

НАНОКОЛОНИИ И ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ХРОМОСОМНЫМИ ТРАНСЛОКАЦИЯМИ

©2010 г. Е. В. ЧЕТВЕРИНА, А. Б. ЧЕТВЕРИН

Институт белка РАН, г. Пущино, Московская область

I. Введение. II. Хромосомные транслокации. III. Минимальная остаточная болезнь. IV. Применение нанокolonий для диагностики минимальной остаточной болезни. V. Другие приложения нанокolonий для диагностики онкологических заболеваний. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Многие злокачественные заболевания ассоциированы с хромосомными аномалиями, возникшими в результате хромосомных транслокаций. Хромосомные транслокации приводят к изменению экспрессии генов и/или к образованию слитых (химерных) генов, экспрессирующих химерные продукты (РНК и белки), которые могут служить как диагностическими маркерами, так и терапевтическими мишенями. Наиболее чувствительная диагностика основана на обнаружении маркерной химерной РНК с использованием полимеразной цепной

Принятые сокращения: МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ОЛЛ – острый лимфоидный лейкоз; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз; ОТ – обратная транскрипция; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей ПЦР; AML1-ETO – химерная последовательность, состоящая из частей генов *AML1* и *ETO*; FRET (fluorescence resonance energy transfer) – флуоресцентный резонансный перенос энергии; RCA (Rolling Circle Amplification) – размножение по механизму катящегося кольца; RQ-PCR (а также qPCR и qRT-PCR) – ПЦР в режиме «реального времени»; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; Taq ДНК-полимераза – ДНК-зависимая ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus*.

Адрес для корреспонденции: helena@vega.protres.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа «Молекулярная и клеточная биология»), Российского фонда фундаментальных исследований, Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники».

реакции (ПЦР) [1, 2]. Сначала с помощью обратной транскрипции (ОТ) синтезируют ДНК-копию химерной РНК и затем с помощью ПЦР размножают область стыка слитых генов в химерной кДНК, используя праймеры, комплементарные последовательностям, лежащим по разные стороны от места стыка [3–5].

Теоретически, с помощью ПЦР можно обнаружить единственную молекулу мишени. Однако реальная чувствительность при анализе клинических образцов, содержащих большое количество посторонних нуклеиновых кислот, в 100–1000 раз ниже [6]. Преодолеть большинство проблем, снижающих чувствительность и достоверность ПЦР-анализа, а также затрудняющих количественное определение РНК-мишени, помогает использование изобретенного нами метода нанокolonий (другие названия: молекулярные колонии, полонии) [7, 8].

Нанокolonии образуются при размножении матричных наномолекул в среде, полимерный матрикс которой образует трехмерную сеть с размером пор в нанометровом диапазоне [9–16]. Например, можно «выращивать» колонии РНК в агарозе с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы фага Q β [17, 18] или колонии ДНК в полиакриламидном геле с помощью термостабильных ДНК-полимераз [19, 20]. При этом, с одной стороны, каждая колония состоит из идентичных молекул, что позволяет анализировать, фактически, исходную молекулу, а с другой стороны, каждая исходная молекула ДНК-мишени образует колонию, что позволяет путем подсчета колоний прямо определять титр мишени.

На уникальной способности разделять в пространстве (компартиментализовать) амплификацию и экспрессию индивидуальных молекул ДНК или РНК основаны различные приложения нанокolonий. Впервые метод нанокolonий был применен в 1991 г.: для обнаружения в воздухе единичных молекул реплицирующихся матриц, что послужило наиболее весомым аргументом в опровержении гипотезы спонтанного синтеза РНК [17]. Способность нанокolonий обнаруживать продукты реакций между одиночными молекулами привела к открытию саморекombинации РНК [21] и выявлению многообразия механизмов рекомбинации РНК, осуществляемой разными РНК-зависимыми РНК-полимеразами [22, 23]. Поскольку нанокolonии представляют собой потомство индивидуальных матричных молекул (молекулярные клоны), они позволяют осуществлять клонирование чистого генетического материала и проводить прямой скрининг генов *in situ*, в том числе по функции кодируемых этими генами белков [24, 25].

