA^{1*}, BEATRIZ BELLOSILLO^{2**},
MARI-CARMEN VELA^{2**}, DOLORS COLOMER², ALBERTO ALVAREZ-LARRÁN¹ &
FRANCISCO CERVANTES¹

¹Hematology Department, Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Hematopathology Unit, Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

An increase in the proliferation and resistance to apoptosis of leukemic cells has been found in chronic myeloid leukemia (CML) as the disease evolves from the chronic phase to blast crisis (BC). To contribute to a better knowledge of the molecular mechanisms involved in such biological abnormality, the expression of the survivin gene was studied by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) in the chronic phase of CML and at BC in 16 patients in whom sequential RNA samples from the 2 phases of the disease were available. Survivin was significantly overexpressed in both the chronic phase and BC as compared with granulocytes from controls. In BC, survivin expression was 7-fold higher than in the chronic phase, with such an increase being more pronounced in the myeloid (17-fold) than in the lymphoid cases (3-fold) ($P=0.03$). Cell proliferation was significantly increased at BC, with Ki-67 expression being 2.8-fold higher than in the chronic phase. Despite the overexpression of both survivin and Ki-67 at BC, no significant correlation between their expression levels was observed. These data support a possible role for survivin overexpression in the pathogenesis of the progression of CML. However, further studies are required to elucidate the possible prognostic importance of such biological findings in this disease.

Keywords: *Survivin, apoptosis, cell proliferation, chronic myeloid leukemia, blast crisis*

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative disorder characterized by the clonal expansion of a pluripotent stem cell containing the Philadelphia (Ph) chromosome, whose molecular consequence is the formation of the BCR-ABL fusion gene [1]. The chimeric BCR-ABL protein derived from this gene has a deregulated tyrosine kinase activity that plays a central role in the initiation and maintenance of the disease. CML is generally diagnosed in the chronic phase and eventually evolves into an acute leukemia-like condition, the blast crisis (BC) of CML, characterized by abrogation of the terminal differentiation of the granulocytic progenitors and by its refractoriness to treatment [2]. The molecular events leading to the progression of

CML are poorly understood. In this sense, the recent success of therapeutic agents targeted against the specific genetic alteration of CML [3] has stimulated research on the molecular abnormalities involved in the transformation of the disease.

Survivin, mapped to 17q25, is a member of the inhibitors of apoptosis (IAP) gene family that may exhibit both functions of apoptosis inhibitor and regulator of cell division [4]. Survivin expression is undetectable in most normal adult tissues, whereas it is frequently overexpressed in human cancers [5]. Recent evidence suggests that survivin may play an important role in carcinogenesis and tumor progression [6]. Besides, survivin overexpression has been identified as an adverse prognostic factor for survival and response to therapy in several hematological malignancies [7–10]. Both its differential expression

Correspondence: Francisco Cervantes, Hematology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: fcervan@clinic.ub.es

*Present address: Hematology and Medical Oncology Service, University of Valencia, Valencia, Spain.

**Present address: Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology, Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

in tumor cells and its potential implication in maintaining cancer cell viability point to survivin as an attractive therapeutic target [6]. However, little information is available on the status of this gene expression in CML.

The primary aim of the present study was to analyse survivin expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) in 16 CML patients studied sequentially in the chronic phase and BC. The potential relationship of survivin expression with cell proliferation and clinicohematological profile of CML was also examined.

Materials and methods

Patient population, study samples and controls

Sixteen patients diagnosed with BC of Ph-positive CML from July 1996 to March 2003, in whom paired RNA samples were available from the chronic phase and BC, were included in the present study. Their main clinicohematological characteristics are shown in Table I. Eight patients had myeloid BC and 8 lymphoid BC. The diagnosis of BC was established according to conventional criteria [2]. Blast cell phenotype was determined by immunological studies with terminal deoxynucleotidyl transferase and antibodies specific for the myeloid, lymphoid, megakaryocytic, and erythroid cell lineages. Conventional G-banding analysis was performed on a minimum of 20 metaphases using short (24 h) cultures without the addition of mitogens.

RNA samples were generally obtained from peripheral blood mononuclear cells isolated by Fycoll-Hypaque density gradient centrifugation. In 5 BC cases having a low proportion of blast cells in peripheral blood, bone marrow mononuclear cells were used as the source for the RNA. The median percentage of blast cells in the BC samples prior to density gradient separation, as determined by morphological assessment, was 37% (range 10–100%). RNA samples obtained from granulocytes of 10 healthy donors were analysed as controls.

Real-time PCR analysis

Total RNA from bone marrow or peripheral blood mononuclear cells was isolated using the guanidinium thiocyanate method (UltraspecTM; Biotecx Laboratories, Houston, TX, USA). RNA was treated with DNase (Ambion, Austin, TX, USA) in order to eliminate contaminating DNA. cDNA was synthesized with the use of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from 1 µg of total RNA and random

Table I. Main clinical characteristics at blast crisis (BC) of the 16 chronic myeloid leukemia patients included in the study.

Patient no.	Age/gender	Sokal's risk group	Length of CP (months)	Treatment of CP	Accelerated phase	BC phenotype	Blast cell population (%)	Additional cytogenetic abnormalities in BC	Survivin expression (BC/CP)
1	45/F	Low	72	BU/AloSCT	No	Lymphoid	75	No	282.2/39.7
2	54/M	Low	38	IFN	No	Lymphoid	50	-	0.6/0.3
3	78/F	Intermediate	54	HU	No	Lymphoid	66	del 20q	268.1/15.3
4	35/M	Low	7	HU	No	Lymphoid	98	+ Ph, -7	12.4/0.9
5	78/F	Intermediate	6	HU	No	Lymphoid	77	-	24.3/23.3
6	47/M	Low	15	IFN/AloSCT	No	Lymphoid	100	No	2/2.3
7	36/F	Intermediate	6	HU/AloSCT	No	Lymphoid	48	+ Ph, del 13q	24.4/5.7
8	57/F	Intermediate	50	IFN/HU	No	Lymphoid	50	No	9.5/4.7
9	56/M	High	11	HU	Yes	Myeloid	19	-	30.2/11.2
10	32/M	Low	3	HU	No	Myeloid	23	-	35.8/5.3
11	18/M	High	23	IFN/HU	Yes	Myeloid	15	No	172.9/4.5
12	64/M	High	86	HU	Yes	Myeloid	13	No	17/1.2
13	78/F	High	47	HU	No	Myeloid	12	add 2q37	62.2/0.8
14	59/F	Low	52	IFN	Yes	Myeloid	24	il17q	22.3/0.9
15	71/M	Intermediate	84	BU	No	Myeloid	25	No	2.2/0.1
16	52/F	Intermediate	112	HU/IFN	No	Myeloid	10	No	52.2/9.4

CP, chronic phase; BU, busulfan; AloSCT, allogeneic stem cell transplantation; HU, hydroxyurea; IFN, interferon.

