

Мутационный анализ и бактериальная экспрессия Dbl-гомологичного домена химерного онкобелка Vcr/Abl

А. Н. Дубровская, Г. Д. Телегеев, М. В. Дыбков, О. С. Волошаненко,
В. В. Швед, С. С. Малюта

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Обнаружены различия в распределении актинового скелета в клетках здоровых доноров (диффузное), больных острым лимфобластным лейкозом, Ph'-позитивных клеточных культур и у большинства больных на стадии бластного криза хронического миелолейкоза (ХМЛ) (кортикальное распределение), в то время как в одном случае бластного криза ХМЛ наблюдалось образование «dot-like» актиновых структур, сопровождающееся мутациями dbl гомологичной области гена bcr/abl. Рекомбинантный Dbl домен Vcr/Abl был экспрессирован в pET32b экспрессионной системе и использован для получения поликлональных антител. Полученные результаты могут способствовать пониманию природы бластного криза ХМЛ и разработке дополнительных методов диагностики.

Введение. В ходе цитогенетических исследований лейкозных клеток у большинства больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) и у 20—50 % больных с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) обнаруживается специфический хромосомный маркер — филадельфийская хромосома (Ph'), появляющаяся вследствие реципрокной транслокации t (9; 22) (q34; q11) [1—3]. Ph'-транслокация приводит к слиянию 5'-области гена *bcr* с основной 3'-частью гена *abl*. Эти молекулярно-генетические события являются причиной образования химерного транскрипта Vcr/Abl, обладающего повышенной тирозинкиназной активностью по сравнению с нормальным продуктом онкогена *abl* [3—6]. Хотя решающая роль в патогенезе отводится тирозинкиназным свойствам слитого белка, тем не менее, область Vcr также способна модулировать онкогенный эффект. Эта область выполняет функции гуанидиннуклеотидобменивающего фактора (ГОФ) для GTPазы RhoA-регулятора динамики клеточного актина [7]. RhoГОФ домен представлен только у p210 формы

Vcr/Abl, встречающейся как при ХМЛ, так и при ОЛЛ, но отсутствует у p190 Vcr/Abl, присущего только ОЛЛ. Поскольку отсутствие указанного RhoГОФ домена является плохим прогностическим признаком, его мутация у p210 Vcr/Abl может являться одним из факторов прогрессирования опухолевого процесса. Цель представленного исследования состояла в изучении роли Vcr-последовательности в функционировании химерного онкобелка Vcr/Abl и его возможного участия в развитии бластного криза у больных ХМЛ.

Методом флуоресцентной микроскопии с использованием FITC-меченного фаллоидина в некоторых случаях показаны изменения в распределении актинового цитоскелета в лейкозных клетках больных на стадии бластного криза ХМЛ. Мутационный анализ области гена *bcr-abl*, кодирующей RhoГОФ домен, с помощью химического расщепления ДНК гетеродуплексов [8] указывает на позитивную корреляцию между мутациями в RhoГОФ домене и цитоскелетными изменениями при прогрессировании лейкозного процесса. Полученные данные позволяют заключить, что в ряде случаев прогрессия ХМЛ сопряжена с дисфункцией области Vcr слитого гена, что может служить самодостаточ-

ным фактором для перехода к бластному кризу либо действовать кумулятивно с другими молекулярными механизмами опухолевой клетки.

Материалы и методы. Обратнотранскрип-тазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). В исследованиях использовали образцы периферической крови и костномозговые пункции больных, проходивших курс лечения в гематологических клиниках Киева. В качестве негативного контроля применяли образцы крови здоровых доноров. Детекцию филадельфийской хромосомы у больных с диагнозом «хронический миелолейкоз» или «острый лимфолейкоз» проводили с помощью ОТ-ПЦР.

РНК получали по методу [9]. кДНК синтезировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкг РНК, 1 мМ dNTP («Promega», США), 20 ед. обратной транскриптазы M-MLV («Promega») и буфер для нее, 10 ед. РНазина, 15 пМ праймер A₁ (5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3'). Синтез проводили при температуре 37 °С на протяжении 1,5 ч. Аликвоты реакционной смеси объемом 10 мкл использовали для проведения первого раунда амплификации.

