

EXPRESSION OF THE BCR/ABL ONCOGENE AND THE P53-INDUCED APOPTOSIS IN THE SUSPENSION CULTURES OF HEMATOPOIETIC PH⁺ CELLS OF THE CHRONIC MYELOGENEOUS LEUKEMIA

L.P. Gerasimova, T.E. Manakova, T.V. Akhlynina, T.V. Borovkova, E.A. Duchovenskaya, A.A. Krutov, S.S. Zbrovsky, A.V. Misyurin, G.P. Sarkisyan, T.I. Bulycheva, N.M. Nydenova, A.M. Timofeev, L.V. Bachmisova, A.G. Turkina, N.D. Khoroshko, V.F. Zarytova, A.S. Levina, N.I. Grineva

*Research Center for Hematology, RAMS, Moscow
Institute for Bioorganic Chemistry, SO RAS, Novosibirsk 630090, Russia
Corresponding author N.I. Grineva: Phone 7-095-214-5080. Fax: 7-095-212-4252,
e-mail: grineva@blood.ru*

ABSTRACT

Chronic myelogenous leukemia (CML) occurs and develops due to reciprocal chromosome translocation t(9, 22) that leads to arising Philadelphia chromosome (Ph⁺) with chimeric BCR/ABL oncogene in the hematopoietic stem cell. P210^{BCR/ABL} oncoprotein blocks Ph⁺ cell death at late steps of cell differentiation in the chronic phase of CML, modulates regulation of many genes expression and suppresses some p53 gene functions. Balance between dividing and dying Ph⁺ cells is disturbed, factor-dependent cells turn in to factor-independent Ph⁺ cells and the chronic phase of CML becomes really an accumulation step of genetic mutations and even sharp genome instability that leads to blast crisis of CML.

To find an approach to oligonucleotide gene therapy of CML we investigated some features of mechanism bone marrow and peripheral blood Ph⁺ cells death from patients in the chronic phase of CML under treatment with antisense oligonucleotides (AO) targeted BCR/ABL mRNA. We observed that AO inhibited BCR/ABL expression and induced p53-mediated apoptosis under simultaneous expression of the p53 and BCR/ABL genes in the Ph⁺ cells. (Ph⁺, p53⁻) and (Ph⁻, p53⁺) cells did not induce cell death. AO treatment caused mainly death of granulocytes and monocytes, e.g. matured Ph⁺ cells, that expressed p53 and BCR/ABL genes. Induction of Ph⁺ cells apoptosis correlated with p53 and BCR/ABL genes expression and inhibition of the BCR/ABL gene expression by AO.

ЭКСПРЕССИЯ ОНКОГЕНА BCR/ABL И P53-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ PH⁺ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

*Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.В. Ахлынина, Т.В. Боровкова, Е.А. Духовенская, А.А. Крутов, С.С. Зборовский, А.В. Мисюрин, Г.П. Саркисян, Т.И. Булычева, Н.М. Найденова, А.М. Тимофеев, Л.В. Бахмисова, А.Г. Туркина, Н.Д. Хорошко, В.Ф. Зарытова, А.С. Левина, Н.И. Гринева,
Гематологический научный центр РАМН, Москва
Новосибирский институт биоорганической химии, Новосибирск*

РЕЗЮМЕ

Возникновение и развитие хронического миелолейкоза (ХМЛ) обязано реципрокной хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11), протекающей с образованием Филадельфийской хромосомы (Ph⁺) в стволовой гемопоэтической клетке. Онкобелок p210^{BCR/ABL} блокирует гибель Ph⁺ клеток на последних стадиях дифференцировки в хронической фазе ХМЛ, модулирует регуляцию экспрессии многих генов и подавляет функции гена супрессора p53. В итоге нарушается баланс делящихся и погибающих клеток. Исчезает зависимость основных клеточных процессов от факторов роста и цитокинов. Ph⁺ клетки в хронической фазе ХМЛ фактически оказываются накопителями генетических повреждений, которые реализуются в течение иногда весьма длительного времени, приводя к прогрессии ХМЛ в бластный криз.

В поисках подходов к олигонуклеотидной терапии ХМЛ исследован механизм индукции гибели Ph^+ клеток костного мозга и периферической крови в суспензионных культурах от больных в хронической фазе ХМЛ антисмысловыми (антисенс) олигонуклеотидами (АО). Показано, что АО к мРНК BCR/ABL ингибируют экспрессию BCR/ABL онкогена в Ph^+ клетках ХФ ХМЛ и индуцируют в них р53-зависимый апоптоз при условии экспрессии в них BCR/ABL и р53 генов. В клетках (Ph^+ , р53⁺) или (Ph^+ , р53⁻) повышенной индукции апоптоза не обнаружено. Под действием АО из Ph^+ клеток гибнут в основном гранулоциты и моноциты, т.е. созревающие клетки, в которых активирована экспрессия р53 и BCR/ABL генов. Индукция апоптоза Ph^+ клеток коррелирует с экспрессией генов р53, BCR/ABL и ингибированием экспрессии последнего при действии АО.

Принятые сокращения: ХМЛ - хронический миелолейкоз; ХФ - хроническая фаза ХМЛ; КМ - костный мозг; ПК - периферическая кровь; АО - антисенс олигонуклеотиды; Ph^+ - клетки - клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому; БК - бластный криз.

Введение. Возникновение и развитие хронического миелолейкоза (ХМЛ) обязано реципрокной хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11), протекающей с образованием Филадельфийской хромосомы (Ph^+) в стволовой гемопоэтической клетке. В точке слияния 9 и 22 хромосом образуется химерный онкоген BCR/ABL (рис. 1), продукт которого онкобелок p210^{BCR/ABL} - активная тирозинкиназа без негативной регуляции является причиной клональной неопластической трансформации клеток, достаточной для развития хронической фазы ХМЛ (ХФ ХМЛ) и прогрессии в терминальную фазу - бластный криз (БК) [1-7]. Тирозинкиназа p210^{BCR/ABL} взаимодействует со многими белками [2, 3, 6, 8, 9] и меняет работу многих генов.

Активная экспрессия p210 в Ph^+ клетках стимулирует миелоидный росток гемопоэза и подавляет эритроидный, блокирует апоптоз на последних стадиях дифференцировки Ph^+ клеток [11-15]. В итоге нарушается баланс делящихся и погибающих клеток и накапливается опухолевый клон. Фактор-зависимые гемопоэтические клетки превращаются в фактор-независимые, т.е. нарушается регуляция пролиферации и апоптоза [11-16]. Прогрессия ХМЛ от ХФ в БК давно и широко исследуется: показано, что дифференцировка клеток блокируется на стадии бластов, повышается уровень экспрессии p210 в Ph^+ клетках, активируется BCL2 ген [2, 3, 6, 17]; ингибируется экспрессия белка C/EBP α - транскрипционного регулятора гранулоцитарной дифференцировки и блокируется экспрессия рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSFR [18]. Прогрессия ХМЛ характеризуется ярко выраженной генетической нестабильностью генома с накоплением хромосомных перестроек [2, 3, 6, 10, 16, 19].

