ความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรม ณ ลำดับนิวคลีโอไทด์ -938C>A และการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *Bcl-2* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย

The Association of -938C>A Single Nucleotide Polymorphism and Gene Expression of *Bcl-2* in Thai Breast Cancer Patients

ศุภฤทธิ์ ภักดีไทย[1*] วนิดา พงศ์สถาพร[1] เพ็ญศรี แซ่หลี[2] และ วิมล สุขตั้งมั่น[3]

Supparit Pakdeethai[1*] Wanida Pongstaporn[1] Pensri Saelee[2] and Vimol Suktangman[3]

[1, 1] อาจารย์ประจำ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[2]งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

[3]กลุ่มงานพยาธิ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

[1, 1]Lecturer in Bachelor of Science Faculty, Rangsit University Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

[2]Division of Research, National Cancer Institute, Bangkok 10400

[3]Division of Pathology, National Cancer Institute, Bangkok 10400

**Corresponding author, E-mail: supparit.p@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

ยีน *Bcl-2* อยู่ในกลุ่ม *Bcl 2* –family ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในกระบวนการ Mitochondrial pathway การเกิด polymorphism ในส่วน promoter ของยีน *Bcl-2* อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นและนำไปสู่การเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยที่ขัดแย้งกันอยู่ระหว่างการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ที่เพิ่มขึ้นกับอัตราการอยู่รอดของมะเร็งชนิดต่างๆ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง ยีน *Bcl-2* ณ ลำดับนิวคลีโอไทด์ -938 C>A โดยวิธี DNA sequencing ในผู้ป่วยหญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมในประเทศไทย 50 ราย เทียบกับการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *Bcl-2* โดยวิธี Immunohistochemistry พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938 C > A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2*ในระดับของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value*=0.002)

คำสำคัญ: *Bcl-2, Breast cancer, polymorphism*

Abstract

Bcl-2 in the *Bcl2*-family is important in regulating cell death and apoptosis in the mitochondrial pathway. Polymorphism in the promoter region of *Bcl-2* may increase gene expression which leads to cancer. However, there are conflicting studies on the association between the expression of gene and the survival rate of various cancer

types. This research studied association between *Bcl-2* (-938 C> A) genotype by DNA sequencing and *Bcl-2* expression by immunohistochemistry. It was found that, statistically, *Bcl-2* (-938 C> A) genotype was significantly associated with increasing *Bcl-2* expression (*p-value* = .002).

Keywords: *Bcl-2, Breast cancer, polymorphism*

1. บทนำ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยในผู้ชายพบมะเร็งตับมากที่สุด รองลงมาคือมะเร็งปอด ส่วนในผู้หญิงพบมะเร็งเต้านมเป็นอันดับหนึ่งรองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก (ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ, 2554) อัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านม 20.9 คนต่อประชากรสตรี 100,000 คน (Khuhaprema, 2010) ในกรุงเทพมหานครพบว่ามีสถิติการเกิดโรคนี้คิดเป็น 20.6 ต่อ ประชากร 100,000 คน นับว่าสูงสุดของประเทศ สถิติการตายจากโรคมะเร็งเต้านมขึ้นอยู่กับระยะของโรคมะเร็งที่เป็น ถ้าเป็นระยะที่หนึ่งโอกาสรอดชีวิต (Survival rate) 5-10 ปี จะมีโอกาสถึง 80% ถ้าเป็นระยะที่สอง เหลือ 60 % ระยะที่สาม เหลือ 40 % และระยะที่สี่ โอกาสรอดชีวิตจะต่ำกว่า 20 % ดังนั้นการดูแลตัวเองเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง และการค้นพบมะเร็งตั้งแต่ระยะเริ่มแรกในขณะที่ก้อนมีขนาดเล็ก และก้อนมะเร็งยังอยู่เฉพาะที่เต้านม ยังไม่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง จึงเป็นเรื่องสำคัญ เพราะจะมีโอกาสหายขาดมากขึ้น เมื่อเทียบกับการตรวจพบก้อน มะเร็งที่มีขนาดใหญ่ หรือกระจายไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้แล้ว สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง คือ ความผิดปกติในระดับโมเลกุล ส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้นและเกิด apoptosis ลดลง กลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งมี 2 กลุ่ม คือ ยีนส่งเสริมมะเร็ง (oncogene) และยีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor gene) ความผิดปกติของยีนส่งเสริมมะเร็งที่สำคัญได้แก่ WT1, c-erb-B2, CCND1, *Bcl-2*, *c-Myc, human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* เป็นต้น