Многогранны возможности нанокolonий в диагностике. На примере вирусных мишеней было показано, что с помощью нанокolonий можно надежно обнаружить одну молекулу ДНК или две молекулы РНК в образце крови человека, содержащем в триллион раз большее количество нуклеиновых кислот [19, 20]. Пространственное разделение размножения индивидуальных молекул нуклеиновых кислот, неизбежно присутствующих в клинических образцах, устраняет помехи со стороны неспецифического синтеза (который в случае размножения в жидкости является основным фактором, ограничивающим чувствительность обнаружения мишени), исключает конкуренцию между одновременно размножаемыми матрицами при мультиплексном анализе [19, 20], а также позволяет с непревзойденной чувствительностью выявлять обладающие лекарственной устойчивостью минорные клоны злокачественных клеток [26]. Наконец, возможность идентифицировать *cis*-элементы делает нанокolonии уникальным инструментом для выявления химерных РНК [27], картирования генов и определения гаплотипа [28], выяснения экзонного состава РНК [29] и секвенирования *in situ* [30].

В этом обзоре мы обсуждаем роль хромосомных транслокаций в возникновении и диагностике онкологических заболеваний и рассматриваем полную процедуру диагностики заболеваний, ассоциированных с появлением химерных РНК, на примере обнаружения с помощью нанокolonий минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе.

II. ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ

ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Хромосомные аномалии характерны для раковых клеток: они обнаружены во всех основных типах злокачественных опухолей. На сегодняшний день насчитывается 57709 видов хромосомных аномалий (в соответствии с базой данных Миттельмана на сайте Национального Института Рака США [31]) и в результате развития методов молекулярной цитогенетики и других областей науки все с большей скоростью продолжается выявление новых видов.

В Классификации опухолей Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization Classification of Tumours – проект ВОЗ, призванный обеспечить международный стандарт для классификации опухолей и представляющий собой периодическую публикацию серии книг, так называемых «WHO Blue Books» [32]) предла-

гаются все большее число хромосомных аномалий использовать в качестве признака заболевания: то есть для постановки диагноза, выбора тактики лечения, а также в качестве прогностического маркера.

Хромосомные аномалии делят на два класса: сбалансированные хромосомные перестройки и хромосомный дисбаланс [33]. При хромосомном дисбалансе уменьшается или увеличивается количество хромосомного материала, что проявляется как полная или частичная трисомия, моносомия, делеции, внутри- или экстрахромосомные амплификации. Сбалансированные хромосомные перестройки не изменяют количество хромосомного материала.

Многие из аномалий являются следствием транслокаций (переноса участка хромосомы), которые могут приводить как к сбалансированным, так и к несбалансированным хромосомным перестройкам. В более узком значении под транслокацией (их также называют реципрокными транслокациями) подразумевают обмен участками между двумя негомологичными хромосомами, приводящий к сбалансированной перестройке хроматина [34]. Такие транслокации могут иметь два последствия. В одном случае перестройка затрагивает регуляторные элементы генов, не меняя их кодирующие части, и приводит к изменению экспрессии нормального гена. В другом случае транслокация затрагивает кодирующую часть и приводит к образованию слитого (химерного) гена. Экспрессия химерных генов приводит к появлению химерных продуктов: химерной мРНК и химерного белка, которые, с одной стороны, обладают измененными свойствами по сравнению с продуктами исходных генов, а с другой стороны, могут служить маркерами злокачественных клеток [33].

В 1978 г. для систематизации цитогенетических аномалий была разработана Международная цитогенетическая номенклатура ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) [35], которая неоднократно обновлялась [36, 37]; последние изменения и дополнения были внесены в нее в 2009 г. [38].

По этой номенклатуре хромосомные aberrации обозначают символами из латинских букв. Приведем некоторые из них: *t* – транслокация, *del* – делеция, *ins* – инсерция, *inv* – инверсия, *dic* – дицентрическая хромосома. Запись aberrации, приводящей к образованию филадельфийской хромосомы (Ph), об открытии которой будет сказано далее, выглядит следующим образом: $t(9;22)(q34;q11)$, где *t* – транслокация, в первых скобках – номера хромосом, между которыми она произошла, во вторых скобках – обозначение плеча соответствующей хромосомы и номера цитогенетической полосы в точке разрыва.

