

Г.Д.ТЕЛЕГЕСВ, М.В.ДИБКОВ, М.В.БОЖКО,  
Н.М.ТРЕТЯК, С.С.МАЛЮТА

## МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА НЕОПЛАСТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ КРОВІ

*Для детекції філадельфійської хромосоми у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію і гострий лімфобластний лейкоз використовували молекулярно-біологічні методи. Вони включали bcr-геномні зонди і полімеразну ланцюгову реакцію із специфічними bcr/abl праймерами. Використання останньої є кращим для клінічних умов. Порівнюються можливості різних методів діагностики лейкемії, обговорюються питання їх етіології.*

**Вступ.** Звичайні методи діагностики лейкозів включають використання простих цитоморфологічних критеріїв, таких як форма та розмір клітин, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, структура ядра, характер зернистості цитоплазми та інших. Вони також доповнюються цитохімічними методами (визначення активності мієлопероксидази, кислотофосфатази, PAS реакція) [1]. Ці методи дозволяють встановлювати діагноз більшості пацієнтів.

Подальше уточнення природи лейкемічного клону вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу.

Використання моноклональних антитіл та імунофлуоресцентних та/або імуноферментних методів дозволяє більш точно встановлювати рідкі форми та варіанти лейкозів, і таким чином, визначає відповідні протоколи лікування [2,3].

Цитогенетичний аналіз має самостійне діагностичне і прогностичне значення, виявляючи за допомогою диференційного забарвлення хромосом характерні аномалії (транслокації, інверсії, делеції тощо)[4-6].

Однак навіть отримавши повну картину змін на рівні хромосом цитогенетичні методи не дозволяють виявити порушення експресії генів, мікроделеції, точкові мутації тощо. Крім того при проведенні широкомасштабних клінічних досліджень вони в цілому ряді випадків поступаються в технологічності молекулярно-біологічним методам, кількість яких за останній час значно збільшилась. На сьогодні молекулярно-біологічні методи включають методи з використанням геномних зондів [7,8], полімеразної ланцюговою реакції [9,10], флуоресценцію in situ гібридизацію (FISH) [11], "PCR in cell" [12], ПЛР з підвищеною чутливістю [13].

В даній роботі авторами представлено апробований в клінічних умовах метод визначення філадельфійської хромосоми у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) та гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ).

**Матеріали та методи.** В роботі використовували зразки крові хворих, що проходили лікування у гематологічних клініках м.Києва. ДНК з клітин білої крові виділяли за [14]. РНК отримували за [15]. Електрофорез ДНК, РНК, рестрикцію ДНК, перенесення ДНК на капронові фільтри, мічення зондів та гібридизацію проводили за [9,16].

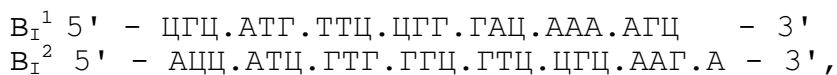
В роботі були використані олігонуклеотидні праймери [9,10]:

A<sub>1</sub> 5' - ТГА.ТТА.ТАГ.ЦЦТ.ААГ.АЦЦ.ЦГГ.А - 3'  
A<sub>2</sub> 5' - ГГТ.ЦАТ.ТТТ.ЦАЦ.ТГГ.ГТЦ.ЦАГ.Ц - 3'  
A<sub>3</sub> 5' - ТЦА.ГАЦ.ЦЦТ.ГАГ.ГЦТ.ЦАА.АГТ.Ц - 3'

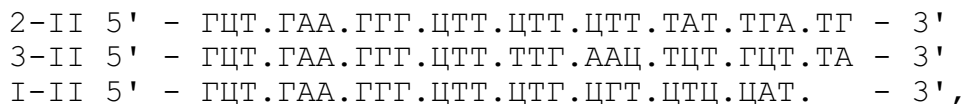
що комплементарні послідовностям 2-го екзона *ABL* гена і необхідні для отримання кДНК та служать 3' праймерами в полімеразній ланцюговій реакції;

B<sub>1</sub> 5' - ГАА.ГТГ.ТТТ.ЦАГ.ААГ.ЦТТ.ЦТЦ.Ц - 3'  
B<sub>2</sub> 5' - ГГА.ГЦТ.ГЦА.ГАТ.ГЦТ.ГАЦ.ЦАА.Ц - 3',