ยีน *Bcl-2* อยู่ในกลุ่ม *Bcl2*- family มีความสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ mitochondrial pathway (Brown, 1997)

การศึกษา (-938C>A) polymorphism ของยีน *Bcl-2* มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *Bcl-2* ที่ตรวจโดยวิธี Immunohistochemistry และพบว่าทั้ง (-938C>A) polymorphism ของยีน *Bcl-2* และการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *Bcl-2* มีความสัมพันธ์กับการอยู่รอดในผู้ป่วย oropharyngeal squamous cell carcinoma (Lehne, 2008)

การเกิด Polymorphism ของยีน *Bcl-2* ในส่วน promoter ของยีน อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นและนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ อย่างไรก็ดี ยังมีงานวิจัยที่ขัดแย้งกันอยู่ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นกับอัตราการอยู่รอดของมะเร็งชนิดต่างๆ

ในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C >A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนที่ได้จากการทำ Immunohistochemistry ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย

2. วัตถุประสงค์

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C >A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนที่ได้จากการทำ Immunohistochemistry ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1.1 การออกแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยประยุกต์เชิงทดลองในสาขาอณูชีววิทยาของมะเร็งเต้านม โดยศึกษาความถี่ของยีน *Bcl-2* (-938C >A) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเทียบกับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนด้วยวิธี Immunohistochemistry

3.1.2 การเก็บสิ่งส่งตรวจ

งานวิจัยในครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 50 ราย ได้จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (ดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอที่เหลือจากงานวิจัยของนางสาวเพ็ญศรี แซ่หลี งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ) และได้ผ่านขั้นตอนการขอจริยธรรมงานวิจัยในคนจากสถาบันมะเร็งและสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิตแล้ว

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ DNA 100 ng ในปริมาตรทั้งสิ้น 50 µl ในสารประกอบ 1X TBE buffer, dNTP 200 µM และ 20 pmol ของ Specific primer แต่ละตัวโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sense primer คือ 5'TTA-TCC-AGC-TTT-TCG-G 3' ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ antisense primer คือ 5'GGC-GGC-AGA-TGA-ATT-ACA-A 3' และ *Taq* DNA Polymerase 1 unit นำสารประกอบที่ได้เข้าเครื่อง PCR (PCR machine) โดยใช้โปรแกรมดังนี้ Denature 94 ^{o}C 30 วินาที Annealing 58 ^{o}C 1 นาที Extension 72 ^{o}C 1 นาที เพิ่มจำนวน 40 รอบ แล้วทำการตรวจหาผลผลิต PCR (PCR Product) โดยการทำ Electrophoresis ใน 2% agarose โดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ และย้อมแผ่นเจลด้วย Ethidium bromide จะได้ PCR Product ขนาด 252 bp

3.2.2 ตรวจหา Polymorphism ของยีน *Bcl-2* ที่ตำแหน่ง (-938C>A) โดยวิธี DNA sequencing ซึ่งจะนำ PCR product ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับทางบริษัท Biogenomed (SolGent; Korea)

3.2.3 ตรวจหาการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *Bcl-2* ด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยชิ้นเนื้อที่ได้จากพาราฟินบล็อก ที่เป็นตัวอย่างเดียวกับเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่นำมาศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *Bcl-2* ณ ตำแหน่ง (-938C>A) ในการดูการแสดงออกในระดับโปรตีน