hexamers. The primers and probe used to amplify and quantify survivin cDNA by real time were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and were as follows: survivin F: 5'-ATT TGA ATC GCG GGA CCC-3', survivin R 5'-GAG AAA GGG CTG CCA GGC-3' and survivin probe: FAM-5'-CAT GGG TGC CCC GAC GTT GC-3'-TAMRA. The primers and the probe were located in a region with no homology to the EPR-1 gene. Real-time monitoring of PCR amplification of cDNAs was carried out using Taqman Universal master mix (Applied Biosystems) using 200 nM of probe and 100 nM of each survivin primer. Ki-67 was amplified by real-time PCR using an assay on demand (Applied Biosystems). Relative quantification of target gene expression was performed by employing a comparative Ct method using arithmetic formulas as described in the Taqman user manual. Because the precise amount and quality of the RNA used in each reaction were unknown, β -glucuronidase (GUSB) (Applied Biosystems) was used as a reference gene for all samples to normalize the Ct values for the target gene. RNA from granulocytes of healthy donors was used as a relative calibrator and their survivin and Ki-67 expression levels were assigned the value of 1 as an arbitrary unit. All experiments were carried out in the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The associations between the patients' clinicohematological characteristics, survivin gene expression levels and the cell proliferation index were studied by means of the Mann-Whitney U- and chi-square tests. Correlations between survivin and Ki-67 expression and the proportion of blast cells in the samples were analysed using the Spearman test. All statistical tests were 2-sided and the significance level was established at 0.05.

Results

Survivin mRNA expression was significantly higher in both the chronic phase and BC samples as compared with that of control granulocytes ($P=0.05$ and $P=0.0002$, respectively). Median survivin expression with respect to controls was 4.6 (range 0.1–39.7) in chronic phase samples and 24.3 (range 0.5–282.2) in BC samples ($P=0.002$). Although survivin was frequently overexpressed in the early stages of CML, a strong up-regulation of the gene expression was found as the disease progressed to BC. There were no significant differences in the expression of survivin in BC samples

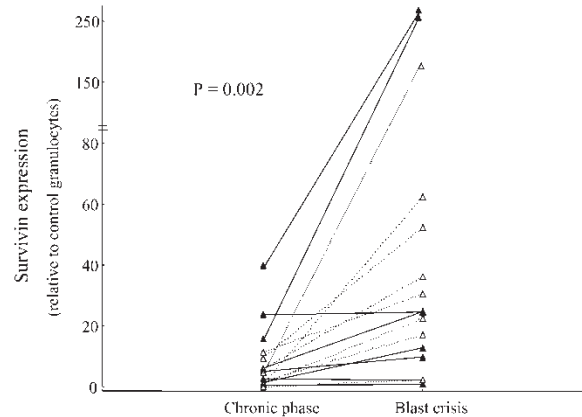


Figure 1. Survivin mRNA expression by real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis in paired samples from the chronic phase and blast crisis (BC) in 16 chronic myeloid leukemia (CML) patients. The continuous and dotted lines represent the evolution of lymphoid and myeloid transformations, respectively. RNA samples from granulocytes of healthy donors were used as a relative calibrator and their survivin expression levels were assigned the value of 1 as an arbitrary unit.

depending on whether RNA was obtained from peripheral blood or bone marrow. To further assess the increase in survivin expression that occurred during transformation of the disease, each BC sample was also compared with its paired sample from the chronic phase. As shown in Figure 1, in BC the median survivin mRNA expression was 7-fold higher (range 1–82) than in the chronic phase, with such an increase being more pronounced in the myeloid (17-fold) than in the lymphoid cases (3-fold) ($P=0.03$).

As expected, when the proliferative activity of the leukemic cells was determined at the different CML phases by measuring the expression of the cell cycle marker Ki-67, cell proliferation was significantly increased at BC, with the median Ki-67 mRNA expression being 2.8-fold higher (range 0.6–17.7) than that of the chronic phase. Such an increase in Ki-67 expression was observed irrespective of the BC phenotype, with the median increase being 2.8-fold (range 1–4.5) and 2.45-fold (range 0.6–17.7) in lymphoid and myeloid BC, respectively ($P=0.7$). Despite the frequent overexpression of both survivin and Ki-67 at BC, no significant correlation between their expression levels was observed.

Although the number of patients was too small to draw statistically significant correlations, patients with high survivin mRNA expression (above the median value) at the chronic phase did not seem to differ from the remaining patients with regard to age, gender or Sokal's risk score. The former subgroup had a shorter lapse between CML diagnosis and BC development (30 vs. 42 months), but such a

Table II. Patients' main clinical features at blast crisis (BC) presentation according to the survivin expression status*.

Characteristic	High expression (n = 8)	Low expression (n = 8)	P value
Age (years)**	54 (39–78)	52 (16–76)	NS
Gender (M/F)	3/5	5/3	NS
Sokal's risk group			NS
Low risk	2	4	
Intermediate risk	3	3	
High risk	3	1	
Length chronic phase (months)**	35 (3–112)	44 (6–86)	NS
Accelerated phase	2	2	NS
BC phenotype			
Myeloid	5	3	
Lymphoid	3	5	
Blast cell population (%)	21 (10–75)	50 (13–100)	NS
Additional karyotypic abnormalities***	3/6	2/6	NS
High survivin expression at chronic phase	6	2	NS

*The median value of the survivin/GUSB ratios at BC was used to create 2 subgroups (high and low expression groups).

**Median (range).

***Number with abnormality/total number of assessable patients.

difference did not reach statistical significance. Table II shows the main characteristics of BC patients depending on their survivin expression. As can be seen, 6 of the 8 patients with high survivin expression at BC also exhibited up-regulation of this gene expression in their chronic phase samples. However, no specific clinicohematological or cytogenetic profile was associated with this molecular abnormality. Of note, a lack of significant correlation was observed between survivin expression levels and the blast cell population in the study samples. This was the case when both parameters were considered as continuous variables (Spearman $R = -0.33$; $P = 0.2$) and when survivin levels were categorized into high or low expression groups (Mann–Whitney U-test $P = 0.1$) (Table II). Finally, in the single patient who acquired an isochromosome 17q at BC, survivin gene overexpression was coincidentally observed. However, her survivin expression was below the median value of BC samples taken as a whole.

Discussion

Diminished programmed cell death plays a critical role in the initiation, progression and drug resistance of human malignancies. As far as CML is concerned, BCR-ABL gene expression is responsible for the activation of several anti-apoptotic pathways that are directly involved in the pathogenesis of the disease [11]. Thus, the BCR-ABL oncoprotein constitutively triggers the PI(3)K/Akt pathway, which ultimately results in an increased expression of the anti-apoptotic BCL-2 protein [12]. In addition, the BCR-ABL-mediated activation of STAT5 also increases the resistance to apoptosis via elevation of the

BCLx levels [13]. As CML progresses to BC, the resistance of the leukemic cells to apoptosis has been shown to increase significantly, with such alteration being attributed to the overexpression of BCR-ABL that frequently occurs in the advanced stages of the disease [14]. However, decreased apoptosis alone does not sufficiently account for the typical clinico-hematological features of BC, characterized by its aggressive acute leukemia-like clinical behavior. In this sense, an increase in the leukemic cell proliferation has also been observed during disease transformation [15]. Despite evidence that several oncogenes and tumor suppressor genes are involved in the progression of CML, the underlying molecular mechanisms responsible for the aforementioned biological abnormalities of BC are incompletely understood.