Один и тот же ген может участвовать как в сбалансированных, так и в несбалансированных перестройках, а также может рекомбинировать с разными партнерами. В качестве примера можно привести ген *ETV6*: несбалансированная абберрация $\text{dic}(9;12)(\text{p}13;\text{p}13)$ вовлекает гены *PAX5* и *ETV6*, а сбалансированные абберрации $\text{t}(12;21)(\text{p}13;\text{q}22)$ и $\text{t}(12;22)(\text{p}13;\text{q}12)$ вовлекают соответственно пары генов *ETV6/RUNX1* и *ETV6/MNI* [31]. Все перечисленные хромосомные аномалии ассоциированы с лейкозами [31, 39].

Одна и та же аномалия может лежать в основе различных заболеваний. Так, например, хромосомная транслокация $\text{t}(12;22)(\text{p}13;\text{q}12)$, вовлекающая гены *ATF1* (синоним – *CHOP*) и *EWSR1* (синоним – *EWS*), обнаруживается при саркомах и меланомах [40]. И, наоборот, существуют хромосомные транслокации, обнаружение которых свидетельствует о наличии конкретной болезни. Например, хромосомная транслокация $\text{t}(11;22)(\text{q}24;\text{q}12)$ встречается только при саркоме Юинга (Ewing's sarcoma) и обуславливает 90–95% случаев этого заболевания [41]. Слитыми при этой транслокации оказываются гены *FLI1* и *EWSR1*. Оставшиеся случаи саркомы Юинга приходится на другие транслокации, наиболее частая (на нее приходится 5–10% случаев) из которых $\text{t}(21;22)(\text{q}22;\text{q}12)$ приводит к слиянию генов *ERG* и *EWSR1* [42].

Из приведенных выше примеров следует, что одна и та же формальная запись хромосомных абберраций [в данном примере $\text{t}(12;22)(\text{p}13;\text{q}12)$] может относиться к совершенно разным парам генов и к разным заболеваниям. Иногда, чтобы избежать путаницы, используют более точное указание места перекреста хромосом относительно цитогенетических полос [33, 34]. Более развернутое указание места перекреста в соответствии с базой данных «Genecards» [43] делает записи транслокаций различающимися: между генами *ETV6/MNI* – $\text{t}(12;22)(\text{p}13.2;\text{q}12.1)$, между генами *ATF1/EWS* – $\text{t}(12;22)(\text{p}13.12;\text{q}12.2)$. Другой вариант записи транслокаций [44, 45] – вместо или в дополнение к обозначению мест перекреста на хромосомах указывают пару генов, участвующих в транслокации, например: $\text{t}(12;22)$ *ETV6-MNI* и $\text{t}(12;22)$ *ATF1-EWS*.

В результате реципрокных (сбалансированных) транслокаций образуются две химерные хромосомы и, соответственно, два химерных гена. Иными словами, если транслокация затрагивает гены *A* и *B*, то образуется реципрокная пара химерных генов *A–B* (где 5'-часть гена *A* предшествует 3'-части гена *B*) и *B–A* (где 5'-часть гена *B* предшествует 3'-части гена *A*). Обычно в диагностике определяют продукт экспрессии только одного из пары химерных генов [46].