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

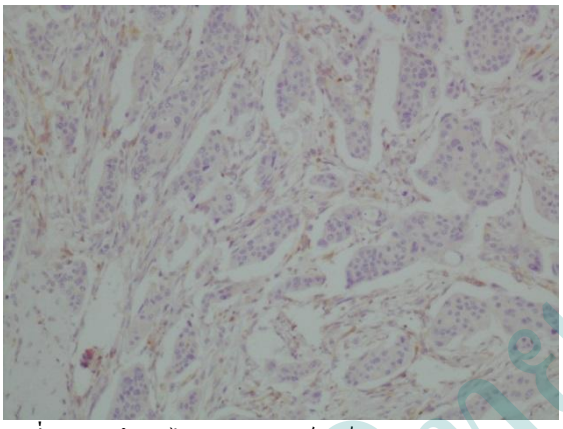
การใช้สถิติในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C >A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย โดยใช้ Chi-Square; $P\text{-value} < 0.05$ แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

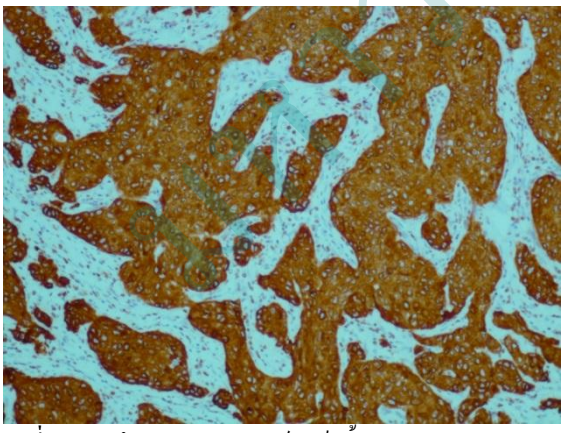
4.1 ลักษณะของตัวอย่าง

ศึกษาตัวอย่างทั้งสิ้น 50 ราย โดยสกัดตัวอย่าง DNA จากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ทำ PCR ซึ่ง PCR ผลผลิต (PCR product) ที่ได้มีขนาด 252 bp จากนั้นนำ PCR product ทั้ง 50 ราย ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) กับทางบริษัท Biogenomed (SolGent; Korea)

ศึกษาการแสดงออกเป็นโปรตีนโดยวิธี Immunohistochemistry ใช้ชิ้นเนื้อพาราฟินบล็อก ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 50 ราย โดยผลที่แยกระหว่าง positive และ negative ชัดเจน ซึ่งใช้เกณฑ์การประเมินโดยน้อยกว่า 10% ของการติดสีในส่วนไซโตพลาสซึมให้ผลเป็นลบ (negative) รูปที่ 1 และมากกว่า 10% ของการติดสีในส่วนไซโตพลาสซึมให้ประเมินว่าให้ผลเป็นบวก (positive) รูปที่ 2 ซึ่งผลที่ได้นั้นใช้พยาธิแพทย์ในการวิเคราะห์อย่างน้อยสองคน



รูปที่ 1 แสดงถึงการไม่ติดสีของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างผลลบ (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)



รูปที่ 2 แสดงถึงการติดสีของเซลล์มะเร็งทั้งหมดในตัวอย่างผลบวก (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)

4.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C>A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนที่ได้จากการทำ Immunohistochemistry

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C>A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีน

	N	Immunohistochemistry		*P- value*
		Positive	Negative	
Bcl-2 polymorphism	19	14	5	
Bcl-2 wild type	31	9	22	0.002

สรุป พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับโปรตีนที่ได้จากการทำ Immunohistochemistry (*P-value*=0.002)