Филадельфийскую хромосому детектировали методом двухраундовой ПЦР, согласно методическим разработкам [10]. Амплификацию фрагмента ДНК (1929—2608 п. о.), кодирующего Dbl-гомологичный домен, осуществляли в два этапа. На первом этапе использовали внешние праймеры ext-1dbl (5'-GGCTGCCCTACATTGATGACTCGC-3') и ext-r1dbl (5'-GATGTTGGGCACTGCCTCCAGTTC-3'). В 30 мкл реакционной смеси содержалось 200 мкМ dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 5 ед. Таq ДНК-полимеразы и буфер для нее, праймеры в концентрации 10 пМ каждый, 10 мкл кДНК реакционной смеси. Второй этап ПЦР проводили с использованием 3 мкл смеси и внутренних праймеров Bcr₁ (5'-GCCCTGGAGTCCACTAAAGC-3') и Bcr₂ (5'-CGGTGCTCTCCSTTCTTC-3'). Каждый раунд ПЦР состоял из 30 циклов с таким режимом: 94 °С—30 с, 56 °С—30 с, 72 °С—1 мин 30 с. Электрофореграмма продуктов ПЦР представлена на рис. 1. Полученные амплификаты *dbl*-кодирующего участка очищали для последующего клонирования элюцией из геля на колонках фирмы «QIAGEN», Германия.

Культуры клеток. В исследованиях использованы клетки линий K562 (Ph⁺-позитивный ХМЛ, эритробластный криз) и U937 (Ph⁻-негативная промиелоцитарная лейкемия), а также временные культуры полиморфноядерных лейкоцитов больных ХМЛ и ОЛЛ. Полиморфноядерные лейкоциты крови выделяли в градиенте плотности с использованием Histopaque 1077 («Sigma», США). Ростковая

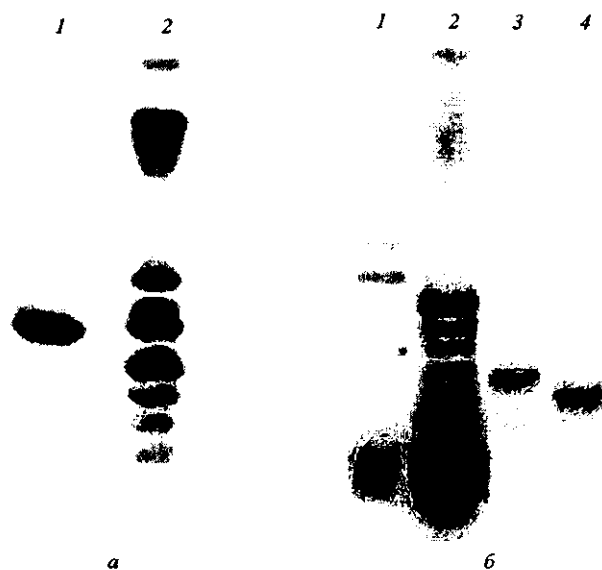


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ПЦР; а: 1 — амплификаты *dbl*-гомологичного участка гена *bcr/abl* размером 679 п. о.; 2 — маркер молекулярной массы *pBR322/AluI*; б: 1 — маркер молекулярной массы *pBR322/AluI*; 2 — маркер молекулярной массы *pUC19/MspI*; 3 — детекция Ph⁺-хромосомы, В₂/A1 перестройка, фрагмент 125 п. н.; 4 — детекция Ph⁺-хромосомы, В₂/A1 перестройка, фрагмент 200 п. н.

среда для культивирования клеток содержала 90 % среды RPMI 1640 («Sigma»), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США), 2 мМ L-глютамин, 100 ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Окрашивание актинового цитоскелета. Клетки в свежей культуральной среде в концентрации 3—6 · 10⁴ кл/мл наслаивали на покрывное стекло и культивировали в атмосфере CO₂ (37 °С, 24 ч), после чего их осторожно отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,4, и фиксировали в течение 5 мин 3,7 %-м раствором параформальдегида («Sigma») в ФСБ. После фиксации клетки трижды отмывали ФСБ и пермеабилizировали 0,1 %-м тритоном X-100 в ФСБ, повторно отмывали и экспонировали в растворе К (0,05 мг/мл FITC-меченного фаллоидина («Sigma») в ФСБ с 1 %-м DMSO) на протяжении 40 мин при комнатной температуре во влажной атмосфере. После окрашивания клетки отмывали несколькими сменами ФСБ на протяжении 40—50 мин. На предметное стекло помещали один слой парафиновой пленки с отверстиями, в которые наносили смесь

30 % глицерина и 70 % ФСБ и накрывали покрывным стеклом. Цитоскелетное распределение наблюдали при помощи иммерсионной системы микроскопа Nikon Microscope Optiphot-2 (увеличение 1000, фильтр DM510). Фотографии получены с использованием фотосистемы Nikon Photomicrographic Attachment Microflex UFX-DX.