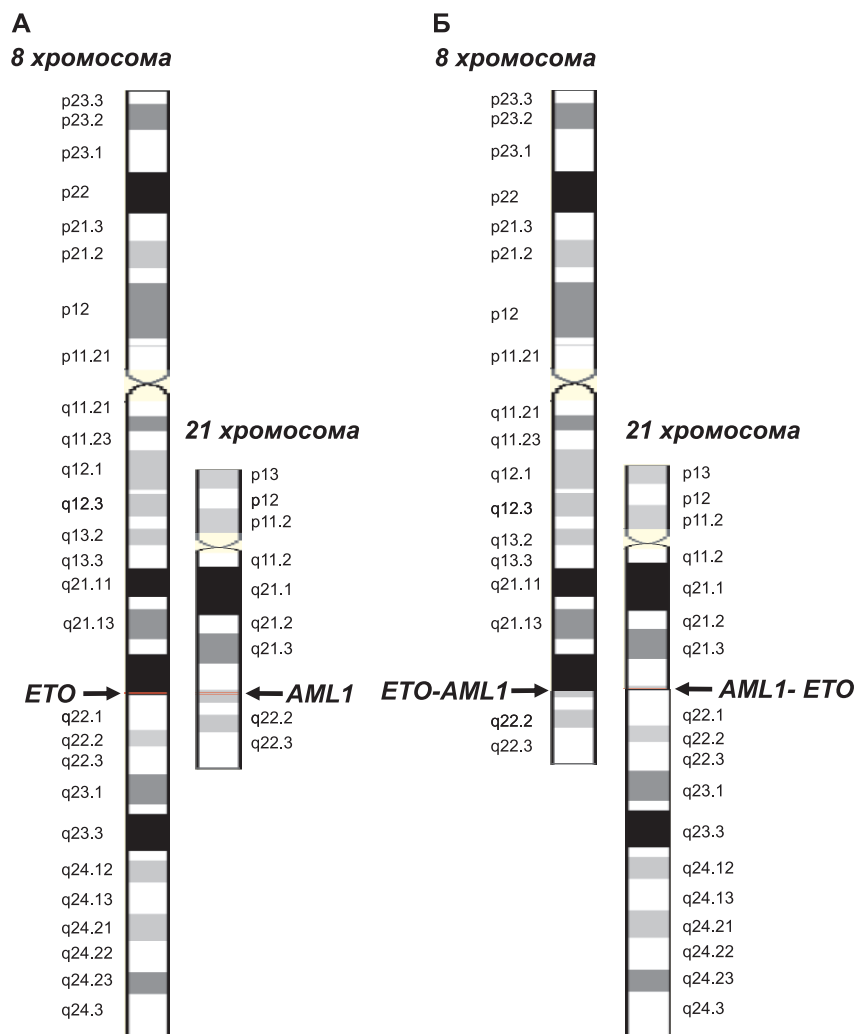


Рис. 1. Схемы 8 и 21 хромосом до (А) и после (Б) транслокации $t(8;21)(q22;q22)$.

Схемы нормальных хромосом взяты с сайта базы данных «Genecards» [43]. Стрелками указано место перекреста.

Например, в результате транслокации $t(8;21)(q22;q22)$ образуются два химерных гена: *AML1-ETO* и *ETO-AML1* (рис. 1). Однако у всех больных лейкозом, ассоциированным с этой транслокацией, обнаруживают только один вид химерного транскрипта из двух возможных – *AML1-ETO* мРНК [3, 47].

Транслокация $t(15;17)(q22;q21)$ приводит к появлению химерной мРНК PML-RARA [48], но у некоторых пациентов в дополнение к PML-RARA РНК обнаруживают химерную мРНК RARA-PML [49].

Появление и/или высокий уровень второго химерного продукта может свидетельствовать о более тяжелом течении болезни, как, например, в случае лейкоза, ассоциированного с $t(12;21)(p13;q22)$. У 76% таких больных, помимо РНК TEL-AML1, являющейся основным химерным продуктом, обнаруживают реципрокный вариант – AML1-TEL РНК. Высокий уровень последней связан с неблагоприятным прогнозом [50].

Интересно обстоит дело с транслокацией $t(9;22)(q34;q11)$, при которой взаимодействуют 9 и 22 хромосомы [51]. В 22 хромосоме в гене *BCR* есть два основных участка разрыва: М-bcr (major) – между 12 и 16 экзонами – и m-bcr (minor) – в первом интроне. На 9-ой хромосоме в гене *ABL* есть только один участок разрыва: в первом интроне [46]. Транслокация по М-bcr приводит к синтезу химерного белка BCR-ABL – p210^{BCR-ABL}, характерного для хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) [52, 53], а транслокация по m-bcr – к появлению химерного белка BCR-ABL (встречающегося в литературе под названиями p185^{BCR-ABL} [54] или p190^{BCR-ABL} [55]), который специфичен для острого лимфоидного лейкоза (ОЛЛ) [54, 55]. У 65% пациентов с ХМЛ также обнаруживают короткий химерный транскрипт ABL-BCR [56], кодирующий белок p40^{ABL-BCR}, в то время как длинный химерный транскрипт ABL-BCR, кодирующий белок p96^{ABL-BCR}, обнаруживается у 100% пациентов с ОЛЛ, ассоциированным с этой транслокацией [57]. Различен и механизм лейкемогенеза. Так, p210^{BCR-ABL} способен сам по себе, то есть в отсутствие p40^{ABL-BCR}, индуцировать и поддерживать лейкоз, в то время как при ОЛЛ оба химерных белка – p96^{ABL-BCR} и p185^{BCR-ABL}/p190^{BCR-ABL} – участвуют в развитии болезни [58]. Кроме того, при этой транслокации, наряду с химерными, экспрессируются и нормальные гены [59, 60].