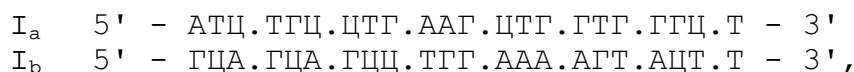
що гомологічні послідовності другого екзона ( $b_2$ ) *M-bcr* локуса гена BCR і використовуються як 5' праймери в ПЛР;



що відповідають послідовності I екзона BCR гена і використовуються для детекції філадельфійської хромосоми при ГЛЛ з точкою розриву в *m-bcr*;



використовуються для виявлення злитих ділянок 2-го екзона ( $b_2$ ) *M-bcr* гена, 3-го екзона ( $b_3$ ) *M-bcr* гена та I екзона гена BCR з II екзоном ABL гена;



що комплементарні альтернативним екзомам  $I_a$  та  $I_b$  гена ABL і використовуються для виявлення нормального ABL гена.

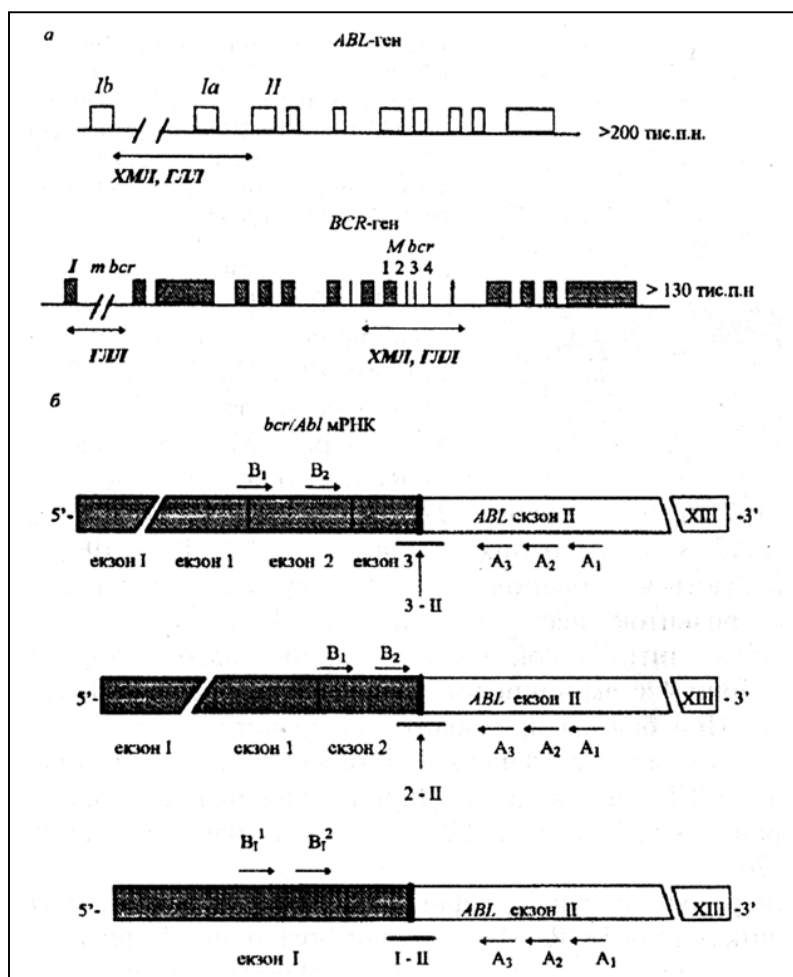


Рис.1 Схема організації BCR та ABL генів людини (а) та *bcr/AbI* мРНК, що утворюються при ХМЛІ та ГЛЛ (б): *m-bcr* - minor breakpoint cluster region; *M-bcr* - major breakpoint cluster region; Ia та Ib - альтернативні екзони гена ABL; I - перший екзон гена BCR; 1,2,3,4 ( $b_1 - b_4$ ) - відповідно 12-15 екзони гена BCR; стрілкою позначені місця розриву генів; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>; V<sub>1</sub><sup>1</sup>, V<sub>1</sub><sup>2</sup> - праймери, що застосовуються в ПЛР діагностиці; 2 - II, 3 - II, I - II - олігонуклеотиди, для детекції злитих ділянок *bcr/AbI* генів. Заштриховано *bcr* ділянку *bcr/AbI* мРНК, незаштриховано *AbI* ділянку.