In the above context, the finding of a consistent up-regulation of the survivin gene expression at BC in the present study is of note. On average, survivin expression levels were 7-fold higher in BC samples as compared with their paired samples from the chronic phase. Interestingly, although the increase in survivin expression was more pronounced in myeloid BC, such an alteration was observed irrespective of the BC phenotype. This finding is in contrast to the relative blast cell lineage specificity observed in other molecular abnormalities of BC [16]. Recently, the expression of survivin has been shown to be higher in adult bone marrow CD34+ cells than in CD34– cells, whereas it was barely detectable in peripheral blood mononuclear cells [17]. In consequence, the increased survivin expression at BC could be attributed to the higher proportion of immature cells observed at this phase of the disease. However, such

a hypothesis is challenged by the lack of correlation between blast cell percentage and survivin expression observed in the present study, as well as by the trend to higher survivin levels in myeloid than in lymphoid BC, despite the higher degree of marrow blast cell infiltration in the latter cases [18]. Nevertheless, the small number of cases in the present study could pose a limitation to definitively excluding individual variability in survivin expression, which may hamper the detection of a possible correlation between the 2 parameters. Taken together, the present results further extend the number of malignancies in which the survivin gene is overexpressed [6] and suggest a possible implication of survivin in the increased viability and proliferation of the leukemic clone observed as CML progresses to BC.

The molecular basis for the overexpression of survivin in the progression of CML warrants further investigation. Survivin is expressed in the G2-M phase in a cell cycle-regulated manner and its interaction with the mitotic spindle apparatus is essential for its anti-apoptotic function [19]. Recent evidence suggests that the differential expression in neoplastic vs. normal tissues is largely controlled at the level of gene transcription [20]. In this regard, several molecular abnormalities have been implicated in the deregulation of survivin gene expression, including amplification of the survivin locus (17q25) in neuroblastoma [21], demethylation of survivin exon 1 in ovarian cancer [22], and loss of wild-type p53 in leukemia cells [23]. The latter mechanism deserves special consideration in CML, as abnormalities of the p53 gene can be detected in 20–30% of BC patients, particularly in those with the myeloid phenotype. In this sense, it is of note that the single patient in the present series who acquired an isochromosome 17 (i.e. loss of at least one p53 copy) at BC diagnosis also showed up-regulation of survivin gene expression, despite belonging to the low expression subgroup of patients.

The overexpression of survivin has been associated with refractoriness to therapy and shorter survival in several cancers, including acute leukemias and B-cell lymphomas [7–10]. However, controversial results have been reported on the prognostic significance of survivin expression in acute myeloid leukemia (AML). Thus, whereas in the study by Adida et al. [8], including 125 AML patients, survivin expression was found to be an independent negative prognostic factor for survival, a more recent study of 116 cases reported by the same authors failed to find any impact of survivin expression on patient outcome [24]. The reason for the detrimental influence of survivin expression on the outcome of cancer treatment has largely been related to the survivin-mediated inhibition of the downstream effector

caspace-3 and -7 in cells receiving apoptotic stimuli, such as chemotherapy [25]. However, recent experiments have shown that the overexpression of survivin may also promote tumor cell proliferation and maintain cancer cell viability, the latter effect by preserving mitotic spindle stability and dynamics against microtubule toxins [26]. In this context, it must be remarked that in the current study, no significant correlation between survivin expression and proliferative activity of the leukemic cells was observed, despite the fact that both survivin and Ki-67 were usually overexpressed at BC. This finding might reflect the existence of additional molecular mechanisms responsible for the increased proliferation seen at BC of CML or, alternatively, be a consequence of the lack of statistical power due to the small size of the series.

In conclusion, the survivin gene is strongly overexpressed in BC of CML. Such a molecular abnormality does not seem to be associated with any particular clinicohematological characteristic of BC and no significant correlation between survivin expression levels and the proliferative activity of the leukemic cells at BC was found. Further studies are required to elucidate the possible prognostic importance of survivin gene overexpression in CML, which, if confirmed, would make survivin a potential target for developing novel treatment strategies for this disease.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants “Premi Fi de Residència” from the Hospital Clínic and FIS-99/0103 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health.

References

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;340:1330–1340.
2. Cervantes F, Rozman M, Rosell J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1990;76:27–32.
3. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarini M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, et al. for the IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994–1004.
4. Reed JC, Bischoff JR. BIRing chromosomes through cell division—and survivin the experience. *Cell* 2000;102:545–548.
5. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917–921.
6. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46–54.

7. Adida C, Haioun C, Gaulard P et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921–1925.
8. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111:196–203.
9. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, Tomonaga M, Sugahara K, Hayashi T, Deteki N, Harasawa H, Nakayama K. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol* 2001;114:63–69.
10. Martínez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, Villamor N, Ott G, Montserrat E, Campo E, Colomer D. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004;164:501–510.
11. Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343–3356.
12. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995;86:726–736.
13. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000;96:2269–2276.
14. Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanti AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene* 1998;16:335–348.
15. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 2002;16:1402–1411.
16. Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Colomer D, Vela MC, Costa D, Paz MF, Esteller M, Monserrat E. Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: a sequential study in 42 patients. *Exp Hematol* 2003;31:204–210.
17. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34⁺ cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001;98:2091–2100.
18. Cervantes F, Villamor N, Esteve J, Montoto S, Rives S, Rozman C, Montserrat E. ‘Lymphoid’ blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. *Br J Haematol* 1998;100:123–128.
19. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580–583.
20. Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA, Hamilton TC. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522–528.
21. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617–623.
22. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 2001;169:155–164.
23. Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods WG, Findley HW. DNA damage induces a novel p53–survivin signalling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:124–131.
24. Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang R, Schober WD, Milella M, Sung H, Reed JC, Andreeff M. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition *in vitro* with pan-caspase inhibitors or *in vivo* by XIAP or survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood* 2003;102:4179–4186.
25. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315–5320.
26. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 2002;62:2462–2467.

4. DISCUSIÓN

Los trabajos que conforman la presente tesis han permitido ampliar el conocimiento acerca de una serie de alteraciones moleculares (deleción de p16, sobreexpresión de survivina) que se asocian frecuentemente con la progresión de la LMC a la fase de CB. Además, el hecho de que la práctica totalidad de los pacientes incluidos en los distintos trabajos hayan sido diagnosticados y tratados de forma homogénea en una única institución ha permitido correlacionar dichas alteraciones con las principales características clínico-hematológicas de la enfermedad. La asociación existente entre las anomalías descritas y el desarrollo de la CB sugiere su posible implicación en la patogénesis de la progresión de la LMC, hipótesis que debe ser confirmada, no obstante, en modelos experimentales.