В ряде случаев было показано, что экспрессируется только химерная аллель, а экспрессия нормальной аллели оказывается подавленной. Так, например, при лимфоме Беркитта, 90% случаев которой ассоциировано с транслокациями между хромосомами 8 и 14 [61], активирована химерная аллель, в то время как нормальная аллель гена *MYC*, находящаяся на хромосоме 8, не транскрибируется [61, 62]. Продукты химерных генов могут сами участвовать в подавлении экспрессии нормальных генов, например, химерные белки AML1-ETO и PML-RARA репрессируют транскрипцию своих нормальных генов *AML1* и *RARA* через образование транскрипционного ко-репрессорного комплекса, содержащего гистон-деацетилазу [63].

ИЗ ИСТОРИИ ОТКРЫТИЯ ХРОМОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Роль генетических изменений в возникновении онкологических заболеваний долгое время была предметом споров. Еще в 1890 г. Давид Пауль фон Ганземан наблюдал асимметричное деление ядер при митозе в человеческих раковых клетках. Он предположил, что в основе перерождения нормальных клеток в злокачественные лежат хромосомные нарушения и что эти нарушения возникают при делении клеток [64].

И только через 70 лет, в 1960 году, Питер Ноуэлл и Дэвид Хангерфорд [65], изучая лейкоциты больных хроническим миелоидным лейкозом, обнаружили укороченную 22 хромосому. Эту хромосому впоследствии стали называть «филадельфийской» (от Филадельфии – города, в котором было сделано это открытие) [66]. Это стало первым примером существования связи между конкретной хромосомной перестройкой и определенным типом онкологического заболевания. Тем самым было доказано, что злокачественные опухоли могут возникать в результате хромосомных изменений в соматических клетках. Долгое время до этого считалось, несмотря на предположение Ганземана, что возникновение многочисленных хромосомных аномалий в клетках злокачественных опухолей является проявлением нестабильности генома¹ таких клеток и хромосомные аномалии являются только следствием, а не причиной злокачественной трансформации клеток [66]. Последующий поиск точного места перекреста привел к открытию генов, вовлеченных в транслокацию, и выяснению функций кодируемых этими генами белков, в том числе, химерных. Это, в свою очередь, привело к обнаружению ингибиторов данных белков и обеспечило прогресс в лечении онкологических заболеваний.

Между открытиями Ганземана и Ноуэлла, Хангерфорда пролегал целая эпоха, как историческая, так и научная. Перечислим лишь некоторые открытия, которые были сделаны в этот промежуток времени и так или иначе способствовали обнаружению транслокаций и выяснению их роли в возникновении злокачественных заболеваний. Некоторые открытия, хотя напрямую и не относятся к транслокациям, настолько глобальны, что их невозможно не упомянуть, так как они являются историческими вехами в развитии генетики и молекулярной биологии.

¹Нестабильность генома действительно является неотъемлемым свойством и признаком клеток злокачественных опухолей. Она заключается в увеличении вероятности возникновения и закреплении в ряду клеточных поколений разнообразных изменений генома [67].

Д.Ганзман высказал свое предположение всего через два года после того, как в 1888 г. Г.Уолдер ввел термин «хромосома» (что означает в переводе с греческого «chroma» окрашенный и «soma» – тело) [68] для обозначения структур, вовлеченных в процесс, представляющий собой серию изменений в ядре и названный У.Флеммингом в 1878 г. «кариомитозом» (karyomitosis – нитевидный метаморфоз) [69, 70].

В 1909 г. Ф.Янссенс при изучении мейоза в половых клетках саламандры открыл кроссинговер – явление обмена участками между гомологичными хромосомами [71].

В 1910-х годах Т.Х.Морган с сотрудниками в результате интенсивных исследований хромосом дрозофилы сформулировал и экспериментально подтвердил хромосомную теорию наследственности [72, 73].