Многочисленные модуляции экспрессии генов с активацией пролиферации, блокированием апоптоза, нестабильностью генома так или иначе, должны затрагивать функционирование генов-супрессоров опухолевого роста. Однако мутации не обязательны для модуляции функций р53. Многие вирусные онкогены блокируют функции генов-супрессоров без изменения их структуры, и это ведет к малигнизации [19]. Выяснению роли р53 в дифференцировке и злокачественной трансформации гемопоэтических клеток, в том числе Ph^+ клеток при ХМЛ и остром лимфолейкозе, посвящены многочисленные исследования [6, 10, 12-15, 20, 47]. Однако, вклад р53 в супрессию и индукцию апоп-

тоза в Ph^+ лейкозах далеко не ясен. Регулируемая гибель нормальных гемопоэтических клеток протекает по механизму апоптоза, при этом роль р53 очевидна, но лишь постулируется на основании корреляции уровня экспрессии и функций р53. Известно, что ингибирование экспрессии онкогена BCR/ABL в клеточных линиях под действием антисенс олигонуклеотидов (АО) ведет к индукции гибели клеток [21-25], но участие р53 в супрессии апоптоза и индукции гибели клеток не показано [6, 10, 12-15, 19]. В то же время приведенные изменения регуляции разных генов в Ph^+ клетках под действием p210^{BCR/ABL} без участия в них гена р53 - индуктора и супрессора транскрипции клеточного цикла, регулятора апоптоза и участника трансдукции многих сигнальных путей в клеточных процессах - кажутся необъяснимыми, несогласованными и обрывочными. Тот факт, что переход в БК ХМЛ сопровождается или определяется повышением генетической нестабильности, свидетельствует в первую очередь о выключении основных функций генов-супрессоров, в норме поддерживающих целостность генома включением апоптоза или ареста клеточного цикла. Если р53 действительно выключен уже на стадии ХФ ХМЛ, то под действием p210 создаются условия для дальнейшей генетической нестабильности Ph^+ клеток и ХФ ХМЛ оказывается «накопителем (инкубатором)» поврежденного генома.

На стадии ХФ ХМЛ мутации р53 встречаются не часто. Число случаев ХМЛ с мутациями в гене р53, даже на стадии БК, не превышает 30% [6, 19]. Поэтому ген р53 в большинстве случаев ХФ ХМЛ не мутирован и ингибирование экспрессии онкогена BCR/ABL и восстановление функций эндогенного р53 с индукцией гибели Ph^+ клеток - это возможный путь их элиминирования из КМ при ХФ ХМЛ [25-28].

Специфическая, эффективная индукция апоптоза опухолевых клеток как путь восстановления функций генов супрессоров представляется общим подходом к терапии многих онкозаболеваний. Одним из успешно реализованных современных подходов к терапии Ph^+ лейкозов является новый метод ингибирования тирозинкиназы с помощью препарата STI571. STI571 - производное аденозинтрифосфата, которое блокирует фосфорилирование тирозинкиназами многих важнейших белков. STI571 связывается с активным центром ферментов необратимо и ингибирует тирозинкиназы p210 и p190, что приводит Ph^+ клетки к апоптозу [60-62].

Однако поиски новых более специфичных путей индукции апоптоза остаются актуальными, т.к. с ингибированием других клеточных тирозинкиназ возникают непростые осложнения и часто обнаруживается резистентность к препарату [60, 63].

Цель данной работы заключалась в выяснении основных черт механизма индукции гибели Ph⁺ клеток костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) от больных в ХФ ХМЛ под действием антисмысловых (антисенс) олигонуклеотидов (АО). Это исследование представляется нам необходимым этапом в поисках подходов к олигонуклеотидной генотерапии ХМЛ.

В работах последних лет показана супрессия гибели Ph⁺-клеток под действием белка p210 и способность антисенс олигонуклеотидов к BCR/ABL индуцировать гибель Ph⁺-клеток в клеточных линиях, где BCR/ABL экспрессируется постоянно [5, 18, 21-25]. Сообщения о гибели Ph⁺-клеток от больных ХМЛ в системе *in vivo* касаются в основном БК ХМЛ и весьма противоречивы [21-28]. Тем не менее в США и Италии исследовали действие АО к BCR/ABL для элиминирования Ph⁺-клеток из КМ для последующей его трансплантации. Пациентам в БК ХМЛ без заметных успехов было проведено несколько аутологичных пересадок костного мозга, очищенного многократной обработкой АО. Исследования на мышах с иммунодефицитом, которым вводили обработанный АО и необработанный КМ человека с ХМЛ, обнаружили двухмесячное увеличение жизни по сравнению с введением КМ, необработанного АО реагентом [25-28].

Нам удалось получить подтверждение высказанной идее о восстановлении функций эндогенного p53 под действием АО в Ph⁺-клетках ХФ ХМЛ. Оказалось, что индукция гибели Ph⁺-клеток при действии АО BCR/ABL протекает по механизму p53-зависимого апоптоза при одновременной экспрессии генов p53 и BCR/ABL, что индукция апоптоза коррелирует с ингибированием экспрессии BCR/ABL и активацией p53 и что эти процессы в Ph⁺-клетках протекают предпочтительнее в созревающих и зрелых клетках.

Материалы и методы. Применяемые олигонуклеотиды (табл.1) синтезировали нуклеозидфосфитамидным или фосфотриэфирным методами, как указано в [29, 45].

Клетки K562, имеющие (Ph⁺, p53⁻) генотип, получены из коллекции Института Цитологии РАН, С.-Петербург. Клетки и клеточные линии характеризовали и применяли согласно [29, 45]. (Ph⁺, p53⁺) мононуклеары выделены из КМ и ПК от здоровых доноров центрифугированием в градиенте фикола с плотностью 1.077 г/см³. (Ph⁺, p53⁺) клетки КМ и ПК изолированы аналогично от пациентов в ХФ ХМЛ до лечения. В результате получали фракцию, обогащенную предшественниками и мононуклеарами, содержащую бласты, лимфоциты и моноциты. Гранулоциты КМ и ПК при ХМЛ, в основном незрелые, имеют близкую плотность и не отделяются от мононуклеаров. Морфологический состав клеток анализировали на мазках окрашиванием с красителем Гимзой [19, 59].

Суспензионные культуры получали на основе мононуклеаров КМ и ПК, обрабатывали АО в присутствии факторов сыворотки или с кратковременным удалением последней согласно [29, 45].

Перед обработкой АО 2x10⁷ клеток выращивали в α-МЕМ среде с 20% FCS, 2 mM L-глутамина, 10⁻⁴ M 2-меркаптоэтанола, 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина, 25 mM HEPES-NaOH, pH 7,2-7,4 в 25 см² пластиковом матрасе (Flow) в течение 3 суток. Затем непрекрепившиеся клетки инкубировали с 0,5-12 мкМ АО или без АО в 96-ячеечных платах (2x10⁵ клеток/ячейку) при 37 °C с 5% CO₂ в воздухе в течение 2 часов без FCS. Затем FCS добавляли до 20% и смесь инкубировали 4-7 суток. Каждая точка выполнялась трижды. В отбираемых пробах анализировали число живых и погибших клеток по окрашиванию с трипановым синим, содержание CD95⁺ и p53⁺ клеток, тип фрагментации ДНК и транскрипцию генов BCR/ABL, p53, β-актина и GAPDH.

Фракции клеток, содержащих CD95⁺ и p53⁺ белки, определяли в клеточных мазках до и после обработки АО. Мазки инкубировали с моноклональными антителами против CD95 и p53 (Dako, Denmark) и промывали трис-буфером, pH 7,6, затем последовательно инкубировали в тех же условиях с антимишиным иммуноглобулином кролика и мышинным АРААР комплексом (Dako, Denmark). Активность фермента определяли обработкой мазков раствором субстрата, содержаще-

Таблица 1
Антисенс олигонуклеотиды, комплементарные мРНК BCR/ABL

Символ	Мишень	Последователь
SN26	b2a2	CGCTGAAGGGCTT
1.4.1	b3a2	TGAAGGGCTTT
1.4.2	b3a2	TGAAGGGCTTT
2.4.1	b2b3	GAATCATCATC
2.4.2	b2b3	GAATCATCATC
Trans1	bcr, e1	CGGGTCCACCA
D3	bcr3	CAGTGGCTGAGT
ES1	e1	ATGGAAGGGGA
ES2	e1	GCCCTTGCCCT
C24	—	CCAAAATGTC

as - антисенс; s – сенс; thio – олигонуклеотид тиофосфаты; random – случайная последовательность.