Мутационный анализ проводили методом химического расщепления ДНК-ДНК гетеродуплексов. Для формирования гетеродуплексов готовили смесь, содержащую эквивалентное количество (50—100 мкг) ПЦР-амплификатов *dbl*-кодирующего участка *bcr/abl* гена от нормального и больного доноров в буфере Н (300 мМ NaCl, 3,5 мМ MgCl₂, 3 мМ трис-НСl, pH 7,7). ДНК в буфере Н денатурировали в течение 5 мин при 100 °С и отжигали 1 ч при 42 °С. Гетеродуплексы ДНК пересаждали этанолом и обрабатывали 2,5 М гидроксиламином в течение 2 ч при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением буфера С (0,3 М NaAc, 0,1 мМ Na₂-EDTA, pH 5,2, 25 мкг/мл тРНК *Saccharomyces cerevisiae*). После преципитации этанолом ДНК обрабатывали 1 М пиперидином при 90 °С 30 мин, отмывали и осаждали спиртом, после чего образцы инкубировали при 100 °С (4 мин) в буфере для нанесения (60 %-й формамид, 0,1 %-й ксиленцианол, 0,1 %-й бромфеноловый синий, 35 мМ Na₂-EDTA, pH 7,4). Продукты расщепления анализировали в 12 % денатурирующем ПААГ-электрофорезе ($U = 90$ В, $t = 12$ ч).

Сборка экспрессирующей конструкции *pETB3* и анализ бактериальной экспрессии. Фрагмент гена *bcr/abl* с 1923 по 2810 п. н., кодирующий DbI-гомологичный домен, клонировали из *pGEM-T* вектора в *pET32b* по сайту *EcoRI*. Ориентацию вставки анализировали рестрикционным картированием по сайту *PstI*. Целевую вставку в ДНК отобранного клона частично секвенировали. Результаты секвенирования приведены на рис 2.

Полученную конструкцию обозначили *pETB3*. Компетентные клетки BL21 (DE3) трансформировали ДНК плазмиды *pETB3*. Единичную колонию инокулировали в 2 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали при 37 °С (120 об/мин) в течение ночи. 200 мкл ночной культуры инокулировали в 2 мл свежей среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при интенсивном встряхивании до достижения $OD_{600} = 0,8—1,0$. Бактериальную культуру объемом 1 мл отбирали в микропробирку Эппендорф, осаждали центрифугированием в настольной центрифуге (1 мин, 12000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 мкл дистиллированной воды, добавляли SDS-буфер для

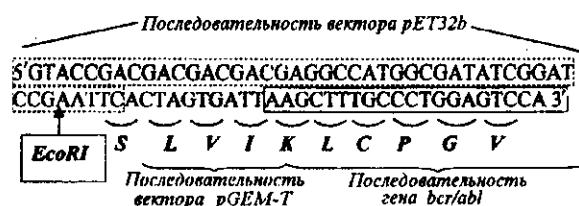


Рис. 2. Последовательность вектора *pETB3* в области лигирования целевой вставки

нанесения образцов и кипятили пробы в течение 5 мин. К оставшемуся объему культуры добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и культивировали еще 3 ч, после чего из оставшегося объема культуры готовили образец для анализа на SDS-ПААГ-электрофорезе, как описано выше. Образцы анализировали при помощи SDS-электрофореза по Лемли в 15 %-м ПААГ. С помощью созданной экспрессионной конструкции *pETB3* стало возможным получать высокие выходы белка (около 80—100 мг/л). Приблизительно 90 % белкового продукта присутствовало в нерастворимой фракции, что позволило очистить белок в виде телец включения.