кДНК отримували за допомогою зворотної транскриптази AMV. Система для проведення реакції складалась з 1-5 мкг РНК, 5-10 од РНазіну, 1мМ кожного з dNTP 10 рМ праймера А<sub>1</sub>, буфера для зворотної транскриптази та 5-10 од фермента. Загальний об'єм суміші складав 40 мкл. Реакцію проводили 45 хв при 42°C. Аліквоти реакційної суміші (5 - 10 мкл) використовували для проведення ампліфікації. Реакцію ампліфікації проводили в стандартній реакційній суміші для Biotaq полімерази з використанням відповідних праймерів (див рис.1). На першому етапі проводили 35 циклів за таких умов: 94°C - 18 сек, 55°C - 18 сек, 72°C - 1 хв. Після першого етапу оцінювали специфічність ампліфікації за допомогою гібридизації, перенесених на капронові мембрани ампліфікатів, з міченими <sup>32</sup>P γАТФ зондами 2-II, 3-II, I-II. Далі проводили другий етап ПЛР 94°C - 24 сек, 58°C - 18 сек, 72°C - 1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 6-8% поліакриламідному гелі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Використання геномних зондів для детекції *Ph'* хромосоми. Першим цитогенетичним маркером пухлинного росту була маленька G-пофарбована хромосома, що була названа Ph (філадельфійською) хромосомою [17]. Утворення даної хромосоми зумовлено реципрокною транслокацією між 9 та 22 хромосомами t(9;22) (q34;q11). Дана хромосома виявляється у 95% хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію, 25-30% дорослих та 2-10% дітей хворих на ГЛЛ [22,10,25,26]. На молекулярному рівні захворювання зумовлено утворенням злитого BCR/ABL гена (5' ділянка гена BCR поєднується з 3' ділянкою гена ABL). При ХМЛ продуктом транляції є BCR/ABL білок з ММ 210 кДа (p210), що нараховує 927 чи 902 амінокислотних залишків гена BCR та 1097 а.з. гена ABL [18,19,9]. Химерні білки характеризуються зміненою тирозинкіназною активністю [20], що і визначає розвиток першого етапу ХМЛ. В той же час при ГЛЛ утворюється злитий білок з ММ 185 кДа (p185), що містить перші 426 амінокислот гена BCR та ті ж самі 1097 амінокислот гена ABL. Цей білок і призводить до розвитку клінічної картини ГЛЛ [21]. Наявність філадельфійської хромосоми значно погіршує прогноз у хворих на ГЛЛ. Так якщо п'ятирічне виживання дітей за відсутності даної транслокації складає 89%, то за її наявності даний показник складає 20%.

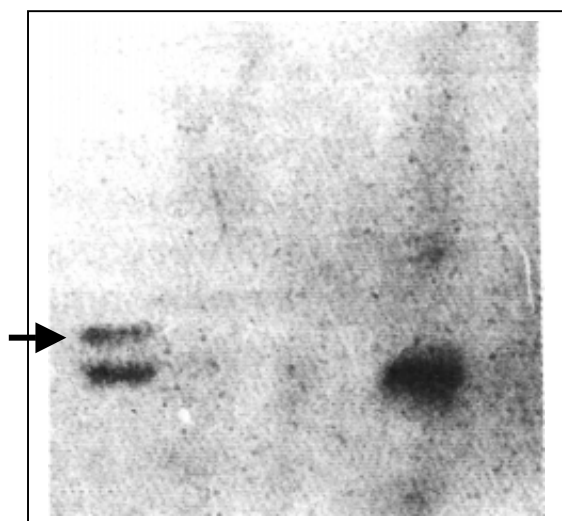


Рис.2 Детекція геномної перебудови за допомогою гібридизації з 3'-bcr зондом. ДНК розщеплена ферментом Bgl II. 1 - ДНК, виділена з крові хворого на ХМЛ; 2 - ДНК здорового донора. Стрілкою вказано фрагмент, що відповідає філадельфійській хромосомі. Нижній фрагмент відповідає Bgl-Bgl рестрикту M-bcr локуса (4,8 т.п.н.).