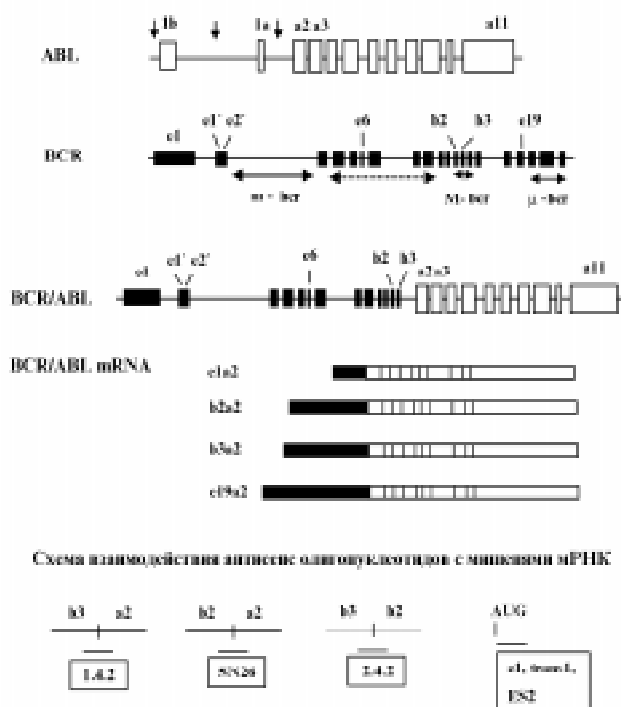


Рис. 1. Схема организации генов ABL, BCR и BCR/ABL. Точки разрыва указаны стрелками. J. V. Melo. Blood (1996) 88:2375-2384

го нафтол-AS-MX-фосфат, FAST Red TR соль и левамизол [59].

ДНК фрагментация исследовалась согласно [45]. Методика RT-PCR анализа и праймеры для него приведены в [45].

Электропорацию клеток K562 (6×10^6) проводили по [65] в экспоненциальной фазе роста в 0,7 мл среды DMEM без сыворотки при 4°C с $26,7 \text{ нМ}$ ^3H -олигонуклеотидом в кювете с 0,4 см расстоянием между электродами в аппарате Gene Pulser Transfection Apparatus с блоком Capacitance Extender (BIO RAD, США) одним импульсом в $960 \mu\text{F}$, 250 V , $2 \times 10^{-4} \text{ с}$. Олигонуклеотид (17-членник) метили [$2,8$] ^3H α АТФ (29 кюри/ммоль, Нуклон, Россия) с помощью терминальной нуклеотидилтрансферазы (Promega, США) в условиях поставщика.

Увеличение проникновения олигонуклеотида в

клетки через 2 часа после электропорации составило 9-32%. При этом электропорация полностью блокирует транскрипцию в клетках даже «housekeeping» генов и существенно увеличивает неспецифическую гибель клеток (более 50%). Жизнеспособность клеток и транскрипция восстанавливаются через 3-5 суток до уровня таковых без электропорации, т.е. именно в тот интервал времени, в котором протекают исследуемые процессы ингибирования экспрессии и индукции апоптоза под действием АО (1-5 суток).

Результаты и обсуждение. Можно предположить, что если блокирование гибели Ph^+ клеток опосредованно супрессией функций p53 онкобелком p210 [6, 10, 12-15], то ингибирование экспрессии онкогена BCR/ABL должно индуцировать гибель клеток по механизму p53-индуцируемого апоптоза только в тех клетках, где одновременно экспрессируются p53 и BCR/ABL гены. Для проверки этой гипотезы АО для ингибирования экспрессии онкогена BCR/ABL были выбраны согласно рис.1, где приведена схема организации генов BCR/ABL и мРНК BCR/ABL, образующихся при транслокации и, затем, при сплайсинге пре-мРНК, а также выбор последовательностей мРНК-мишеней, узнаваемых используемыми АО. Это сайт инициации трансляции и районы слияния экзонов b2a2, b3a2, b3b2, образующихся в результате сплайсинга. При ХМЛ образуются несколько мРНК BCR/ABL: b3a2, b2a2, e1a2 и другие в зависимости от характера транслокации, но для ХМЛ наиболее характерны первые два [1-6, 10].

Для исследования гибели Ph^+ клеток КМ и ПК ХФ ХМЛ мы применяли АО, приведенные в табл.1. Исследовали экспрессию генов p53 и BCR/ABL и динамику действия АО на выживаемость и индукцию гибели клеток, различающихся экспрессией p53 и BCR/ABL генов: мононуклеаров КМ и ПК доноров, т.е. (Ph^+ , p53 $^+$)-клетки, где есть экспрессия гена p53, но нет генов BCR/ABL и клетки линии K562 (Ph^+ , p53 $^-$), где есть BCR/ABL мРНК, но нет экспрессии гена p53; данные сравнивали с результатами получаемыми на (Ph^+ , p53 $^+$)-клетках из КМ и ПК ХФ ХМЛ, где экспрессируются оба гена. На рис.2 приведен RT PCR анализ, подтверждающий экспрессию исследуемых генов или ее отсутствие в мононуклеарах КМ доноров, клетках K562, а также КМ и ПК двух больных в ХФ ХМЛ.

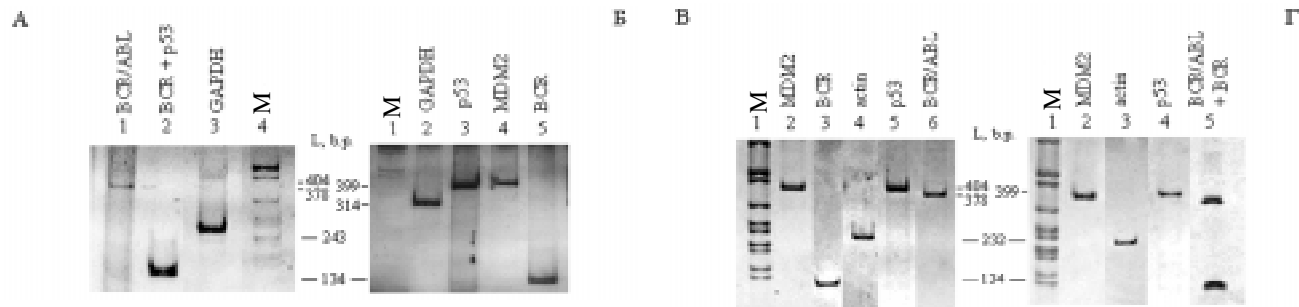


Рис. 2. Анализ экспрессии генов в суммарной РНК с помощью RT-PCR

А - клетки K562 с b3a2 мРНК Б - мононуклеары донора; В, Г - Ph^+ мононуклеары периферической крови Б-ной (b3a2) и костного мозга С-вой (b2a2) в хронической фазе ХМЛ. М - маркер лДНК/PST1

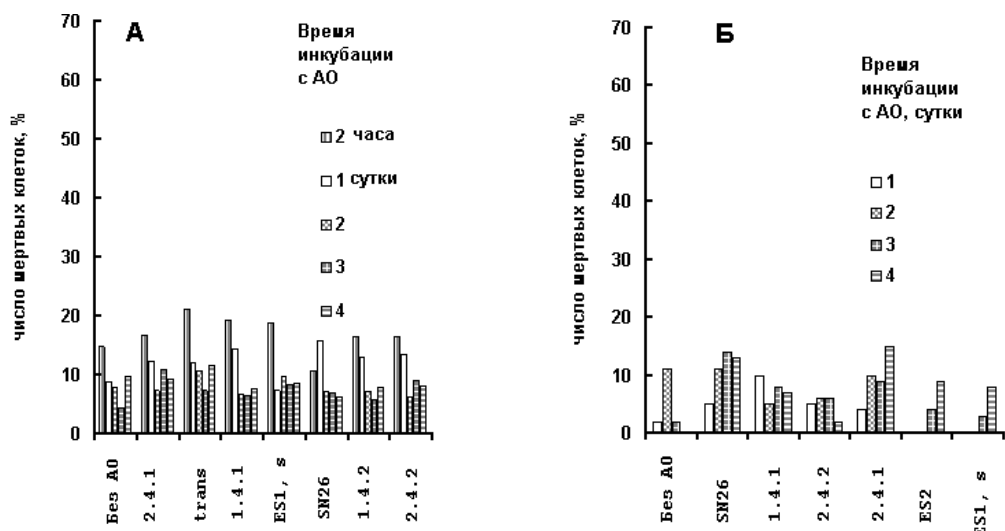


Рис. 3. Динамика гибели гемопоэтических клеток под действием антисмысловых олигонуклеотидов. А - клетки K562 (Ph+, p53-); Б - суспензионная культура мононуклеаров (Ph-, p53+) костного мозга здоровых доноров. Символы АО расшифрованы в табл.1.