Очистка телец включения. Спустя 4 ч после индукции 50 мл клеточной культуры осаждали центрифугированием в центрифуге PC-6 в течение 15 мин при 3700 об/мин и температуре 4 °С. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в буфере: 50 мМ трис-НСl, pH 8,0, 2 мМ EDTA. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе («MSE», Англия). Лизат центрифугировали на центрифуге PC-6 в течение 15 мин при 3700 об/мин и 4 °С. Супернатант с растворимыми белками удаляли, аликвоту супернатанта использовали для оценки удельной массы растворимой белковой фракции. Осадок, представляющий собой фракцию нерастворимых белков, повторно отмывали и озвучивали для удаления остаточных количеств растворимых бактериальных белков. После повторного центрифугирования в том же режиме отмытые белковые тельца включения гомогенизировали в 3 мл буфера: 20 мМ трис-НСl, pH 7,9, 500 мМ NaCl, 6 М мочевины, а затем инкубировали в течение 1 ч на льду для полного растворения рекомбинантного белка. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием в центрифуге PC-6 в течение 30 мин при 3700 об/мин и 4 °С. Супернатант аккуратно переносили в другую пробирку, аликвоту использовали для анализа на SDS-ПААГ-электрофорезе (рис. 3).

Результаты и обсуждение. Медицинские диагнозы «Ph'-положительный ХМЛ» и «Ph'-положительный ОЛЛ» верифицировали методом ОТ-ПЦР, чувствительность которого составляет 10^{-4} — 10^{-5} . Полиморфноядерные лейкоциты периферической крови больных С. и К. (ХМЛ, бластный криз), больных

Ф. и Я. (ОЛЛ), нормальных доноров А. и В., клеточные линии K562 (ХМЛ, эритробластный криз), U937 (Ph'-негативная промиелоцитарная лейкемия) использованы для приготовления цитологических препаратов. Для окрашивания актинового цитоскелета использовали FITC-меченный фаллоидин в концентрации 0,05 мг/мл. Сравнительный анализ актинового распределения в полиморфноядерных лейкоцитах разных доноров позволил выделить три типа клеточного окрашивания: к первому относились клетки нормальных доноров, ко второму — клетки большинства больных — С. (ХМЛ, бластный криз), Ф. и Я. (ОЛЛ), а также клеточные линии K562 и U937 (рис 4, а).

Цитоскелетное распределение третьего типа наблюдалось лишь в одном случае К. (ХМЛ, бластный криз) (рис. 4, б). Отличие между структурой цитоскелета у нормальных и опухолевых клеток можно объяснить неодинаковым морфологическим составом и представленностью последних бластными клетками и промиелоцитами. Более сложным оказалось объяснить полиморфность актинового распределения в бластных опухолевых клетках разных доноров.

В 1997 г. авторы [11] опубликовали результаты своих экспериментов по трансфекции Ph'-нега-

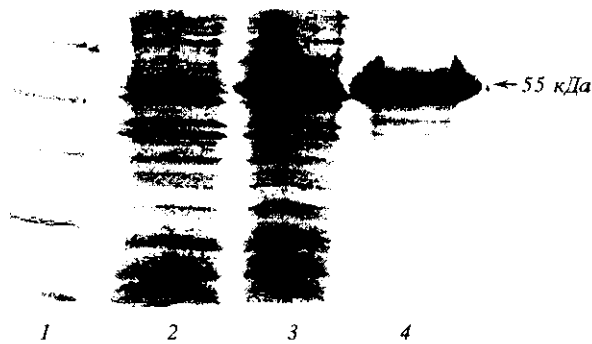


Рис. 3. Бактериальная экспрессия рекомбинантного белка DDVA3: 1 — маркер молекулярной массы LMW («Amersham Pharmacia Biotech.»); 2 — суммарные бактериальные белки до индукции; 3 — суммарные бактериальные белки после индукции; 4 — очищенные белковые тельца включения