El primero de los trabajos de la presente tesis abordó el análisis del estado del locus INK4A/ARF en la LMC. En concreto, se estudió la posible inactivación de p16 mediante deleción (del exón 2) o hipermetilación (del promotor) en una serie de 42 pacientes con LMC Ph-positiva estudiados de forma secuencial en las distintas fases de la enfermedad. La importancia de este trabajo radica fundamentalmente en tres aspectos: a) el tamaño de la muestra, dado que se trata de la serie más amplia de pacientes con LMC en que se ha analizado el estado de p16; b) la selección de los pacientes pues, a diferencia de otros estudios, en éste se incluyeron únicamente aquellos enfermos con material genético disponible tanto de la fase crónica como de la CB, lo que permitió realizar un análisis secuencial; y c) la tecnología aplicada, al emplear para el estudio de las deleciones de p16 una técnica de reciente introducción, la PCR a tiempo real.

El hallazgo más importante del trabajo fue la detección de deleciones homocigotas de p16 en alrededor de un tercera parte de los pacientes con CB linfoide, frente a la ausencia total de éstas en la fase crónica o en las CB de fenotipo mieloide. Estos resultados son similares a los referidos en series previas de menor tamaño¹¹⁸⁻¹²¹ y confirman que la inactivación del gen p16 por deleción del exon 2 es la anomalía molecular adquirida más frecuente de la CB linfoide. Por el contrario, no se observó hipermetilación del promotor de p16 en ninguno de los casos analizados en nuestra serie, de forma análoga a lo comunicado por otros autores¹²⁰.

Teniendo en cuenta lo anterior, cabría postular el posible papel de las deleciones homocigotas del locus INK4A/ARF en la patogénesis de la progresión de la LMC a la CB de estirpe linfoide, al igual que se ha sugerido en otras neoplasias hematológicas¹¹⁷. De hecho, las deleciones del exón 2, común a los genes p16 y p14, interfieren con dos vías distintas de control del ciclo celular, p16/Rb y p14/p53, cuya desregulación podría contribuir a la progresión tumoral. Así, p16 bloquea el ciclo celular en la fase tardía de G1 impidiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma por el complejo ciclina D/cdk4/6¹²³. A su vez, la expresión de p14 detiene el ciclo celular en G1 y G2 mediante su interacción con MDM2, lo que permite la estabilización de p53 en el núcleo celular evitando así su transporte y degradación en el citoplasma¹²⁴. En este sentido, la deleción de p14/ARF en la CB linfoide podría tener su equivalente funcional en la mutación de p53 en la CB mieloide, ya que la consecuencia de ambas es la pérdida de actividad de p53. No obstante, ARF parece tener también efectos independientes de p53, que podrían contribuir al

fenotipo de las células proliferantes de la CB linfoide¹⁸⁹. Con todo, la confirmación del papel de la inactivación de estos genes en la patogénesis de las neoplasias linfoides ha venido de la mano de diversos estudios experimentales en el modelo murino. Así, por ejemplo, se ha comprobado que los ratones transgénicos con delección de p16 y p19 (p14 en humanos) (p16INK4A^{-/-}/p19ARF^{-/-}) adquieren una mayor susceptibilidad para desarrollar determinadas neoplasias, principalmente linfomas y leucemias linfoides de baja penetrancia¹⁹⁰.

Otro aspecto abordado en el trabajo fue la comparación de los resultados del análisis de las delecciones de p16 mediante las técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real y PCR convencional semicuantitativa. De forma llamativa, se pudo comprobar la excelente correlación existente entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, detectándose discrepancias en tan sólo dos ocasiones. En concreto, se trató de dos casos en que p16 parecía estar delecionado en el análisis con la PCR a tiempo real e indemne mediante la PCR convencional: únicamente uno de ellos pudo estudiarse con una técnica alternativa, FISH, confirmándose la existencia de una delección homocigota de p16. Posiblemente la causa de las discrepancias observadas fue la elevada proporción de células contaminantes no blásticas en las muestras analizadas. De cualquier forma, los resultados sugieren una sensibilidad y especificidad similar de ambos métodos, lo que favorecería la utilización de la PCR a tiempo real por su mayor sencillez y mejor coste-eficacia.

Para acabar, cabe decir que no se pudo determinar un perfil clínico-hematológico característico de la CB con delección de p16, a excepción de su

fenotipo exclusivamente linfoide. Tampoco se observaron diferencias significativas en la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes con CB linfoide según tuvieran o no deleciones de p16, si bien el número de casos estudiados no permite establecer conclusiones definitivas.

En el segundo trabajo de la tesis nos planteamos analizar la expresión del gen de survivina en las distintas fases evolutivas de la LMC. En esta ocasión, el número de pacientes incluidos en el estudio fue relativamente pequeño (sólo 16), pero el interés del trabajo residía en ser el primero en aportar información acerca del estado de este gen en la LMC.

Los resultados evidenciaron de forma concluyente la sobreexpresión de survivina tanto en la fase crónica como en la CB de la LMC, extendiendo así la lista de neoplasias en que este gen se encuentra desregulado. Junto a ello, se comprobó que la expresión de survivina era mucho mayor en la CB, con unos niveles hasta siete veces superiores a los registrados en la fase crónica. Con respecto a este punto, se estudió la posibilidad de que los niveles elevados de survivina en la CB guardaran relación con la mayor proporción de células inmaduras presentes en esta fase de la enfermedad, pues se sabe que en condiciones fisiológicas la survivina se expresa en pequeña cantidad en los progenitores hematopoyéticos CD34+. Sin embargo, los resultados del trabajo descartaron esta hipótesis, al no observarse correlación entre los niveles de survivina y el porcentaje de blastos de las preparaciones y, además, detectarse una mayor expresión de survivina en las CB mieloides que en las linfoides, a pesar de que en estas últimas el grado de infiltración por células blásticas era

superior. Con todo, una observación de interés fue precisamente el hecho de que la sobreexpresión de survivina se registrara tanto en las CB mieloides como en las de estirpe linfoide, lo que sugiere que esta anomalía molecular no es específica de una determinada línea celular, a diferencia de lo que ocurre con otras alteraciones adquiridas en la CB, como las mutaciones de p53 (más frecuentes en las CB mieloides) o las deleciones de p16 (exclusivas de las CB linfoides).