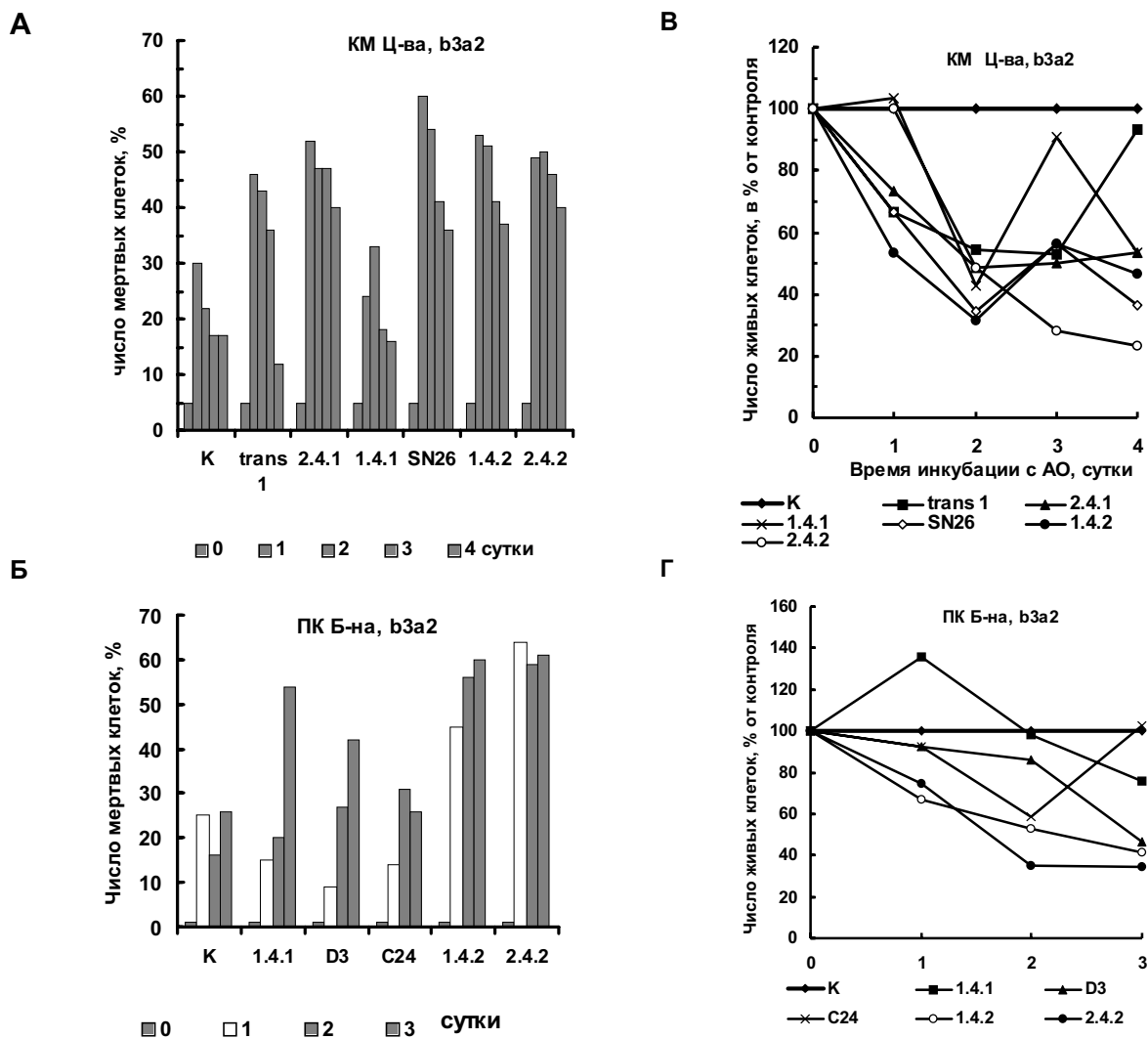


Рис. 4. Динамика гибели (А,Б) и торможения пролиферации (В,Г) Ph+/p53+ мононуклеаров костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) от больных ХМЛ в хронической фазе под действием антисмысловых олигонуклеотидов. К - контроль без АО. Символы АО расшифрованы в табл.1.

На рис.3 представлена динамика гибели этих клеток под действием ряда АО. Видно, что в системе (Ph^+ , $p53^+$) мононуклеаров КМ и ПК доноров и клеток линии K562 гибель не отличается от контрольной инкубации без АО и в присутствии олигонуклеотидов, некомплементарных к мишени мРНК BCR/ABL (олигонуклеотидов с последовательностью сенс или случайной - рэндом). Обработка антисенс олигонуклеотидами (Ph^+ , $p53^+$) клеток КМ и ПК в ХФ ХМЛ увеличивала их гибель в 2-3 раза по сравнению с контролем без АО (рис.4 А, Б и 6А).

Согласно данным электрофореза ДНК Ph^+ клеток (рис.5), инкубированных с АО в течение 72 часов, содержит фрагменты, характерные для лестницы олигонуклеосомного расщепления, что однозначно указывает на апоптоз. При этом в контроле без АО гибель 23% Ph^+ клеток также происходит в результате апоптоза. После трех суток инкубации клеток КМ данного больного с тремя разными АО гибель возрастает до 34-40%, свидетельствуя о возрастании специфического действия АО на Ph^+ клетки (рис.5, 6Б)

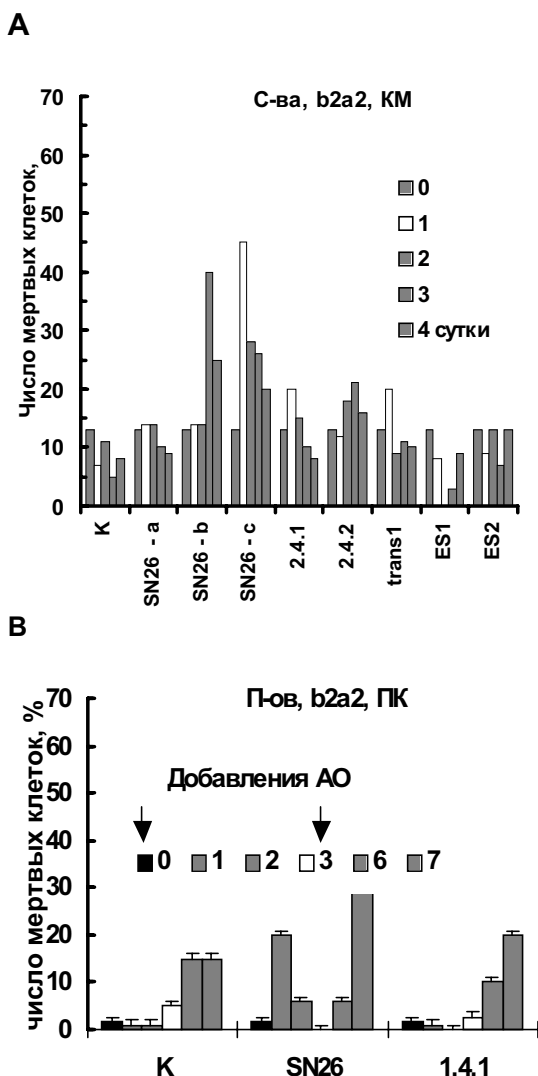


Рис. 6. Динамика гибели гемопоэтических Ph^+ мононуклеаров ХФ ХМЛ, различающихся экспрессией BCR/ABL и $p53$ генов, при инкубации с антисенс олигонуклеотидами (АО). Символы АО расшифрованы в табл.1.