При утворенні філадельфійської хромосоми відбувається розрив у двох ділянках гена BCR: M-bcr (major breakpoint cluster region) розміром 5,8 т.п.н. (рис.1) та m-bcr (minor breakpoint cluster region) - ділянка першого інтрона гена BCR (приблизно 20 т.п.н.) [22,9,23]. Розриви у ділянці M-bcr виявляються у всіх випадках виникнення ХМЛ, а також приблизно 50% випадків ГЛЛ. В той же час розриви у ділянці m-bcr призводять переважно до розвитку ГЛЛ. Причини подібних розбіжностей на сьогодні не відомі. Розриви гена Abl відбуваються на ділянці довжиною близько 200 т.п.н. (між I та II екзонами). Наявність розривів в ділянці M-bcr робить можливим, при використанні відповідних зондів,

детектувати зміни в структурі даного регіону. Ми використовували два геномних зонди: 5'-BCR зонд, що являє собою клонований BglII/ HindIII фрагмент M-bcr, розміром 2 т.п.н.; та 3'-BCR зонд (BglII/HindIII фрагмент, розміром 1,2 т.п.н.), що був клонований в pSV-2 [10]. Зонди були люб'язно надані К.Бартрамом (Ulm, ФРН). На рис.2 представлено результати гібридизації рестрикованої BglII геномної ДНК з 3'-BCR зондом. Наявність нормальної 22 хромосоми зумовлює появу одного фрагмента розміром 4,8 т.п.н. (доріжка 2), в той же час наявність філадельфійської хромосоми (розрив в ділянці M-bcr) зумовлює появу додаткового фрагменту, в даному випадку 5,6 т.п.н. (доріжка 1). Зробивши додаткову рестрикцію ДНК ферментом Bam HI та провівши гібридизацію з 5'bcr зондом можна локалізувати ділянку розрива в M-bcr [27]. Питання про те, наскільки прогностично важливим для перебігу захворювання має точка розриву в ділянці M-bcr на сьогодні залишається відкритим [22,23]. Детекція M-bcr перебудов за допомогою геномних зондів певно не знайде клінічного застосування. Це обумовлено не тільки технічною складністю (використання радіоізоотопів, проведення багаторазових гібридизацій тощо, що в свою чергу призводить до значних затримок з остаточним встановленням діагнозу), а і тим, що даним методом неможливо детектувати Ph-лейкози з точкою розриву в регіоні m-bcr. Це спонукає до застосування інших методів, і зокрема полімеразної ланцюгової реакції.

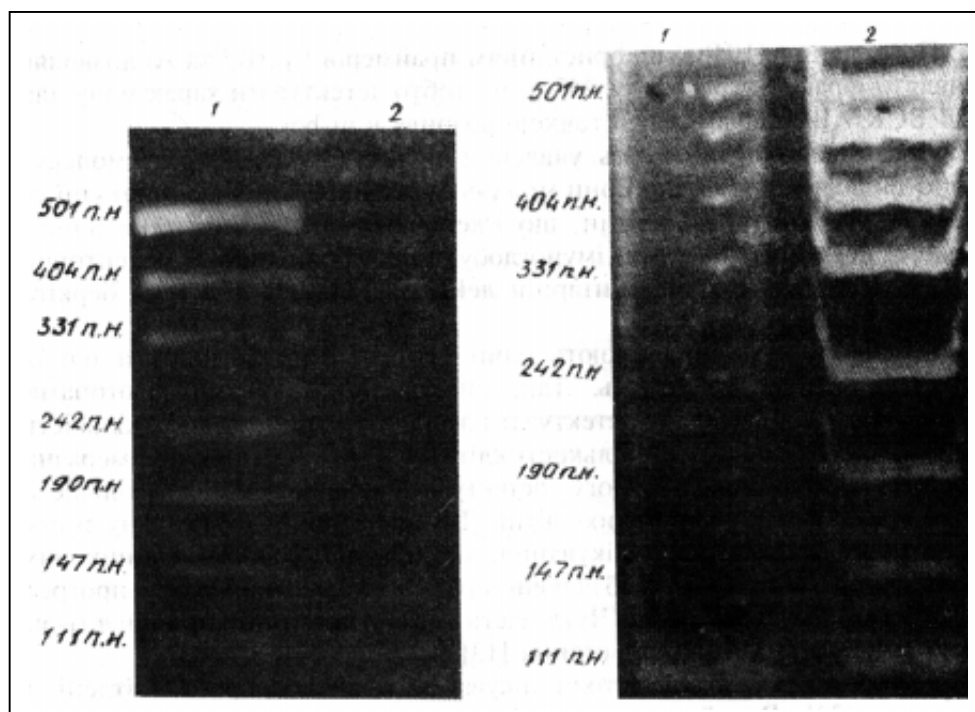


Рис.3 Детекція злитних bcr/abl генів ( $b_3/a_2$ ) за допомогою двоетапної полімеразної ланцюгової реакції. Наведено результат електрофореза в 6% акриламідному гелі. 1 - ампліфікат кДНК хворого 2 - ДНК плазмиди pUC19, розщеплена ферментом Msp I.