5. การอภิปรายผล

ในประเทศไทยปัจจุบันสถิติอุบัติการณ์ในสตรี จำนวนผู้ป่วยใหม่ของมะเร็งเต้านมปีละประมาณ 12,000 คน และพบว่าเป็นมะเร็งอันดับ 1 ในกรุงเทพมหานครพบว่ามีสถิติการเกิดโรคนี้คิดเป็น 20.6 ต่อ ประชากร 100,000 คน นับว่าสูงสุดของประเทศ สถิติการตายจากโรคมะเร็งเต้านมขึ้นอยู่กับระยะของโรคมะเร็งที่เป็น ถ้าเป็นระยะที่หนึ่งโอกาสรอดชีวิต (Survival rate) 5 - 10 ปี จะมีโอกาสถึง 80% ถ้าเป็นระยะที่สอง เหลือ 60 % ระยะที่สาม เหลือ 40 % และระยะที่สี่ โอกาสรอดชีวิตจะต่ำกว่า 20 % (ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ, 2554) ดังนั้นการดูแลตัวเองเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง และการค้นพบมะเร็งตั้งแต่ระยะเริ่มแรกในขณะที่ก้อนมีขนาดเล็ก และก้อนมะเร็งยังอยู่เฉพาะที่เต้านม ยังไม่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง จึงเป็นเรื่องสำคัญ เพราะจะมีโอกาสหายขาดมากขึ้นเมื่อเทียบกับการตรวจพบก้อน มะเร็งที่มีขนาดใหญ่ หรือกระจายไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้แล้ว

สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง คือ ความผิดปกติในระดับโมเลกุล ส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้นและเกิด apoptosis ลดลง

กลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งมี 2 กลุ่ม คือ ยีนส่งเสริมมะเร็ง (oncogene) และยีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor gene) ความผิดปกติของยีนส่งเสริมมะเร็งที่สำคัญได้แก่ *WT1, c-erb-B2,CCND1, Bcl-2, c-Myc*, *human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* เป็นต้น (Kumar, 2010) ในจำนวนยีนที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง มียีนที่สำคัญตัวหนึ่งคือ *Bcl2* ที่อาจมีปฏิสัมพันธ์กับยีนอื่นๆจนเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านมหรือการดำเนินไปของโรคที่รุนแรงขึ้นได้ แต่กลไกในทางอณูชีววิทยายังไม่ทราบแน่ชัด

มีรายงานว่า ยีน *Bcl-2* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18q21.3 ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ *Bcl-2* มีความสัมพันธ์กับโปรตีน BAX (Leiter, 2000) ยีน *Bcl-2* มีทั้งสิ้น 3 exon และ 2 promoter region คือ P1 และ P2 ซึ่งมีหน้าที่ต่างกัน พบว่า Promoter ชนิด P2 อยู่ 1400 bp เหนือจุด translation initiation site และทำหน้าที่เป็น negative regulative element ในการควบคุมและยับยั้ง promoter ชนิด P1 (Zhang Ning, 2011)

พบว่าความผันแปรทางพันธุกรรม (Polymorphism) ของยีน *Bcl-2* มีทั้งสิ้น 8 จุด จุดแรกจะอยู่ที่ตำแหน่ง promoter region สามจุดอยู่ที่ exon 1 และอีก 4 จุดอยู่ที่ 3’ UTR (Park, 2004)

ในจำนวน Polymorphism ของยีน *Bcl2* ทั้ง 8 จุดนี้ พบว่าจุดที่น่าสนใจที่สุดคือจุดที่ promoter region (-938 C>A) โดยเป็น polymorphism ที่ตำแหน่ง P2 การเกิด polymorphism ของยีน *Bcl-2* ในส่วน promoter ของยีน อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นและนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ (Park, 2004)

Nuckel และคณะ 2007 พบว่า *Bcl 2 -938C allele* มีความสัมพันธ์กับการจับกันของ P2 กับ nuclear protein ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ A allele อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าการแสดงออกของ *Bcl- 2 gene* ที่ลดลงใน B cell ของผู้ป่วย Chronic lymphocytic leukemia (CLL) มีความสัมพันธ์กับ -938CC genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Nuckel, 2007) ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Majid และคณะ ในปี ค.ศ.2008 ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง(-938 C >A) polymorphism กับการแสดงออก ของ *Bcl-2* และกับอาการทางคลินิกของผู้ป่วย Chronic lymphocytic leukemia (CLL) (Majid, 2008)

มีรายงานว่า (-938 C >A) polymorphism ของยีน *Bcl-2* ไม่พบความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *Bcl-2* ที่ตรวจโดยวิธี Immunohistochemistry และไม่พบความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย breast cancer ในประชากรแถบยุโรป (Searle, 2012)