Por tanto, de lo anterior se deduce la posible implicación de la desregulación del gen de survivina en la patogénesis del mantenimiento y progresión de la LMC. De hecho, este gen se ha identificado recientemente como un miembro más de la familia de inhibidores de la apoptosis¹⁹¹, cuya sobreexpresión parece contribuir a la patogénesis del cáncer humano¹⁹². Así, el gen de survivina codifica la síntesis de una proteína intracelular con capacidad de inhibir la apoptosis, mediante la interacción con la caspasa 9, y de desempeñar además un papel relevante en la fase de mitosis del ciclo celular, preservando el adecuado funcionamiento microtubular. La survivina se expresa habitualmente en los tejidos fetales, pero resulta indetectable en la práctica totalidad de los tejidos de los individuos adultos, excepto en las células tímicas, células endoteliales activadas y progenitores hematopoyéticos CD34+, donde se expresa en pequeña cantidad durante la fase de mitosis. Por el contrario, la survivina está sobreexpresada en la mayoría de las neoplasias en que se ha estudiado, ocupando en un estudio reciente el cuarto puesto entre los transcritos más frecuentemente sobreexpresados en los cánceres humanos¹⁹³. Por ello, se ha postulado un mecanismo patogenético común a múltiples neoplasias humanas

consistente en la recuperación de la capacidad de síntesis de survivina perdida tras el período fetal, lo que posiblemente contribuiría al mantenimiento de la viabilidad y capacidad proliferativa de las células tumorales.

Quedan por dilucidar los mecanismos implicados en la desregulación del gen de survivina en la LMC. En este sentido, estudios recientes han sugerido que la sobreexpresión de survivina en las células neoplásicas se debe principalmente a una desregulación de los mecanismos de transcripción de este gen¹⁹³. Así, entre las alteraciones que se han involucrado en dicho proceso se encuentran la amplificación del gen de survivina en el neuroblastoma, la desmetilación selectiva de su promotor en el cáncer de ovario y la inactivación de p53 en las células leucémicas¹⁹². Este último mecanismo es el que merece más atención en la LMC, dada la elevada frecuencia de alteraciones de p53 en los pacientes con CB. A este respecto, distintos grupos han demostrado la supresión de la transcripción de survivina mediada por la activación de p53 en respuesta al daño en el ADN, lo que podría contribuir, al menos en parte, a los mecanismos de apoptosis celular dependientes de p53^{195,196}. En nuestro estudio, el único paciente con un i17q (por tanto, con inactivación de al menos un alelo de p53) mostró sobreexpresión de survivina, pero con niveles por debajo de la mediana de expresión del conjunto de CB. De cualquier forma, la relación entre los genes p53 y survivina en la LMC debe examinarse con profundidad en próximos estudios.

Por último, la sobreexpresión de survivina no se asoció con un perfil clínico característico de la CB. A su vez, el limitado tamaño de la serie impidió

estudiar su valor pronóstico en esta enfermedad. No obstante, es improbable que pueda llegarse a determinar con precisión el valor pronóstico de la sobreexpresión de survivina en la CB de la LMC, en vista de los resultados controvertidos referidos en series extensas de pacientes con leucemia aguda mieloblástica. Así, mientras en un estudio francés que incluyó 125 pacientes¹⁹⁷ la expresión de survivina constituyó un factor pronóstico desfavorable para la supervivencia, en un estudio más reciente americano con 116 casos no se confirmó este supuesto¹⁹⁸. De cualquier forma, el hecho de que la sobreexpresión de survivina sea un fenómeno selectivo de las células neoplásicas que puede potencialmente contribuir a su viabilidad y capacidad proliferativa resulta suficiente para estimular el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de bloquear de forma específica esta molécula.

A modo de conclusión, trataré de definir un modelo teórico de la patogénesis de la progresión de la LMC basado en la revisión de la bibliografía y en los resultados obtenidos en los trabajos de esta tesis. Según este modelo, la actividad de la oncoproteína BCR-ABL, fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la fase crónica de la LMC, desempeñaría también un papel relevante en la progresión de la enfermedad, al facilitar la acumulación de alteraciones citogenéticas y moleculares adicionales responsables de la disminución de la apoptosis celular, el incremento de la actividad proliferativa y el bloqueo de la diferenciación celular presentes en la CB. De hecho, BCR-ABL parece contribuir a la inestabilidad genómica de las células proliferantes de la LMC, mediante su interferencia con los mecanismos de reparación del ADN y

su efecto promotor de la supervivencia de clonas leucémicas con alteraciones genéticas secundarias. De esta forma, en un momento dado de la evolución de la LMC se produciría una anomalía molecular crítica en alguna de las células proliferantes, cuya expansión clonal daría origen a la CB. Por lo general, dicha anomalía suele afectar a genes que codifican proteínas nucleares relacionadas directa o indirectamente con los mecanismos de regulación de la transcripción génica, lo que parece razonable, si se considera que el desarrollo de mutaciones adicionales en las vías de transmisión de señal citoplasmáticas activadas por BCR-ABL no supondría, en principio, ninguna ventaja sustancial para la clona proliferante. Por otro lado, parece que entre las anomalías adquiridas de la CB predominan aquellas que resultan en una pérdida de función de genes supresores de tumores sobre las que involucran a oncogenes. En este sentido, la inactivación genética o funcional del gen supresor de tumores p53 constituiría la alteración molecular más importante de la CB, tanto por su frecuencia como por sus implicaciones en la biología celular. Así, entre los mecanismos involucrados en la pérdida de función de p53 se encontrarían las mutaciones del gen y las deleciones de 17p como consecuencia de la formación del i17q, presentes en un 20-30% y un 15% de las CB, respectivamente, sobre todo en aquellas de fenotipo mieloide, así como la inactivación funcional de p53 por deleción de p14, anomalía esta última observada en hasta un tercio de las CB linfoides. Por otro lado, la anomalía molecular adquirida más frecuente de la CB linfoide sería la deleción homocigota del exón 2 del locus INK4A/ARF, en la cual se pierden los genes supresores de tumores p16 y p14, lo que podría contribuir a la desregulación

de dos vías distintas de control del ciclo celular, p16/Rb y p14/p53. Por último, existirían una serie heterogénea de alteraciones moleculares que se han implicado también en la patogénesis de la CB de la LMC, como son la hipermetilación de c-ABL, la sobreexpresión de c-myc y la activación de la telomerasa o de la vía de la β -catenina. En este sentido, queda por confirmar si la sobreexpresión de survivina desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la viabilidad y la capacidad proliferativa de las células blásticas de la LMC. De cualquier forma, el perfil biológico de las células de la CB es bastante constante, sea cual sea el tipo de anomalía molecular secundaria, caracterizándose por una proliferación elevada independiente de los factores de crecimiento y una pérdida de diferenciación celular. A este respecto, cabe mencionar que el trastorno de la diferenciación celular de la CB podría ser consecuencia tanto de la elevada proliferación celular de los progenitores inmaduros como de la presencia de alteraciones secundarias de genes implicados en la regulación de la diferenciación, tales como la sobreexpresión de EVI-1 o la inactivación de C/EBP α .