В 1914 г. Т.Бовери опубликовал хромосомную теорию рака [74]. Открытия, сделанные уже в наше время, подтвердили справедливость его теории. Основными положениями теории Бовери являлись предположения, что рак – это клеточная проблема, что раковая опухоль происходит из одной клетки и эта клетка имеет неправильный хроматиновый комплекс, а хромосомные аномалии передаются всем дочерним клеткам и являются причиной неограниченного размножения клеток опухоли [75]. Теория Бовери долгие годы оставалась без внимания, так же, как в свое время остались без внимания законы наследственности, открытые Г. Менделем в 1865 г. [76] и переоткрытые уже другими учеными в 1900 г. [77].

В 1921 ученик Т.Моргана А.Стертевант обнаружил, что хромосомы могут обмениваться не только гомологичными, но и другими участками [78]. Для подобных хромосомных перестроек, обнаруженных в клетках *Datura stramonium* (дурмана обыкновенного), Д.Беллинг и А.Блексли предложили термин «сегментный взаимообмен» [79]. В 20-х же годах прошлого века другой ученик Т.Моргана Г.Мюллер, облучая дрозофилу, и Л. Стадлер, облучая ячмень и кукурузу, обнаружили, что рентгеновское излучение вызывает разнообразные хромосомные нарушения [80, 81]. Обилие полученных мутаций дало новый материал для исследований.

В 1931 г. Барбара МакКлинтон открыла мобильные гены (транспозоны), способные перемещаться по геному [82]. В 1944 г. О.Т.Эвери, с К.МакЛеодом и М.МакКарти, проводя опыты по трансформации бактерий, выяснили, что наследственным материалом является ДНК [83]. В 1953 г. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик расшифровали структуру ДНК [84]. В 1956 г. Джо Хин Тижо и Альберт Леван

установили точное число хромосом у человека [85]. Они обнаружили, что число хромосом у человека равно 46, а не 48, как считалось прежде. Это событие впоследствии назвали рождением цитогенетики человека [86]. В 1960 году Питер Ноуэлл и Дэвид Хангерфорд обнаружили филадельфийскую хромосому [65]. В 1968 г. Торнбёрн Касперссон с сотрудниками при окрашивании хромосом растений акрихином получил хромосомы с поперечной исчерченностью [87], представляющей собой чередование темных и светлых полос различной интенсивности. (Схематично такие полосы изображены на рис. 1.) Это позволило идентифицировать не только хромосомы, но и их участки. Затем этот метод был применен и для окрашивания человеческих хромосом [88].

В 1971 году на конференции цитогенетиков в Париже была разработана и принята номенклатура хромосом, согласно которой хромосомам присвоили номера в порядке уменьшения их размера, а хромосомные полосы пронумеровали, начиная нумерацию от центромера. Исключение было сделано для хромосомы, утробной при синдроме Дауна и уже названной прежде «21-ой». Чтобы не вносить путаницу, за этой хромосомой оставили номер 21, и таким образом, получилось, что 22-ая хромосома длиннее 21-ой. Также было утверждено решение Чикагской конференции от 1966 г. о том, чтобы обозначать короткое плечо хромосом буквой «р», а длинное плечо – буквой «q» [89] (рис. 1). В 1972 году она же – Жанет Роули, обнаружила транслокацию между 8 и 21 хромосомами – первую транслокацию, ассоциированную с конкретным заболеванием – с острым миелоидным лейкозом [90]. В 1973 г. Жанет Роули обнаружила, что «филадельфийская» хромосома образуется в результате транслокации между 9 и 22 хромосомами [91]. В 1976 г. была обнаружена транслокация между 8 и 14 хромосомами, ассоциированная с лимфомой Беркитта [92], – транслокация, для которой раньше, чем для других транслокаций, были идентифицированы участвующие в ней гены – *MYC* и вариативная область генов тяжелых цепей иммуноглобулинов [93–95]. В 1982–1984 годы слитые гены филадельфийской хромосомы были идентифицированы как онкоген *ABL* (chr9) и *BCR* (chr22) [51, 96]. В 1991 году были идентифицированы гены, участвующие в транслокации между 8 и 21 хромосом (*AML1* и *ETO*) [97, 98].