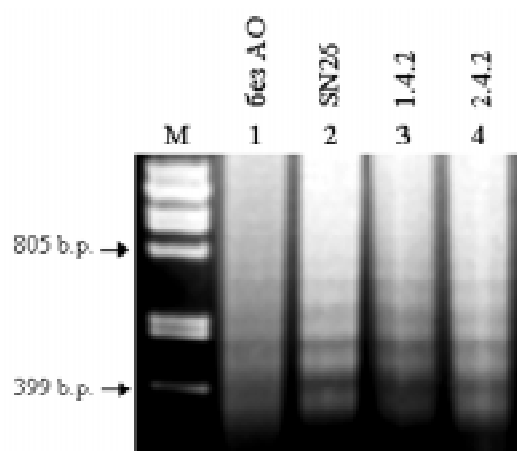
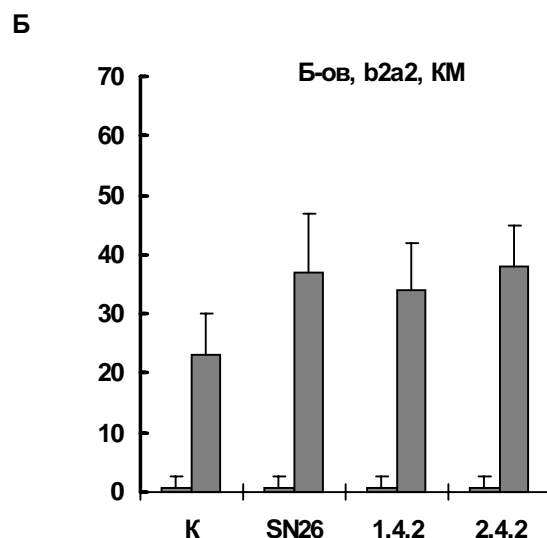


Рис. 5. Олигонуклеосомная фрагментация ДНК Ph^+ клеток после 3 суток инкубации с АО (2, 3, 4) и без АО (1). Пациент Б-в (b2a2 мРНК). Символы АО расшифрованы в табл.1.



Ингибирование транскрипции BCR/ABL онкогена под действием АО, как видно из рис.7 А,Б протекает эффективно и активирует экспрессию $p53$. В этих клетках экспрессия $p53$ и BCR/ABL генов либо присутствует заранее (рис.2В), либо появляется при инкубации с АО со временем (рис.7В). Именно в этих клетках эффективно индуцируется апоптоз (рис.4 и 6А).

В Ph^+ клетках, в которых до обработки АО наблюдается экспрессия $p53$, действие АО, вероятно, дополнительно увеличивает уровень $p53$ мРНК и белка, что ведет к повышению эффективности апоптоза (рис.6А, Б)

В клетках КМ больного Б-ва видна слабая экспрессия $p53$ мРНК (рис.7В) при содержании $p53$ белка в 3-7% клеток, но отсутствует BCR/ABL экспрессия (6-тичасовая инкубация) как в контроле, так и при действии АО. Через 72 часа возрастает уровень $p53$ и BCR/ABL мРНК (рис.7В) и доля погибших клеток (рис.6Б). Также возрастает фракция клеток, содержащих белок $p53$. За это время АО, вероятно, истощаются, и уро-

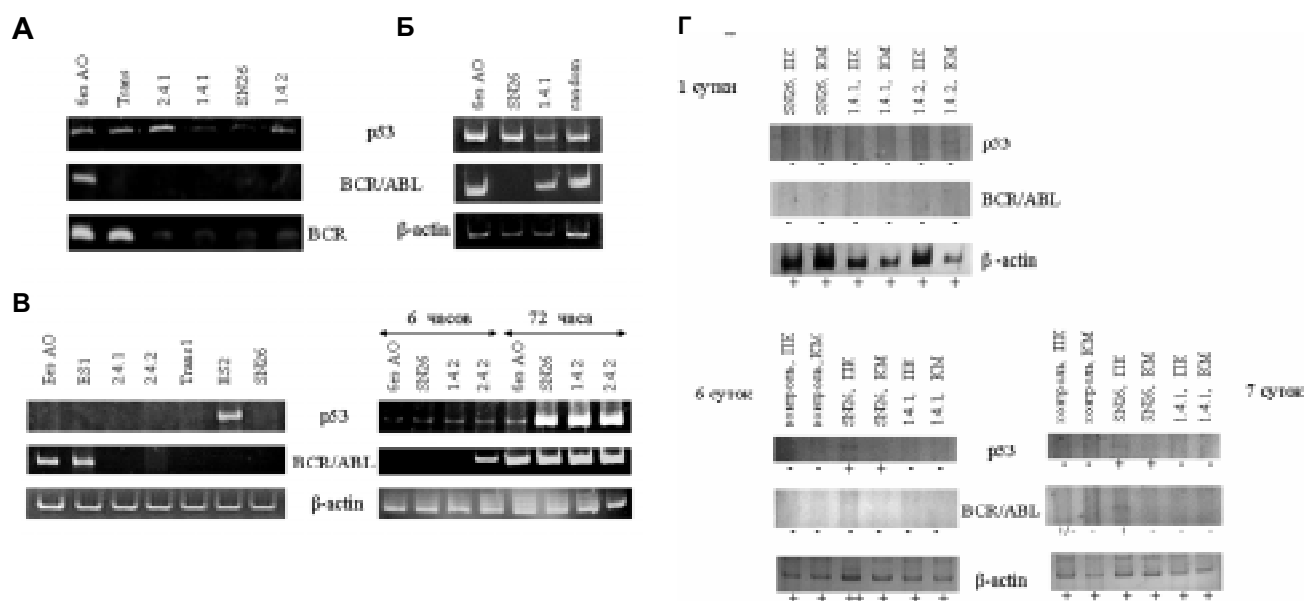


Рис. 7. Модуляция экспрессии мРНК BCR/ABL и p53 генов в Ph⁺ клетках костного мозга и периферической крови ХФ ХМЛ при действии АО.

А, Б - клетки с активной экспрессией BCR/ABL и p53

В, Г, - клетки с пониженной или отсутствующей экспрессией BCR/ABL или p53

А (костный мозг, пациент Ц-ва, b3a2, инкубация 24 ч

Б - периферическая кровь, пациент Б-ва, b3a2, инкубация 24 ч

В (костный мозг, пациент Б-в, b2a2, инкубация 6 ч и 72 ч

Г (костный мозг (КМ) и периферическая кровь (ПК), пациент П-в, b2a2, инкубация 1, 6 и 7 суток. Символы АО расшифрованы в табл.1.

вень мРНК BCR/ABL растет, хотя часть ее еще ингибируется АО. При этом уровень мРНК p53 все же возрастает (рис.7В), как и гибель клеток (рис.6Б)

В клетках (Ph⁺, p53⁺) под действием АО мы также наблюдали торможение пролиферации (рис.4), что согласуется с данными других исследований [21-28]. Торможение пролиферации определяется не только апоптозом, но и остановкой клеточного цикла на стадии G₁/S. Их соотношение зависит от вида АО и среды (рис.4).