5. CONCLUSIONES

1. Una tercera parte de los pacientes con CB linfoide de la LMC presenta deleciones homocigotas del gen supresor tumoral p16, cuya presencia no parece asociarse a un perfil clínico característico de la CB ni tiene valor pronóstico. Dado que esta alteración molecular no se detecta en la fase crónica ni en la CB mieloide, cabría especular acerca de su posible implicación en la patogénesis de la progresión de la LMC a la CB de fenotipo linfoide. Por otra parte, la técnica de PCR a tiempo real constituye un método simple y seguro para determinar el estado delecional del gen p16.
2. El gen de survivina está sobreexpresado tanto en la fase crónica de la LMC como en la CB. Sin embargo, los niveles de expresión de survivina son hasta siete veces superiores en la CB que en la fase crónica. La sobreexpresión de survivina se registra tanto en la CB de estirpe mieloide como en la linfoide, lo que apunta a que esta anomalía no es específica de una determinada línea celular, a diferencia de lo que ocurre con otras alteraciones moleculares adquiridas en la CB. Por tanto, estos resultados amplían la lista de neoplasias en que la survivina se encuentra desregulada y sugieren una posible implicación de la sobreexpresión de survivina en la patogénesis del mantenimiento y progresión de la LMC.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999;340:1330-1340.
2. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999;341:164-172.
3. Moloney WC. Radiogenic leukemia revisited. Blood 1987;70:905-908.
4. Kamada N, Uchino H. Chronologic sequence in appearance of clinical and laboratory findings characteristic of chronic myelocytic leukemia. Blood 1978;51:843-850.
5. Holmberg M. Is the primary event in radiation-induced chronic myelogenous leukemia the induction of the t(9;22) translocation ?. Leuk Res 1992;16:333-336.
6. Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. Am J Med 1987;83:445-454.
7. Cervantes F, Rozman M, Rosell J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. A study of prognostic factors in the blast crisis of

Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia.
Br J Haematol 1990;76:27-32.

8. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. Cancer. 1988;61:1441-1446.
9. Cervantes F, López-Guillermo A, Bosch F, Terol MJ, Rozman C, Montserrat E. An assessment of the clinicohaematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukaemia. Eur J Haematol. 1996;57:286-291.
10. Urbano-Ispizua A, Cervantes F, Matutes E, et al. Immunophenotypic characteristics of blast crisis of chronic myeloid leukemia: correlations with clinico-biological features and survival. Leukemia 1993;7: 1349-1354.
11. Cervantes F, Villamor N, Esteve J, et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. Br J Haematol 1998;100:123-128.
12. Janossy G, Woodruff RK, Peppard MJ, et al. Relation to 'lymphoid' phenotype and response to chemotherapy incorporating vincristine-

prednisone in the acute phase of Ph positive leukemia. *Cancer* 1979; 43:426-434.

13. Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *Am J Med* 1993; 94:69-74.
14. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344:1038-42.
15. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 2002; 99:3530-9.
16. Bernstein, R. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Sem Hematol* 1988;25:20-34.
17. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1499-1504.

18. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.
19. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983;306:277-280.
20. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93-99.
21. Hagemeijer A. Chromosome abnormalities in CML. *Baillière's Clinical Hematology* 1987;1:963-981.
22. Martinelli G, Terragna C, Amabile M, et al. Alu and transposon recognition site sequences flanking translocation sites in a novel type of chimeric bcr-abl transcript suggest a possible general mechanism for bcr-abl breakpoints. *Haematologica* 2000;85:40-46.
23. Saglio G, Storlazzi CT, Giugliano E, et al. A 76-kb duplication maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: Possible involvement in the genesis of the

Philadelphia chromosome translocation. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:9882-9887.

24. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science 1990;247:1079-1082.
25. Gordon MY. Biological consequences of the BCR/ABL fusion gene in humans and mice. J Clin Pathol 1999;52:719-722.
26. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr/abl} gene of Philadelphia chromosome. Science 1990;247:824-830.
27. Sawyers CL, Gishizky ML, Quan S, et al. Propagation of human blastic leukemias in the SCID mouse. Blood 1992;79:2089-2098.
28. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996; 2:561-6.
29. Druker BJ, Talpaz M, Debra J, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukaemia. N Engl J Med 2001; 344:1031-7.

30. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobsen RJ, Hansen JA. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1981;58:158-163.
31. Raskind WH, Ferraris AM, Najfeld V, Jacobsen RJ, Moohr JW, Fialkow PJ. Further evidence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 1993;7:1163-1167.
32. Ferraris AM, Canepa L, Melani C, Miglino M, Broccia G, Gaetani GF. Clonal B-lymphocytes lack bcr rearrangement in Ph-positive chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1989;73:48-50.
33. Lister R, Casas L, Mutchinick O, Pérez-Chávez F, Labardini J. Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1980;56:812-814.
34. Fayad L, Kantarjian H, O'Brien S, et al. Emergence of new clonal abnormalities following interferon-alpha induced complete cytogenetic response in patients with chronic myeloid leukemia: report of three cases. *Leukemia* 1997;11:767-771.

35. Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, Dufva IH, Brondum-Nielsen K. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8. *Leukemia* 2002;16:1390-1395.
36. Markt S, Bua M, Marín D, et al. Emergence of additional chromosomal abnormalities following treatment with STI571 (Imatinib Mesylate) for Philadelphia positive chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2001;98:617a (Abstra. 2584).
37. Gambacorti-Passerini C, Giudici G, Le Coutre P, et al. Non random chromosomal abnormalities in Ph-negative bone marrow (BM) cells from CML patients achieving major cytogenetic responses (MCR) with STI571 (Gleevec™). *Blood* 2001;98:257b (Abstra. 4762).
38. Meunier V, Giraudier S, Van den Akker J, et al. Treatment with STI571 (Novartis®) in chronic myeloid leukemia (CML): unexpected hematological findings in a series of 26 patients. *Blood* 2001;98:263b (Abstra. 4784).
39. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 1995;86:3118-3122.

40. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998;92:3362-3367.
41. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-375.
42. Raskind WH, Fialkow PJ. The use of cell markers in the study of human hematopoietic neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987;49:127-167.
43. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000;355:1688-1691.
44. Holyoake TL, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:549-558.
45. Holyoake TL, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescence subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:2056-2064.

46. Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Sem Immunol* 1995;7:255-266.
47. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 1995;80:237-248.
48. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994;77:121-131.
49. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999;399:814-817.
50. Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem* 1998;273:14225-14230.
51. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 1985;315:758-761.

52. Wetzler M, Talpaz M, Yee G, et al. Cell cycle-related shifts in subcellular localization of bcr-association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3488-3492.
53. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 1996;10:751-756.
54. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88:2375-2384.
55. Melo JV, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190BCR-ABL chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia ? *Leukemia* 1994;8:208-211.
56. Ravandi F, Cortes J, Albitar M, et al. Chronic myelogenous leukaemia with p185 (BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. *Br J Haematol* 1999;107:581-586.
57. Pane F, Frigeri F, Sindona M, et al. Neutrophilic-chronic myelogenous leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410-2414.

58. Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of Abl by fusion to an ets-related gen, TEL. *Cancer Res* 1995;55:34-38.
59. Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* 1999;189:1399-1412.
60. Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: No correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol* 1995;89:546-554.
61. Inokuchi K, Futaki M, Yamada T, et al. The relationship between the site of breakpoints within the bcr and trombopoiesis of Philadelphia-positive chronic myelocytic leukemia. *Leuk Res* 1991;15:1067-1073.
62. Briz M, Vilches C, Cabrera R, Forés R, Nicolás-Fernández M. Typical chronic myelogenous leukemia with e19a2 junction BCR/ABL transcript. *Blood* 1997;90:5024-5025.