С тех пор было обнаружено много хромосомных транслокаций, ассоциированных с злокачественными новообразованиями, и генов, вовлеченных в этот процесс [66, 31].

ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ,
АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЛЕЙКОЗОМ*Лейкозы*

Лейкоз – злокачественная опухоль кроветворной системы, возникающая в костном мозге. При лейкозах кровяные клетки способны размножаться на более поздних стадиях гемопоэза, чем в норме. При острых лейкозах размножаются клетки, находящиеся на стадиях дифференцирования, а при хронических лейкозах – зрелые или практически зрелые [99]. Эти клетки не способны функционировать так, как нормальные клетки крови. В результате, снижение количества и утрата функций нормальных клеток приводят к анемии, подавлению иммунитета (и, как следствие, к инфекционным заболеваниям), кровотечениям, негативным метаболическим последствиям повышенного клеточного оборота, а циркуляция в организме недифференцированных клеток приводит к появлению лейкозных инфильтратов в различных органах [100]. Течение острых лейкозов имеет агрессивный характер и без лечения они очень быстро приводят к летальному исходу (в течение недель или месяцев). При хроническом лейкозе больные могут жить без лечения в течение нескольких месяцев и лет [101].

В 2001 году ВОЗ в сотрудничестве с Обществом Гематопатологии и Европейской Ассоциацией Гематопатологии опубликовала «Классификацию Опухолей кроветворной и лимфоидной тканей» в рамках 3-его издания серии «WHO Classification of Tumors» [102]. Эта классификация использует всю имеющуюся информацию – морфологическую, цитохимическую, иммунофенотипическую, генетическую, клиническую – для определения клинически значимых проявлений болезни. В зависимости от того, дифференцировка каких клеток-предшественников нарушается, лейкозы делят на миелоидные и лимфоидные [102]. Если нарушена дифференцировка лимфоцитов, то это лимфоидный лейкоз, если других клеток крови, то это миелоидный лейкоз. В классификации ВОЗ, термин «миелоидный» включает все клетки, принадлежащие к гранулоцитарному, моноцитарному, эритроидному и мегалоцитарному рядам [45].

Таким образом, выделяют четыре основных типа лейкозов: ОМЛ – острый миелоидный лейкоз, ОЛЛ – острый лимфоидный лейкоз, ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз, ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз [103]. Миелоидные лейкозы называют еще миелобластами [104], острые миелоидные лейкозы – миелобластными [105, 106], лимфоидные лейкозы – лимфобластами [104, 105], а острые лимфоидные лейкозы – лимфобластными [105, 106]. Примерная частота встречаемости и другие особенности разных типов лейкозов приведены в табл. 1.

Таблица 1.
Разные типы лейкозов в США (по данным Национального Института рака США [103]).

	Тип лейкоза*						Все лейкозы
	ОМЛ ¹	ОЛЛ	ХМЛ	ХЛЛ	Другие типы		
Число заболевших в 2009 г.	12810	5760	5050	15490	5680		44790
<i>из них мужчин</i>	6920	3350	2930	9200	3230		25630
<i>из них женщин</i>	5890	2410	2120	6290	2450		19160
Число умерших в 2009 г.	9000	1400	470	4390	6610		21870
Частота заболевания от всех случаев лейкоза в 2009 г.**,%	29	13	11	35	13		
Число заболевших в год на 100000 человек (по данным 2002–2006 г.г.)	3,5	1,6	1,5	4,1	1,5		12,2
Число умерших в год на 100000 человек (по данным 2002–2006 г.г.)	2,8	0,5	0,4	1,5	2,1		7,3
Пятилетняя выживаемость при данном типе лейкоза (по данным 1999–2005 г.г.), %	23	65	56	76			53
Вероятность заболеть в течение жизни (по данным 2004–2006 г.г.), %	0,37	0,12	0,16	0,47			1,28
Средний возраст постановки диагноза заболевшим, лет	67	13	66	72			66
Средний возраст смерти больных, лет	72	48	73	79			74

* – ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ОЛЛ – острый лимфоидный лейкоз; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз.