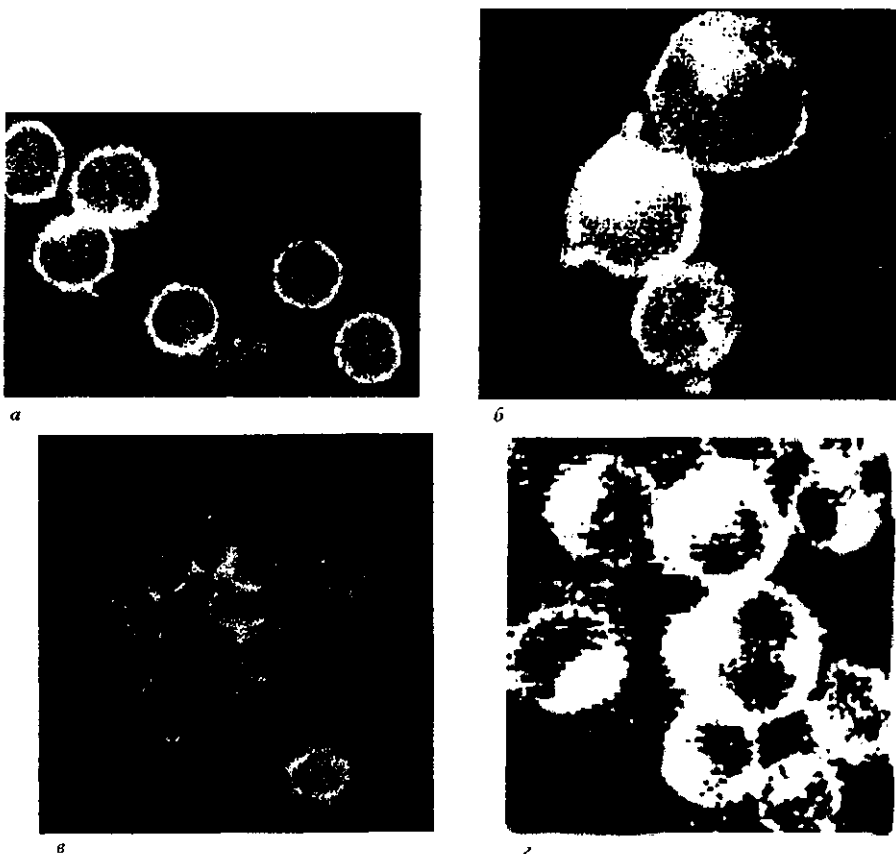


Рис. 4. Распределение актина в клетках больных Ph'-лейкемией и лейкоцитарных клеточных линиях: а — паракортикальное распределение, характерное для большинства больных и для клеточных линий K562 и U937; б — «dot-like structures», наблюдаемые в одном случае у больного на стадии бластного криза хронического миелолейкоза; в, г — модуляторное действие DbI домена белка Bcr/Abl на распределение актинового цитоскелета [11] (а — клеточная линия K562, экспрессирующая p210 Bcr/Abl; б — трансфектанты Ba/F3, экспрессирующие белок Bcr/Abl, делетированный по DbI-гомологичному домену)

тивной гемопоэтической клеточной линии Va/F3 экспрессионными конструкциями, несущими различные делеционные мутанты гена *bcr/abl*. Ими обнаружено неодинаковое распределение актинового цитоскелета для трансфектантов Va/F3, экспрессирующих полноразмерный белок Vcr/Abl и белок, делектированный по Dbl-гомологичному домену (рис 4, в, г). Если в первом случае наблюдалось кортикальное распределение актина, то во втором — F-актин образовывал аморфные цитоплазматические скопления, «dot-like structures», что свидетельствовало о модуляторной роли Dbl домена Vcr/Abl белка для клеточного скелета.

В норме Dbl домен Vcr белка выполняет функцию ГОФ для GTPазы RhoA, необходимой для стабилизации актиновых стрессовых волокон и образования фокальных контактов. Можно предположить, что транслокация B1/A11, приводящая к формированию p190 Vcr/Abl белка и к утрате Dbl-гомологичного домена, равно как и мутация этого домена в p210 Vcr/Abl, может изменить картину актинового распределения и явиться причиной появления в клетках больных «dot-like structures», описанных в работе [11]. Действительно, при сравнении цитоскелетной структуры, наблюдаемой в клетках больных, с таковой, полученной авторами [11] для трансфектантов Va/F3, они оказываются очень похожими. Кортикальное распределение актина в клетках Va/F3, экспрессирующих полноразмерный белок Vcr/Abl, очень напоминает актиновую структуру клеток большинства больных — С. (ХМЛ, бластный криз), Ф. и Я. (ОЛЛ) и клеточных линий K562 и U937 (рис. 4, а). В то же время «dot-like structures» наблюдаются как в Va/F3, экспрессирующих Vcr/Abl белок с делектированным Dbl-гомологичным доменом, так и в случае К. (ХМЛ, бластный криз) (рис. 4, б). Можно предположить, что для К. в отличие от других случаев бластного криза ХМЛ и ОЛЛ характерны некие функциональные изменения Dbl-гомологичного домена Vcr/Abl белка, что отражается на распределении F-актина. Было бы упрощенным предполагать, что в каждом случае опухолевая прогрессия ХМЛ будет сопровождаться мутацией p210 Vcr/Abl белка или что эта мутация является самостоятельным событием для перехода к бластному кризу ХМЛ. Очевидно, что в большинстве своем развитие ХМЛ имеет сложную кумулятивную природу и происходит при участии многих клеточных генов. Тем не менее, обнаружение этой мутации даже в отдельных случаях бластного криза ХМЛ было бы важным дополнением к пониманию природы этого заболевания. Для этого проведен мутационный анализ ДНК больных Ф., К. и