Рис.4 Детекція злитних bcr/abl генів ( $b_2/a_2$ ) за допомогою двоетапної полімеразної ланцюгової реакції. Наведено результат електрофореза в 6% акриламідному гелі. 1 - ампліфікат кДНК хворого 2 - ДНК плазмиди pUC19, розщеплена ферментом Msp I.

*ПЛР діагностика філадельфійської хромосоми.* Як згадувалось вище, розриви в BCR та ABL генах можуть відбуватися на значних за розміром ділянках, що робить проблематичним застосування ДНК ПЛР технології. В той же час, з врахуванням того, що BCR/ABL мРНК мають розмір 8,5 та 7 т.п.н. [10,19,9,24] та включають злиті екзони I гена BCR та II гена ABL (при ГЛЛ) та 13, 14 екзони гена BCR та II екзоном ABL гена (при ОЛЛ та ХМЛ), можна використовувати ПЛР для встановлення цих змін. Для одержання кДНК застосовували праймери A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (рис.16). Перший етап ампліфікації (30 циклів), що проводиться з

використанням праймерів  $A_1$  та  $B_1$ , звичайно не дає такої кількості продукту, яка необхідна для візуального виявлення в агарозному гелі. Даний ампліфікат можна виявити за допомогою гібридизації з міченими  $^{32}\text{P}$ -АТФ зондами 2-II, 3-II, I-II, що виявляють ділянки злиття BCR та ABL екзонів (рис.1б).

Проведення другого етапу ПЛР, з використанням праймерів  $A_2$ ,  $A_3$  та  $B_2$ , дозволяє виявити ампліфікати без проведення гібридизації та локалізувати точку розриву гена BCR. На рис.3 представлено результати такої ампліфікації. В даному випадку було виявлено фрагмент розміром 200 п.н., тому з врахуванням розміщення праймерів можна стверджувати, що в даному випадку розрив в гені *M-bcr* має місце між 3 та 4 екзонами, тобто має місце  $b_3/a_2$  транслокація.

Картина ампліфікації при  $b_2/a_2$  транслокації показана на рис.4. Виявляється фрагмент розміром 112 п.н.

Проведення ПЛР з використанням праймерів  $B_1^1$ ,  $B_1^2$  та  $A_3$  дозволяє виявляти фрагмент розміром 247 п.н., тобто детектувати характерну для ГЛЛ BCR/ABL перебудову з точкою розриву в *m-bcr*.

Представлені дані дають уявлення про деякі можливості молекулярно-біологічних методів. Вони можуть бути використані для детекції та ефективного контролю клітин, що вже мають визначений генетичний маркер: перебудовані гени імуноглобулінів, Т-клітинних рецепторів, злитих генів при промієлоцитарній лейкемії [28,29], лімфомі Беркіта тощо [5,6,30]. Обидва методи доповнюють один одного. Слід визначити ще їх різну потенційну чутливість. Так використання мічених ізотопами геномних зондів дає змогу детектувати змінні клітини, коли їх кількість не менше 2-5 відсотків від загальної кількості клітин [8]. В той час, коли полімеразна ланцюгова реакція дає змогу детектувати значно меншу кількість (приблизно  $10^4 - 10^5$ ) змінених клітин. Така чутливість дає реальну змогу стежити за ефективністю лікування, оцінюючи кількість залишкових патологічних клітин, передбачаючи розвиток бластних криз, прогрес захворювання [9,31-33]. Чутливість ПЛР постійно підвищується, розширюється база її використання [13].

Сучасні традиційні методи лікування досить добре висвітлені в літературі, зокрема [34]. В той же час знання молекулярних механізмів дають можливість розробки нових перспективних підходів. Один з них це усунення ефекту онкогену, компенсація функції зміненого антионкогену. Вже є роботи по блокуванню генів за допомогою антисенсових ДНК (блокування BCR/ABL та WT-1 гену [35-37]), рибозимів [38]. Вдалими виявились спроби по зміні пухлинного фенотипу клітин при введенні нормальних антионкогенів [39-40]. Актуальним є вивчення генів множинної лікарської резистентності у хворих на лейкози [41].