จากผลที่แตกต่างกันของความสัมพันธ์ของ *Bcl-2* (-938 C >A) กับลักษณะทางคลินิกของมะเร็งชนิดต่างๆ อาจเป็นเพราะความแตกต่างของเชื้อชาติ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *Bcl-2* (-938 C >A) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย

ในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด Polymorphism และการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *Bcl-2* (-938 C >A) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมไทย

การหาความสัมพันธ์ระหว่าง *Bcl-2* (-938C>A) genotype กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับโปรตีนที่ได้จากการทำ Immunohistochemistry พบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างนัยสำคัญ (P=0.002) งานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับ G.F. Lehnerdt และคณะ ในปี ค.ศ.2009 ซึ่งพบว่า การเกิด polymorphism มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วย oropharyngeal squamous cell carcinoma (Lehnerdt, 2008) (P= 0.008)

ข้อจำกัดของงานวิจัยในครั้งนี้ คือ จำนวนตัวอย่างที่ทำการหา Genotype ของยีน *Bcl-2* (-938 C > A) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีจำนวนน้อย ซึ่งการศึกษา polymorphism โดยทั่วไปควรจะมีจำนวนตัวอย่างที่มาก ทั้งนี้เป็นเพราะจำนวนตัวอย่างที่จะทำ polymorphism จะต้องมีชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกด้วย ทำให้จำนวนตัวอย่างมีน้อย อย่างไรก็ตาม งานวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งควรจะมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างตรวจ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือต่อไป

6. บทสรุป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระหว่าง *Bcl-2* (-938C>A) genotype โดยวิธี DNA sequencing กับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ในระดับของโปรตีนโดยวิธี Immunohistochemistry พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (*P-value*=0.002)

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในการทำวิจัยครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ปีงบประมาณ 2555

8. เอกสารอ้างอิง

ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ. (2554). วันมะเร็งโลก ปี 2554 มุ่งเน้นเรื่อง “มะเร็งป้องกันได้”. วารสารโรคมะเร็ง. 30 (2554): 1-2.

Brown R. (1997). The bcl-2 family of proteins. Br Med Bull 1997. 53(3): 466-477.

Khuhaprema T., Srivatanakul P., Attasara P., Sriplung H., Wiangnon S. and Sumitsawan Y. Cancer in Thailand. Vol V. Bangkok 2010.

Kumar V and Abbas AK. (2010) Neoplasia Robbins and Corran pathologic basic of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Lehnerdt G.F., Franz P., Bankfalvi A., Grehl S., Kelava A., Nuckel H., Lang S., Schmid K.W., Siffert W. and Bachmann H.S. (2008) The regulatory *Bcl-2* promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. Annals of Oncology. 20:1094-1099.

Leiter. (2000) Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases. E-book. 116.

Majid A., Tsoulakis O., Walewska R., Gesk S., Siebert R., Kennedy and Dyer. (2008). BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the *BCL2* -938A>C promoter single nucleotide polymorphism. Blood. 111: 874-877.

Nuckel H., H. Frey U., Bau M., Sellmann L., Stanelle J., Durid J., Jockel K., Duhrsen U and Siffert W. (2007). Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the *BCL2* gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 109: 290-297.

Park BL., Kim HL., Cheong HS., Cho HY., Kim EM., Shin HD., Kim YS and Lee C. (2004). Identification of variants in cyclin D1 (*CCND1)* and B-Cell CLL/ lymphoma 2 (*BCL2*). J Hum Genet. 49: 449-454.

Searle CJ., Brock LW., Cross SS., Balasubramanian SP., Reed MW and Cox A. (2012). A *Bcl-2* promoter polymorphism rs2279115 is not associated with *bcl-2* protein expression or patient survival in breast cancer patients. SpringerPlus.1: 38.

Zhang N., Li X., Tao K., Jiang L., Ma T., Yan S., Yuan C., Moran SM., Liang F., Haffty BG and Yang Q. (2011). *BCL-2* (-938C>A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. BMC Medical Genetics. 12: 48.