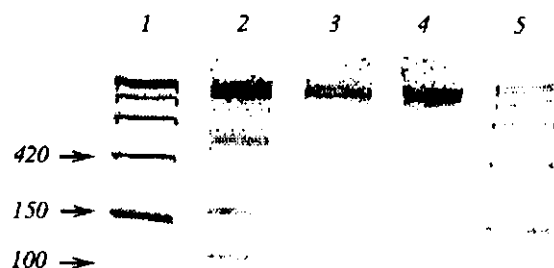


Рис. 5. Детекция мутаций в *dbl* области *bcr/abl* гена методом химического расщепления ДНК-ДНК гетеродуплексов: 1, 5 — маркер молекулярной массы PCR marker («Promega», США); 2 — химическое расщепление гетеродуплексов А. + К. с образованием продуктов размером 420, 250 и 100 п. н.; 3, 4 — нерасщепленные гетеродуплексы А. + Ф. и А. + K562 соответственно

клеточной линии K562. В качестве «дикой формы» использовали *dbl*-кодирующую ДНК нормального донора А. В основу подхода положен метод химического расщепления ошибочно спаренных оснований гидроксиламином и осмием тетроксидом, предложенный в работе [8]. После амплификации *dbl*-кодирующих фрагментов гена *bcr/abl* размером 670 п. н. проводили химическое расщепление ДНК дуплексов А. + К., А. + Ф., А. + K562, А. + А. Продукты расщепления анализировали при помощи электрофореза в 12 %-м денатурирующем ПААГ (рис. 5). Среди проанализированных образцов лишь гетеродуплексы А. + К. образовывали продукты расщепления размером примерно 420, 150 и 100 п. н., что может свидетельствовать о связи между изменением цитоскелета и мутацией *dbl* домена *bcr/abl* гена. То есть можно предположить, что образование «dot-like structures» в лейкоцитах большого К., как и в случае трансфектантов Va/F3, вызвано дисфункцией Dbl-гомологичного домена химерного белка. Предстоит выяснить, происходит ли экспрессия нормальной копии *bcr* гена при разных случаях ХМЛ и ОЛЛ и меняется ли ее уровень в ходе развития заболевания. Не происходят ли мутации нормальной копии гена *bcr*, что также может быть причиной опухолевого развития.

Для получения ответа на эти вопросы создана экспрессирующая конструкция *pETB3* для бактериальной экспрессии Dbl-гомологичного домена Vcr/Abl белка. Структура рекомбинантного белка DDBA3 показана на рис. 6. Белок размером 55 кДа экспрессирован в клетках BL21(DE3), очищен в виде телец включения до чистоты 80–85 % и использован для получения поликлональных анти-