Ці розробки базуються на використанні сьогоденної інформації стосовно патологічного процесу. Звісно, що отримання нових даних щодо молекулярних основ захворювання суттєво змінить і підходи до діагностики та лікування. Перспективними вбачаються розробки по вивченню різних доменів в протоонкогенах [18,42-44], генів, що зумовлюють апоптоз [45]. Потребує подальшого вивчення картина експресії та геномних змін у хворих на різних стадіях захворювання.

**SUMMARY.** Molecular-biological approaches was applied for detection of Philadelphia chromosome in patients with chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. It includes bcr-genomic probes and polymerase chain reaction with specific bcr/abl primers. The latter is more preferable for clinic use. Different diagnostic methods are compared and leukemias etiology problems are discussed.

**РЕЗЮМЕ** Для детекции филадельфийской хромосомы у больных с хронической миелоидной лейкемией и острым лимфобластным лейкозом использовали молекулярно-биологические методы. Они включали bcr-геномные зонды и полимеразную цепную реакцию со специфическими bcr/abl праймерами. Использование последней является предпочтительным для клинических условий. Сравниваются возможности разных методов диагностики лейкемий, обсуждаются вопросы их этиологии.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов // Киев, Наукова Думка, 1074, 244с.
2. Глузман Д.Ф., Бебешко В.Г., Надгорная В.А., и др. Эмбриональное кроветворение и гемобластозы у детей. // Киев, Наукова Думка, 1988, 200с
3. Пинчук В.Г., Глузман Д.Ф., Надгорная В.А. и др. Иммуноцитохимические методы и моноклональные антитела в онкогематологии // Киев, Наукова Думка, 1990, 233 с.
4. T.Boehm, T.H.Rabbits A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man // E.J.Biochem, 1989, V.185, P.1-17.
5. M.J.Cline The molecular basis of leukemia // The New England Journal of Medicine, 1994, V.330, N5, P.328-336.
6. T.H.Rabbits Chromosomal translocations in human cancer // Nature, 1994, V.372, N.6502, P.143-149.
7. E.M.Southern Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. // J. Mol.Biol.- 1975, V.98, N.3, P.503-517.
8. G.Grosveld, T.Verwoerd, T van Agthoven et al The chronic myelocytic cell line K 562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript // Molecular and Cellular Biology, 1986, V.6, N2, P.607-616.
9. E.S.Kawasaki, S.S.Clark, M.Y.Coyne et al Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by deletion of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, V.85, N15, P.5698-5702.
10. Maurer J., Janssen J., Thiel E., et al. Deletion of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction // The Lancet.-1991.-337, N 8749.-P.1055-1058.
11. Tkachuk D.C., Westbrook C.A., Andreeff M., et al. Detection of bcr-Abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization // Science -1990, V.250, N.4980, P.559-562
12. N.Testori, G.Martinelli, P.Farabedoli et al. A new method of "in-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction" for detection of BCR/Abl transcripts in chronic myeloid leukemia patients. // Blood- 1996, V.87 N.9.-P.3884-3892.
13. Cross N.C.R., Feng L., Chase A. et al Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patient after bone marrow transplantation // Blood 1993, V.82, P.1929-1936
14. Mathew S. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Mol. Biology.-1984.-2, P.31-34.
15. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem. -1987. -162, P.156-159.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование // Москва, "Мир".-1984, 480 с.
17. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Science.-1960.-132, P.1497-1499.
18. Renshaw M.W., McWhirter J.R., Wang J.Y.J. The human leukemia oncogene bcr/abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation // Molecular and Cellular Biology.-1985.-15, N 3.-P.1286-1293.
19. Hooberman A.L., Carrino J.J., Leibowitz D., et al. Unexpected heterogeneity of BCR-ABL fusion mRNA detected by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome - positive acute lymphoblastic leukemia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1989.-86, N11. -P.4259-4263.
20. Daley G.Q., Ben-Neriah Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of the Philadelphia chromosome positive human leukemia // Adv. Cancer Res.-1991.-57, P.151-184.
21. Chan L.C., Karhi K.K., Raiter S.I., et al. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia // Nature.-1987.-325, N 6105.-P.635-637.
22. Милс К.И. Ген BCR/ABL при хроническом миелолейкозе // Гематология и трансфузиология.-1993.-38, С.3-7.
23. Туркина А.Г., Домнинский Д.А., Покровская Е.С., и др. Оценка прогностической значимости структуры хромосомной транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе // Гематология.-1993, N 3.-С.8-11.
24. Домнинский Д.А., Покровская Е.С., Бабушкина Е.А., и др. Применение полимеразной цепной реакции для определения bcr/abl мРНК при хроническом миелолейкозе человека // Генетика.-1994.-30, N12. -С.1636-1639.
25. Propp S., Lizzi F.A. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia // Blood.-1970.-36, N 2.-P.353-360.
26. Priest J.R., Robinson L., McKenna R.W., et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia // Blood.-1980.-56, N 1.-P.15-22.
27. Ayscue L.H., Ross D.W., Ozer H., et al Bcr/abl recombinant DNA analysis versus karyotype in the diagnosis and therapeutic monitoring of chronic myeloid leukemia // Amer. J. of Clinic. Pathol.-1990.-94, N 4.-P.404-409.
28. Kastner P., Perez A., Lutz Y., et al. Structure, Localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structure similarities with new family of oncoproteins // EMBO.J-1992.-11-P.629-612
29. Ericson J., Finger L., Sun L., et al Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias // Science.-1986.-232, N 4752.-P.884-886.
30. Tsujimoto Y., Gorhan J., Cossman J., et al The T(14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining // Science.-1985.-229, N 4720.-P.1390-1393.