У некоторых больных в ХФ ХМЛ экспрессия BCR/ABL и p53 генов не наблюдается или наблюдается на очень низком уровне (рис.7 В,Г). Действие АО на такие Ph⁺ клетки не индуцирует их гибель (рис.6В), как и в случае (Ph⁻, p53⁺) или (Ph⁺, p53⁻) клеток (рис.3). Апоптоз в Ph⁺ клетках КМ больного П-ва практически не индуцируется при инкубации с разными АО в течение 7 суток, даже при повторном добавлении АО, т.е. апоптоз не индуцируется также, как в клетках (Ph⁻, p53⁺) или (Ph⁺, p53⁻) фенотипа. Нет мРНК BCR/ABL, т.е. нет мишени для АО, нет эффекта ингибирования и нет индукции гибели клеток. В клетках КМ и ПК экспрессия BCR/ABL оказалась незначительной или вовсе подавленной у половины из 26 исследованных больных.

Таким образом, при обработке Ph⁺ клеток АО индуцируется p53-опосредованный апоптоз при условии экспрессии в Ph⁺ клетках p53 и BCR/ABL генов и индукция апоптоза наблюдается в клетках (Ph⁺, p53⁺), но отсутствует в клетках (Ph⁻, p53⁺) и (Ph⁺, p53⁻) фенотипа (рис.4, 6, 7).

При апоптозе Ph⁺-клеток КМ и ПК при ХФ ХМЛ, индуцируемом АО, прослеживается изменение морфологического состава клеток (табл.2). Известно, что при

ХМЛ увеличивается содержание миелоидных клеток в КМ и ПК [1-3, 6]. Как и следовало ожидать, при обработке АО падает содержание гранулоцитов, моноцитов (в 2-10 раз) и, в меньшей степени, бластов (табл.2) Содержание лимфоцитов возрастает (Т-лимфоциты как будто не содержат Ph-хромосомы) [2, 3, 6-13]. Наибольшее уменьшение доли созревающих клеток связано, вероятно, с эффективной экспрессией в них BCR/ABL мРНК-мишени для АО и поэтому наиболее эффективным ингибированием мишени и индукцией апоптоза. Что касается бластов, то в этих наименее зрелых клетках BCR/ABL и/или p53 гены скорее всего не экспрессируются. Отметим, что наблюдаемая тенденция увеличения содержания лимфоцитов согласуется с таким же явлением при химиотерапии ХМЛ и выходе в ремиссию [2, 3, 6].

Действие АО обычно заключается в разрушении мРНК BCR/ABL (РНК-мишени), аресте ее трансляции или конкурентном ингибировании взаимодействующих с той же мишенью клеточных белков [44, 58]. Все эти процессы прекращаются по истощении АО и клетки восстанавливают подавленные функции, если они не критичны для жизни клетки [58]. Индукция апоптоза при ингибировании экспрессии BCR/ABL превращает действие АО в необратимый процесс и открывает возможный путь элиминирования Ph⁺ клеток при ХФ ХМЛ, возможно более щадящий, чем действие STI571 [60-63].

Согласно [6-14, 19] белок p210BCR/ABL блокирует гибель клеток, взаимодействуя с p53 или его комплексами с другими белками. Наши результаты подтверждают известный факт гибели Ph⁺ клеток при обработ-

ке АО^{BCR/ABL}. Кроме того, наши данные показывают, что под действием АО^{BCR/ABL} Ph⁺ клетки погибают по механизму p53 индуцируемого апоптоза только в (Ph⁺, p53⁺)-клетках при обязательной активации транскрипции гена p53. При этом наблюдается корреляция между активацией транскрипции гена p53, ингибированием мРНК^{BCR/ABL} под действием АО мРНК^{BCR/ABL} и индукцией апоптоза. Очевидно, восстановление функционирования p53 гена в Ph⁺ клетках под действием АО должно предшествовать или совпадать с индукцией апоптоза.

Особенностью наблюдаемых здесь под действием АО процессов является восстановление функционирования эндогенного p53 как индуктора апоптоза. Индукция апоптоза под действием АО связана, вероятно, с повышением уровня p53 в результате экспрессии p53 de novo и усилением его роли в качестве регулятора апоптоза и регулятора транскрипции. Предполагается, что в результате синтеза p53 de novo доля участия p53 в реакциях с его естественными генами-мишенями увеличивается и реализуется в активации основных функций p53: регуляции транскрипции генов-мишеней, регуляции клеточного цикла с задержкой в G/S фазе цикла и апоптоза. Блокирование экспрессии BCR/ABL, вероятно, также нормализует функции C/EPB α белка и регуляцию экспрессии рецептора G-CSF [18], что приводит к восстановлению зависимости апоптоза и пролиферации обработанных АО Ph⁺ клеток от изменения факторов роста в среде. Пока нет оснований предполагать, что подавление экспрессии BCR/ABL активирует транскрипцию p53. Скорее всего, активация транскрипции p53 определяется стадией дифференцировки Ph⁺ клеток. Механизм активации p53, вероятно, заключается в том, что часть вновь синтезированного p53 в условиях подавления экспрессии BCR/ABL расходуется на взаимодействие с обычными для p53 мишенями при выполнении его многочисленных функций в клетке.

Линия K562 - эритробластные клетки из клеток бластного криза хронического эритромиелоза. В клетках утерян один аллель p53, а во втором - p53 мутирован; из рис.2А видно что кДНК K562 не дает амплификата в 404 б.р., характерного для полноценной мРНК p53. Известно, что многие цитостатики также не активируют гибель K562 [20]. Попытки введения в K562 экзогенного p53 дикого типа (wtp53) в составе генно-инженерных конструкторов приводили к быстрой гибели клеток и остановке клеточного цикла, торможению пролиферации. Введение экзогенного ts мутантного p53 подтверждало способность полученных трансфектантов гибнуть при перmissive температуре (32°C) [36-39, 41-43]. Это вполне согласуется с наблюдаемым

нами отсутствием гибели клеток K562 под действием АО [29-32]. В мононуклеарах доноров в отсутствии мРНК BCR/ABL-мишени АО не индуцируют гибели клеток, не влияют на экспрессию p53 и практически не токсичны для гемопоэтических клеток.

Как известно, гибель гемопоэтических клеток в норме протекает также по механизму p53-зависимого апоптоза [34, 35]. В Ph⁺ клетках фактор-зависимая регуляция блокируется при экспрессии BCR/ABL онкогена и при этом опосредуется BCL2 белком (естественным ингибитором апоптоза). Клетки с экспрессией BCL2 в отсутствие экспрессии BCR/ABL сохраняют способность к апоптозу и фактор-зависимой регуляции пролиферации [5, 13, 17]. Явление апоптоза в среде с истощением факторов, вероятно, характерно для Ph⁺ клеток, не экспрессирующих BCR/ABL, но экспрессирующих p53 [5, 11, 13, 21, 39].

Регуляция функций p53, как известно, весьма сложна [13, 19, 46, 47, 51, 52, 55-57]. Обычно она исследуется на пост-транскрипционном уровне p53 в сочетании с анализом его конформаций и взаимодействий со многими регуляторными белками. Однако восстановление заблокированных функций p53 скорее всего нуждается в транскрипции гена de novo. Новая активация транскрипции p53 необходима для регуляции апоптоза и транскрипции других генов, т.к. нестабильный p53 (t1/2 ~5-40 мин. самого p53 и ~6 час в комплексах с другими белками [19, 52-54, 56]) не может сохраниться и освободиться интактным из комплекса с p21^{0BCR/ABL}, особенно в конформации wt p53, которая необходима для его функционирования [13, 39]. Показано, что суперэкспрессия p53 белка возникает при суперэкспрессии мРНК [46]. Появление эндогенного p53 de novo, вероятно, необходимо для восстановления функционирования p53. Ранее показано, что ген p53 не экспрессируется в некоторых ранних клетках-предшественниках. Экспрессия начинается на более поздних стадиях дифференцировки [12-13, 39].