63. Haskovec C, Ponzetto C, Polák J, et al. p230 BCR/ABL protein may be associated with an acute leukaemia phenotype. *Br J Haematol* 1998;103:1104-1108.
64. Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. *Blood* 1997;89:3064.
65. Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993;81:158-165.
66. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, et al. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:738-744.
67. Herens C, Tassin F, Lemaire V, et al. Deletion of the 5'-ABL region: a recurrent anomaly detected by fluorescence *in situ* hybridization in about 10% of Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 2000;110:214-216.

68. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, et al. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001;97:3581-3588.
69. Huntly BJ, Guilhot F, Reid AG, et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. *Blood* 2003;102:2205-2212.
70. Franz WM, Berger P, Wang JY. Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J* 1989;8:137-147.
71. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, et al. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 1991;66:161-171.
72. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-3356.
73. Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillière's Clin Haematol* 1997;10:485-505.

74. Eaves AC, Cashman JD, Gaboury LA, et al. Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5306-5310.
75. Eaves AC, Eaves CJ. Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells. *Blood Cells* 1988;14:355-368.
76. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesion interactions with marrow stroma of hematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1984;328:342-344.
77. Verfaillie CM, Hurley R, Zhao RCH, Prosper F, Delforge M, Bhatia R. Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone? *J Lab Clin Med* 1997;129:584-591.
78. Zhao RC, Tarone G, Verfaillie CM. Presence of the adhesion inhibitory β 1B integrin isoform on CML but not normal progenitors is at least in part responsible for the decreased CML progenitor adhesion [abstract]. *Blood* 1997;90:393a.

79. Bhatia R, Wayner EA, McGlave PB, Verfaillie CM. Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest* 1994;94:384-391.
80. Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* 1999;13:1109-1116.
81. Clarkson B, Strife A, Wisniewski P, et al. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible creative strategies. *Leukemia* 2003;17:1211-1262.
82. Pendergast AM, Quillian LA, Cripe LD, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993;75:175-185.
83. Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190 (BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704-31710.

84. Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 1997;159:4720-4728.
85. Sattler M, Salgia R, Okuda K, et al. The protooncogen product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CDK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 1996;12:839-846.
86. Zou X, Rudchenko S, Wong K, Calame K. Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras, Raf1, and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1997;11:654-662.
87. Jiang X, López A, Holyake T, Eaves A, Eaves C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12804-12809.
88. Saito H, Hatake K, Dvorak AM, et al. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2288-2292.
89. Chang JM, Metcalf D, Lang RA, et al. Nonneoplastic hematopoietic myeloproliferative syndrome induced by dysregulated multi-CSF (IL-3) expression. *Blood* 1989;73:1487-1497.

90. Sirard C, Laneuville P, Dirk JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood* 1994;83:1575-1585.
91. El Ouriaghli F, Sloan E, Mainwaring L, et al. Clonal dominance of chronic myelogenous leukemia is associated with diminished sensitivity to the antiproliferative effects of neutrophil elastase. *Blood* 2003;102:3786-3792.
92. Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:2038-2044.
93. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM: Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995;15:5531-5541.
94. Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG, Solary E. BCR-ABL delays apoptosis up-stream of procaspase-3 activation. *Blood* 1998;91:2415-2422.
95. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is

required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995;86:726-736.

96. Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL3/GM-CSF receptors. *EMBO J* 1995;14:266-275.
97. Sánchez-García I, Grutz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5287-5291.
98. Horita M, Andreu EJ, Benito A, et al. Blockade of the bcr-abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 2000;191:977-984.
99. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF- κ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 1998;12:968-981.
100. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 2001;7:228-234.

101. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 1999;9:179-186.
102. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 2002;16:1402-1411.
103. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood* 2004;103:4010-4022.
104. Cervantes F, Ballesta F, Milá M, Rozman C. Cytogenetic studies in blast crisis of Ph-positive chronic granulocytic leukemia: results and prognostic evaluation in 52 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;21:239-246.
105. Alimena G, De Cuia MR, Diverio D, Gastaldi R, Nanni M. The karyotype of blastic crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;26:39-50.
106. Majlis A, Smith TL, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Kantarjian HM. Significant of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:196-203.
107. Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Costa D, Carrió A, Montserrat E. Blast crisis of Ph-positive chronic myeloid leukemia with

isochromosome 17q: report of 12 cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma* 2000;38:83-90.

108. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002;107:76-94.
109. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
110. Foti A, Bar-Eli M, Ahuja HG, Cline MJ. A splicing mutation accounts for the lack of p53 gene expression in a CML blast crisis cell line: a novel mechanism of p53 inactivation. *Br J Haematol* 1990;76:143-145.
111. Neubauer A, He M, Schmidt CA, Huhn D, Liu ET. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain based techniques. *Leukemia*. 1993;4:593-600.
112. Nakai H, Misawa S. Chromosome 17 abnormalities and inactivation of the p53 gene in chronic myeloid leukemia and their prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 1995;19:213-221.

113. Fioretos T, Strömbeck B, Sandberg T, et al. Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. *Blood* 1999;94:225-232.
114. Rovira A, Urbano-Ispizua A, Cervantes F, et al. P53 tumor suppressor gene in chronic myelogenous leukemia: a sequential study. *Ann Hematol* 1995;70:129-133.
115. Honda H, Ushijima T, Wakazono K, et al. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* 2000;95:1144-1150.
116. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Perrotti D, Martínez R, Wasik MA, Calabretta B. Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13137-13142.
117. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998;12:845-859.

118. Sill H, Goldman JM, Cross CP. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;85:2013-2016.
119. Serra A, Gottardi E, Della Ragione F, Saglio G, Iolascon A. Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1995;91:625-629.
120. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:837-841.
121. Iolaschon A, Della Ragione F, Giordani L, Serra A, Saglio G, Faienza MF. Expression of cell cycle regulatory genes in chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 1998;83:771-777.
122. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;83:993-1000.
123. Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:22-30.

124. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The INK4a tumor-suppressor gene product, p19ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998;92:713-723.
125. Asimakopoulos FA, Shteper PJ; Krichevsky S, et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:2452-2460.
126. Zion M, Ben-Yehuda D, Avraham A, Cohen O, Wetzler M, Meloul D, Ben-Neriah Y. Progressive *de novo* DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10722-10726.
127. Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson SE. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation. *Blood* 1991;77:2435-2440.
128. Gaidano G, Serra A, Guerrasio A, Rege-Cambrin G, Mazza U, Saglio G. Genetic analysis of p53 and RB1 tumor-suppressor genes in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 1994;68:3-7.