31. Wasserman R., Galili N., Ito Y. et al. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia // *J Clin Oncol* 1992, V.10, P.1879-1888.
32. Guerrasio A., Martinelli G., Saglio G., et al. Minimal residual disease status in transplanted chronic myelogenous leukemia patients: low incidence of polymerase chain reaction positive cases among 48 long disease-free subjects who received unmanipulated allogeneic bone marrow transplants // *Leukemia* 1992 V.6, P.507-512.
33. Lo Coco F., Diverio D., Pandolfi P.P., et al. Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukemia // *Lancet* 1992, V.340, P.1437-1438.
34. Kantarjian H.M., O'Brien S., Andeireni P., Talpaz M. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigational options // *Blood*.- 1996.-V.87 ,N 8,P.3069-3081.
35. Szczylik C., Skorski, T., Nicolaides N.C. et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides // *Science*.-1991.-253,N5019,-P.562565.
36. Vaerma J.L., Lanninen C., Monreau P. BCR-ABL antisense oligodeoxyribonucleotides suppress the growth of leukemic and normal hematopoietic cells by a sequence specific but nonantisense mechanism. // *Blood*.1995.-V.87,N 10,-P.3891-3896 .
37. Yamagami T., Sugiyama H., Inoue K. et al. Growth inhibition of human leukemia cells by WT 1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT 1 in leukemogenesis. // *Blood* 1995.-V.87, N7,-P.2878-2884.
38. Pachuk C.J., Yoon K., Moelling K., Coney L.R. Selective cleavage of bcr/abl chimeric RNA by a ribozyme targeted to non contiguous sequences // *Nucl. Acids Res*.-1994.-V.22,N 3, -P.301-307.
39. Su Huang H.J., Yee J.K., Shew J.Y. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. // *Science*.-1988.-V.242.N.4885.-P.1563-1566.
40. Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Suchs L. et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6 // *Nature*.-1991,V.-352,N 6333.-P.345347.
41. Sorrentino B.P., Brandt S.J., Bodine D. et al. Selection of drug resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR 1. // *Science*.-1991.-V.253,N5019,-P.562-565.
42. Ohuang T., Xu X., Kaartinen V. et al. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. // *Proc, Natl. Acad. Sci. USA*.-1995.-V.92.N22.-P.10282-10286.
43. Woncken J.W., Kaartinen V., Pattengale P.X. et al. Bcr/Abl p210 and p190 cause distinct leukemia in transgenic mice. // *Blood*.-1995.-V.87.N12 -P.4603-4611.
44. The human leukemia oncogene Bcr/Abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. // *Mol. and Cellular Biol*.-1995.-V.15,N3.-P.1286-1293.
45. Corter D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structure and signaling requirement for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis // *Molecular and Cellular Biology*.-1995.-15, N 10. -P.5531-5541.

Ін-т молекуляр. біології та генетики НАН України,  
Київ,  
Ін-т гематології та переливання крові МОЗ України,  
Київ,

Надійшла 25.03.97