Из совокупности полученных результатов следует, что ген-супрессор опухолевого роста p53 опосредует супрессию апоптоза онкобелком p21^{0BCR/ABL} и индукцию апоптоза при ингибировании экспрессии BCR/ABL онкогена антисенс олигонуклеотидами. Ингибирование экспрессии онкогена BCR/ABL ведет к индукции гибели только клеток, экспрессирующих BCR/ABL и эндогенный p53. Ph⁺ клетки при этом гибнут по механизму p53-опосредованного апоптоза.

Ph⁺-клетки ХФ ХМЛ содержат значительное количество зрелых клеток. Эти клетки неоднородны не только морфологически. Они представлены также клетками, экспрессирующими BCR/ABL и не экспрессирующими

Таблица 2

Состав Ph⁺ клеток периферической крови в суспензионной культуре после инкубации с антисмысловыми олигонуклеотидами (АО) в течение 3 суток. Пациент Б-на (b3a2, ХФ ХМЛ)

Тип АО	Доля погибших клеток, %	Морфо	
		бласты	гранулоциты
Без АО	26	7	21
1.4.2, b3a2	60	9	5
2.4.2, b2b3	61	5	2
2.4.1, b2b3	53	3	8

щими его. Последние остаются фактор-зависимыми, и поэтому подчиняются закономерностям регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза как и нормальные гемопоэтические клетки. При культивировании на бедной среде происходит их быстрая гибель. За 4 часа в среде без сыворотки гибнет основная часть Ph⁺ клеток КМ некоторых больных и мало меняется у других. Доля гибели Ph⁺ клеток, вероятно, соответствует доле клеток, не экспрессирующих BCR/ABL. По этой величине можно, вероятно, судить о характере ХФ ХМЛ более тонко, чем по содержанию бластов. Повышение содержания Ph⁺ бластов - это уже остановка дифференцировки, а экспрессирующие BCR/ABL клетки - это фракция клеток, готовых к мутациям, т.к. в них подавлен p53. В этих клетках p53 молчит, даже если поступил сигнал о необходимости репарации мутаций или индукции апоптоза.

Можно заметить, что индукция апоптоза оказывается весьма чувствительным методом выявления эффекта АО. По индукции гибели Ph⁺ клеток выявлялось не только разрушение мРНК BCR/ABL, но ингибирование трансляции и конкурентное ингибирование АО с белками за связывание РНК-мишени в Ph⁺ клетках [31-33].

Совокупность результатов свидетельствует о корреляции между активацией экспрессии BCR/ABL онкогена, его ингибированием, активацией экспрессии p53 и индукции апоптоза в Ph⁺ -клетках в ХФ ХМЛ при их инкубации с антисенс олигонуклеотидами. При этом в присутствии АО в среде без факторов роста апоптозу подвергается в 2-3 раза больше клеток, чем без АО. Возможно, это все Ph⁺ -клетки, экспрессирующие BCR/ABL онкоген.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heisterkamp N., Stam K., Groffen J. et al. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph⁺ translocation. //Nature, 1985, 315, P. 758-761.
2. Melo J.V. The diversity of the ABL-BCR fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. // Blood, 1996, 88, P. 2375-2384.
3. Carella A.M., Frassoni F., Melo J. et al. New insights in biology and current therapeutic options for patients with chronic myelogenous leukemia. //Haematologica, 1997, 82, P. 478-495.
4. Daley G.Q., van Etten R.A., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. //Science, 1990, 247, P. 824-830.
5. Era T., Witte O.N. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, P. 1737-1742.
6. Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. //Leukemia, 1996, 10, P. 751-756.
7. Kelliner M.A., McLaughlin J., Witte O.N., et al. Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-Like Syndrome in Mice With V-abl and BCR/ABL. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, P. 6649-6653.
8. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J. et al. Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. //Science, 1990, 247, P. 1079-1082.
9. Dhut S., Chaplin T., Young B.D. BCR-ABL and BCR proteins: biochemical characterization and localization. //Leukemia, 1990, 4, P. 745-750.
10. Bedi A., Zehnbauser B.A., Barber J.P. et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. //Blood, 1994, 83, P. 2038-2044.
11. Jonuleit T., Peschel C., Schwab R. et al. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. //Br. J. Haematol., 1998, 100, P. 295-303.
12. Bi S., Lanza F., Goldman J.M. The involvement of «tumor suppressor» p53 in normal and chronic myelogenous leukemia hemopoiesis. //Cancer Res., 1994, 54, P. 582-586.
13. Lotem J., Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. //Leukemia, 1996, 10, P. 925-931.
14. Cotter T.G. BCR/ABL: an anti-apoptosis gene in chronic myelogenous leukemia. //Leukemia and lymphoma, 1995, 18, P. 231-236.
15. Zhu, J., Nabissa, P.M., Hoffman, B. et al. Activated abl oncogenes and apoptosis: differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines. //Blood, 1996, 87, P. 4368-4375.
16. Lin Y., Benchimol S. Cytokines inhibit p53- mediated apoptosis but not p53- mediated G1 arrest. //Mol. Cel. Biol., 1995, 15, P. 6045-6054.
17. Sanchez-Garsia, I., Grutz G. Tumorigenic Activity of the BCR-ABL Oncogenes is Mediated by BCL2. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, P. 5287-5291.
18. Perrotti D., Cesi V., Trotta R. et al. BCR-ABL suppresses C/EBP(expression through inhibitory action of hnRNP E2. // Nature genetics, 2002, 30, P. 48-58.
19. Oncogenes and Tumour Suppressors. Peters G., Vousden K.H., eds. JRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 1997.
20. Trepel M., Scheding S., Groscurth P. et al. A new look at the role of p53 in leukemia cell sensitivity to chemotherapy. // Leukemia, 1997, 11, P. 1842-1849.
21. Smetsers T.F., Skorski T., van de Locht L.T. et al. Antisense BCR-ABL oligonucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome-positive cell line BV173. // Leukemia, 1994, 8, P. 129-140.
22. Skorski T., Nieborowska-Skorska M., Wlodarski P. et al. Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, P. 13137-13142.
23. Smetsers T.F., Linders E.H., van de Locht L.T., et al. An antisense Bcr-Abl phosphodiester-tailed methylphosphonate oligonucleotide reduces the growth of chronic myeloid leukaemia patient cells by a non-antisense mechanism. //Br. J. Haematol., 1997, 96, P. 377-381.
24. de Fabritiis P., Skorski T., De Propriis M.S. et al. Effect of bcr-abl oligodeoxynucleotides on the clonogenic growth of chronic myelogenous leukaemia cells. //Leukemia, 1997, 11, P. 811-819.
25. Skorski T., Nieborowska-Skorski M., Nicolaidis N.C. et al. Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by BCR/ABL antisense oligodeoxynucleotide. // Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91, P. 4504-4508.
26. Skorski T., Nieborowska-Skorski M., Wlodarski P. et al. Antisense oligodeoxynucleotide combination therapy of primary chronic myelogenous leukemia blast crisis in SCID mice. //Blood, 1996, 88, P. 1005-1012.
27. de Fabritiis P., Amadori S., Petti M.C. et al. In vitro purging with BCR/ABL antisense oligodeoxynucleotides does not prevent haematologic reconstitution after autologous bone marrow transplantation. //Leukemia, 1995, 9, P. 662-664.
28. de Fabritiis P., Petti M.C., Montefusco E, et al. BCR/ABL antisense oligodeoxynucleotides in vitro purging and autologous bone marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukaemia in advanced phase. // Blood, 1998, 91, P. 3156-3162
29. Гринева Н.И., Манакова Т.Е., Герасимова Л.П. и др. Индукция гибели опухолевых клеток при действии антисмысловых олигонуклеотидов на клетки костного мозга и периферической крови в суспензионных культурах как