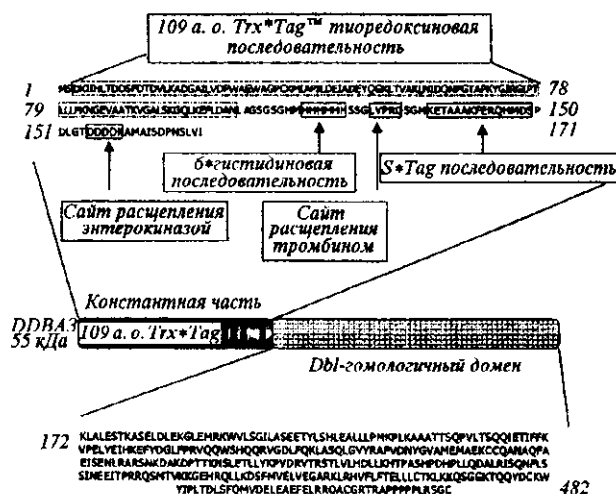


Рис. 6. Схема рекомбинантного белка DDBA3

тел. Тест-система на основе иммуноблотинга с помощью полученных анти-Vcr-антител поможет в будущем не только осуществить анализ экспрессии нормального Vcr белка у больных ХМЛ и ОЛЛ, но и позволит проводить количественный тест для белка Vcr/Abl. Это даст возможность исследовать динамику его экспрессии во время лечения, оценить цитологическую ремиссию и прогнозировать дальнейшее протекание заболевания.

A. N. Dubrovskaya, G. D. Telegeev, M. V. Dybkov, O. S. Voloshanenko, V. V. Shved, S. S. Maliuta

Mutation analysis and bacterial expression of the chimerical oncoprotein Bcr/Abl DbI-homology domain

Summary

We obtained the differences of the actin distribution in the cell from health donors (diffuse cytoplasmic distribution), patients with ALL, PhB-positive human cell line K562 and most cases CML blast crisis (cortical F-actin distribution) and in the one case of CML blast crisis a dot-like actin structures were observed. The revealing of dot-like actin distribution correlated with detection of mutations in dbI part of bcr/abl gene. Recombinant DbI domain of Bcr/Abl was expressed in pET32b expression system and used for obtaining of the polyclonal antibody. Obtained data may cast light on the nature of CML blast crisis development and can be used for early detection of CML tumor progression.

Г. М. Дубровська, Г. Д. Телегеев, М. В. Дибков, О. С. Волошаненко В. В. Швед, С. С. Малыта

Мутаційний аналіз і бактеріальна експресія DbI-гомологічного домену химерного онкобілка Vcr/Abl

Резюме

Знайдено відмінності в розподілі актинового скелета у клітинах здорових донорів (дифузне), хворих на гострий лімфобластний лейкоз, Ph⁺-позитивних клітинних культур та в більшості хворих на стадії бластного кризу хронічного мієлолейкозу (ХМЛ) (кортикальний розподіл), у той час як в одному випадку бластного кризу ХМЛ спостерігалось утворення «dot-like» актинових структур, яке супроводжувалось мутаціями dbI-гомологічної області гена bcr/abl. Рекомбінантний DbI домен Vcr/Abl було експресовано в pET32b експресійній системі і використано для отримання поліклональних антитіл. Отримані результати можуть сприяти розумінню природи бластного кризу ХМЛ та розробці додаткових методів діагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Science.—1960.—132.—P. 1497—1499.
2. Rowley J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // Nature.—1973.—243, N 5405.—P. 290—293.
3. Butturini A, Arlinghaus R. B., Gale R. P. BCR/ABL and leukemia // Leukemia Res.—1996.—20, N 6.—P. 523—529.
4. Pendergast A. M., Muller A. J., Havlik M. H. 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, N 1.—P. 161—171.
5. Muller A. J., Young J. C., Pendergast A. M. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias // Mol. Cell.—1991.—11, N 4.—P. 1785—1792.
6. Gishizky M. L. Molecular mechanisms of Bcr-Abl-induced oncogenesis // Cytokines Mol. Ther.—1996.—2, N 4.—P. 251—261.
7. Ron D., Zannini M., Lewis M. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr // New Biol.—1991.—3, N 4.—P. 372—379.
8. Cotton R. G., Rodrigues N. R., Campbell R. D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine osmium tetroxide and its application to the study of mutations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 12.—P. 4397—4401.
9. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem.—1987.—162.—P. 156—159.
10. Телегеев Г. Д., Дибков М. В., Божко М. В., Третьяк Н. М., Малыта С. С. Молекулярно-біологічна діагностика неопластичних захворювань крові // Цитологія і генетика.—1998.—32, № 1.—С. 71—78.
11. McWhirter J. R., Wang J. Y. Effect of bcr sequences on the cellular function of the Bcr/Abl oncoprotein // Oncogene.—1997.—15.—P. 1625—1634.

УДК 616-006:577.2.575
Надійшла до редакції 25.12.01