129. Gaiger A, Henn T, Horth E, et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood* 1995;86:2371-2378.
130. Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW. The amount of BCR/ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stages. *Ann Hematol* 2000;79:424-431.
131. Issaad C, Ahmed M, Novault S, et al. Biological effects induced by variable levels of BCR-ABL protein in the pluripotent hematopoietic cell line UT-7. *Leukemia* 2000;14:662-670.
132. McCarthy DM, Rassool FV, Goldman JM, Graham SV, Birnie GD. Genomic alterations involving the c-myc proto-oncogene locus during the evolution of a case of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet* 1984;2:1362-1365.
133. Daheron L, Salmeron S, Patri S, Brizard A, Guilhot F, Chomel JC, Kitzis A. Identification of several genes differentially expressed during progression of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1998;12 :326-332.

134. Jennings BA, Mills KI. c-Myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res* 1998;22:899-903.
135. Preisler HD, Agarwal R, Sato H, Singh PK, Wang ZQ, Sandberg AA. Studies of proto-oncogen expression in the chronic and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Eur J Cancer* 1990;26:960-965.
136. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, et al. Antisense oligodeoxynucleotide combination therapy of primary chronic myelogenous leukemia blast crisis in SCID mice. *Blood* 1996 ;88 :1005-1012.
137. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 1992;70:901-910.
138. Afar DE, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawyers CL. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science* 1994;264:424-426.
139. Ceballos E, Delgado MD, Gutierrez P, et al. c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21WAF1 transactivation in K562 leukemia cells. *Oncogene* 2000;19:2194-2204.

140. Nucifora G. The EVI1 gene in myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11 :2022-2031.
141. Ogawa S, Kurokawa M, Tanaka T, et al. Increased evi-1 expression is frequently observed in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:788-794.
142. Murakami T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, et al. Cytogenetic and immunogenotypic alterations of blast crisis cells in chronic myelogenous leukemia independently linked to immunophenotypic expression. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;72:48-54.
143. Carapeti M, Goldman JM, Cross NC. Overexpression of EVI1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1561.
144. Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* 1996;13:2589-2594.
145. Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 1995;82:981-988.

146. LeMaistre A, Lee MS, Talpaz M, et al. Ras oncogene mutations are rare late stage events in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989;73:889-891.
147. Watzinger F, Gaiger A, Karlic H, Becher R, Pillwein K, Lion T. Absence of N-ras mutations in myeloid and lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 1994;54:3934-3938.
148. Silly H, Chase A, Mills KI, et al. No evidence for microsatellite instability or consistent loss of heterozygosity at selected loci in chronic myeloid leukaemia blast crisis. *Leukemia* 1994;11:1923-1928.
149. Mori N, Takeuchi S, Tasaka T, et al. Absence of microsatellite instability during the progression of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:151-152.
150. Canitrot Y, Lautier D, Laurent G, et al. Mutator phenotype of BCR-ABL transfected Ba/F3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase beta. *Oncogene* 1999;18:2676-2680.
151. Takedam N, Shibuya M, Maru Y. The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:203-207.

152. Deutsch E, Dugray A, Abdulkarim B, et al. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 2001;97:2084-2090.
153. Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, et al. Downregulation of BRCA1 in BCR/ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 2003;101:4583-4588.
154. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-809.
155. Testa NG. Telomeres and haemopoiesis. *Br J Haematol* 1998;103:591-593.
156. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 1997;11:190-194.
157. Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MAS. Telomerase activity and telomerase length in acute and chronic leukemia, pre and post-ex vivo culture. *Cancer Res* 2000;60:610-617.

158. Boultonwood J, Peniket A, Watkins F, et al. Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood* 2000;96:358-361.
159. Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, et al. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 2000;95:1883-1890.
160. Cambier N, Chopra R, Strasser A, et al. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene* 1998;16:726-736.
161. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest* 1993;92:1925-1939.
162. Wetzler M, Talpaz M, Estrov Z, Kurzrock R. CML: mechanisms of disease initiation and progression. *Leuk Lymphoma* 1993;11(Suppl. 1):47-50.

163. Gordon MY, Dazzi F, Marley SB, et al. Cell biology of CML cells. *Leukemia* 1999;13(Suppl. 1):S65-S71.
164. Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4742-4749.
165. Perrotti D, Cesi V, Trotta R. BCR-ABL suppresses C/EBP α expression through inhibitory activity of hnRNP E2. *Nature Genet* 2001;30:48-58.
166. Tavor S, Park DJ, Gery S, et al. Restoration of C/EBP α expression in a BCR-ABL⁺ cell line induces terminal granulocytic differentiation. *J Biol Chem* 2003;52:52651-52659.
167. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004;351:657-667.
168. Lim SH, Coleman S. Chronic myeloid leukemia as an immunological target. *Am J Hematol* 1997;54:61-67.
169. Coleman S, Fisher J, Hoy T, Burnett AK, Lim SH. Autologous MHC-dependent leukaemia-reactive T lymphocytes in a patient with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 1996;10:483-487.

170. Selleri C, Maciejewski JP. The role of FAS-mediated apoptosis in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000;37:283-297.
171. Lickliter JD, Kratzke RA, Nguyen PL, Niehans GA, Miller JS. Fas ligand is highly expressed in acute leukemia and during transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis. *Exp Hematol* 1999;27:1519-1527.
172. Cervantes F, Pierson BA, McGlave PB, Verfaillie CM, Miller JS. Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture. *Blood* 1996;87:2476-2485.
173. Baron F, Turhan AG, Giron-Michel J, et al. Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity: relationship with BCR-ABL expression. *Blood* 2002;99:2107-2113.
174. Carayol G, Giron-Michel J, Azzarone B, et al. Altered natural killer cell differentiation in Cd34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Oncogene* 2000;19:2758-2766.
175. Pierson BA, Miller JS. The role of autologous natural killer cells in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997;27:387-399.

176. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, response less to stimuli than recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 1996;88:2279-2287.
177. Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, et al. Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in chronic myelogenous leukaemia cells in blast crisis. *Br J Haematol* 1990;74:24-29.
178. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995;86:1148-1158.
179. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, for the IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.

180. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346:645-52.
181. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002; 99:1928-37.
182. Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* 2002;99:3547-53.
183. Gorre ME, Sawyers CL. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2002;9:303-7.
184. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutations or amplification. *Science* 2001;293:876-80.
185. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 2002;359:487-91.

186. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002;99:3472-5.
187. Le Coutre P, Tassi E, Varella-García M, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000;95:1758-66.
188. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1641-50.
189. Kuo ML, Duncavage EJ, Mathew R, et al. ARF induces p53-dependent and -independent antiproliferative genes. *Cancer Res* 2003;63:1046-1053.
190. Serrano M, Lee H, Chin L, et al. Role of the INK4A locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27-37.

191. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1999;3:917-921.
192. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
193. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999;23:387-388.
194. Bao R, Connolly DC, Murphy M, et al. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522-528.
195. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002;277:3247-3257.
196. Zhou M, Gu L, Li F, et al. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:124-131.

197. Adida C, Recher C, Raffoux E, et al. Expression and prognostic significance of survivin in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111:196-203.

198. Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, et al. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or survivin does not affect cell survival or prognosis.