- подход к генотерапии хронического миелолейкоза. // Российский химический журнал, «Современные методы диагностики и лечения онкологических заболеваний», 1998, XLII, № 5, С. 163-175.
30. *Gerasimova L., Manakova T., Misurin A., et al.* Specific BCR/ABL+ cell death in the suspension cultures of bone marrow and peripheral blood of chronic myelogenous leukaemia patients by antisense oligonucleotides treatment. 11th symposium on molecular biology of hematopoiesis, //Acta Hematologica, 1998, 100, P. 43.
 31. *Akhlynina T., Zborovsky S., Gerasimova L., et al.* BCR/ABL targeted antisense nucleotides in the research of p53-induced apoptosis of Ph-positive cells from bone marrow and peripheral blood of chronic myelogenous leukemia patients. // In: Trends in nucleic acid chemistry, International conference abstracts, XI, 2000, Moscow, P. 49, P. 51, P. 70.
 32. *Akhlynina T., Gerasimova L., Manakova T., et al.* A Role of Genetic Peculiarities of Mononuclear Cells Containing BCR/ABL Oncogene (Ph+-Cells) for Induction of Cell Death by Treating with Antisense Oligonucleotides. // Millennium Conference on Nucleic Acid Therapeutics, 2000, Clearwater Beach, Florida, USA, P. 32, P. 42, P. 47,.
 33. *Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е. и др.* Подход к олигонуклеотидной терапии хронического миелолейкоза. Генетические особенности мононуклеаров костного мозга и периферической крови, содержащих онкоген BCR/ABL (Ph+-клетки), в индукции гибели опухолевых клеток антисмысловыми олигонуклеотидами. // 2 (4) Российский съезд медицинских генетиков, Курск, 2000, тезисы, С. 93-94, С. 264-265.
 34. *Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П. и др.* Индукция гибели Ph+ клеток и активация транскрипции гена супрессора p53 под действием антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на МРНК онкогена BCR/ABL. // В сб.»Геном человека», 2000, С. 141-142, 2001, С. 59-60, 2002, С. 62-64.
 35. *Grineva N.I., Akhlynina T.V., Zborovsky S.S., et al.* BCR/ABL antisense oligonucleotides alter expression of the genes regulating apoptosis of human Ph+ cells. // In «RNA as therapeutic and genomics target», Novosibirsk, 2001, P. 24, 59.
 36. *Johnson P., Gray D., Mowat W., et al.* Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. // Mol. Cell. Biol., 1991, 11, P. 1-11.
 37. *Feinstein E., Gale R.P., Reed J., et al.* Expression of the normal p53 gene induces differentiation of K562 cells. // Oncogene, 1992, № 7, P. 1853-1857.
 38. *Michalovitz D., Halevy O., Oren M.* Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. // Cell, 1990, 62, P. 671-680.
 39. *Yonish S., Rouach E., Resnitzky D. Et al.* Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. // Nature, 1991, 352, P. 345-347.
 40. *Szczylik C., Skorski T., Nicolaidis N.C. et al.* Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. // Science, 1991, 253, P. 562-565.
 41. *Зайчук Т.А., Кузнецов Н.В., Осовская В.С. и др.* Специфические ДНК-связывающие свойства онкобелка p53 в опухолевых клетках человека. // Доклады Академии наук, 1993, 330, С. 379-382.
 42. *Осовская В.С., Копнин Б.П., Райхлин Н.Т. и др.* Влияние на различные линии клеток кДНК p53, экспрессируемой под контролем экзогенного гомологичного промотора. // Молекулярная биология, 1995, 29, С. 61-67.
 43. *Кременецкая О.С., Лозачева Н.П., Барышников А.Ю. и др.* Влияние опухолевого супрессора p53 и его мутантных форм на дифференцировку и жизнеспособность лейкозных клеток K562. // Цитология, 1996, 38, С. 279-1293.
 44. *Antisense Technology.* Lichteinstein C., Nellen W., eds. JRL Press Oxford New York Tokyo, 1997, P. 240-264.
 45. *Grineva N., Akhlynina T., Gerasimova L., et al.* Up-regulation of expression of endogenous p53 tumor suppressor gene in the cultures of Ph+ bone marrow cells treated with BCR/ABL-targeted antisense oligonucleotides, // Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 2002, submitted.
 46. *Almog N., Rottar V.* An insight into the life of p53: a protein coping with many functions. Review of the 9th p53. // Biophys. Biochem. Acta, 1998, P. 1378, R43-R54. Workshop, Crete, May 9-13.
 47. *Kastan M.B., Radin A.I., Kuerbitz S.J., et al.* Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. // Cancer Res., 1991, 51, P. 4279-4286.
 48. *Chalandon Y., Jiang X., Hazlewood G., et al.* Modulation of p210BCR-ABL activity in transduced primary human hematopoietic cells controls lineage programming. // Blood, 2002, 99, P. 3197-3204.
 49. *Becher R., Schmidt C.G.* Sister chromatid differentiation and cell-cycle-specific patterns in chronic myelocytic leukemia and normal bone marrow. // Int. J. Cancer, 1982, 29, P. 617-620.
 50. *Elmaagacli A.H., Beelen D.W., Opalka B., et al.* 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 stage. // Ann. Hematol., 2000, 79, P. 424-431.
 51. *Rosti V., Bergamaschi G., Ponchio L., et al.* c-Abl function in normal and chronic myelogenous leukemia hematopoiesis: in vitro studies with antisense oligomers. // Leukemia, 1992, 6, P. 1-7.
 52. *Moll U.M., Zaika A.* Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. // FEBS letter, 2001, 493, P. 65-69.
 53. *Marin M.C., Hsu B., Meyn R.E., et al.* Evidence that p53 and bcl2 regulators of a common cell death pathway important for in vivo lymphogenesis. // Oncogene, 1994, 9, P. 3107-3112.
 54. *Orkin S.H.* Transcription factors and hematopoietic development. // J. Biol. Chem., 1995, 270, P. 4955-4958.
 55. *van Rhee F., Hochhaus A., Lin F., et al.* p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. // Blood, 1996, 87, P. 5213-5217.
 56. *Oren M.* Regulation of the p53 tumor suppressor protein. // J. Biol. Chem., 1999, 274, P. 36031-36034.
 57. *Sionov R.V., Coen S., Goldberg Z., et al.* c-ABL regulates p53 levels under export and ubiquitination. // Mol. Cell. Biol., 2001, 21, P. 5869-5878.
 58. *Dean N. M., McKay R., Condon T. P., et al.* Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. // J. Biol. Chem., 1994, 269, P. 16416-16424.
 59. *Sun T., Li C., Yam L.T., eds.* //Atlas of cytochemistry. Immunocytochemistry of hematological neoplasms, 1985, Chicago.
 60. *Mauro M.J., Druker B.J.* STI571: targeting BCR/ABL as therapy for CML. // The Oncologist, 2001, № 6, P. 233-238.
 61. *Sattler M., Griffin J.D.* Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. // Int J Hematol., 2001, 73, P. 278-291.
 62. *Schindler T., Bornmann W., Pellicena P. et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. // Science, 2000, 289, P. 1938-1942.
 63. *Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K. et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy by BCR/ABL gene mutation or amplification. // Science, 2001, 293, P. 876-880.
 64. *Hermann M., Lorenz H.-M., Voll R. et al.* A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. // Nucleic Acids Res., 1994, 22, P. 5506-5507.
 65. *Spiller D.G., Giles R.V., Grzybowski J. et al.* Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation. // Blood, 1998, 91, P. 4738-4746.