**Из данных, приведенных в первой строке таблицы.

Эпидемиология лейкозов

В России лейкозами в 2006 г. заболели 33% мальчиков и 31% девочек от всех детей (0–14 лет), заболевших злокачественными новообразованиями, что в зависимости от возраста составило 5,1 (0–4 года), 3,7 (5–9 лет), 2,6 (10–14 лет) заболевших на 100000 детей [107]. Среди всех возрастов лейкозами заболели 2,4% у мужчин и 2,1% у женщин, заболевших злокачественными новообразованиями, что составило 7,5 заболевших на 100000 человек [104]. Хотя из приведенных данных следует, что лейкозы в среднем у взрослых встречаются не реже, чем у детей, тем не менее наблюдается приблизительно двукратное уменьшение заболеваемости лейкозами в возрасте 20–45 лет по сравнению с заболеваемостью до 20 лет (рис. 2). Отличается также частота разных типов лейкоза: у детей хронические лейкозы редки и практически не встречается ХЛЛ, в то время как у взрослых хронические лейкозы преобладают (рис. 2).

В России в 2006 г лейкозы стали причиной смерти 34,4% мальчиков и 29,4% девочек, умерших от всех злокачественных заболеваний [108], что в зависимости от возраста составило 1,9 (0–4 года), 1,2 (5–9 лет), 1,1 (10–14 лет) умерших на 100000 детей [107]. Среди

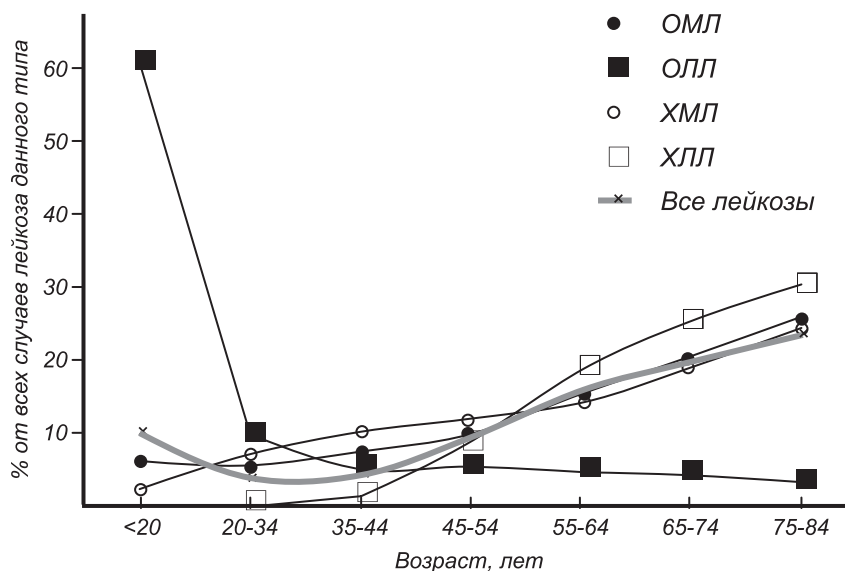


Рис. 2. Заболеваемость лейкозами в зависимости от возрастной группы в 2002–2006 гг. в США.

График составлен по данным Национального Института рака США [103].

взрослых от лейкозов умерли 5,4 из 100000 человек, причем у мужчин лейкозы составили 2,5%, а у женщин – 2,9% в структуре смертности от всех злокачественных заболеваний [108].

В США лейкозы входят в десятку наиболее распространенных злокачественных заболеваний и на 1 января 2006 г. лейкозами болели или находились в ремиссии 231856 человек [102]. Лейкозами в США в 2006 г. заболели 30,6% детей (0–14 лет) (всего 2779 детей, из них 2180 с диагнозом ОЛЛ и 373 с диагнозом ОМЛ) от всех заболевших онкологическими заболеваниями, что составило 4,7 заболевших на 100000 детей. Умерли от лейкозов 28,7% детей (всего 417 детей, из них 188 от ОЛЛ и 137 от ОМЛ) от всех умерших от злокачественных заболеваний или 0,7 умерших на 100000 детей [109]. Другие статистические данные по разным типам лейкозов приведены в табл. 1.

Хромосомные транслокации, ассоциированные с лейкозом

Неслучайно транслокации были обнаружены при лейкозе: 40-50% случаев ОМЛ ассоциировано с хромосомными транслокациями, а 95% случаев ХМЛ ассоциировано с филадельфийской хромосомой, образующейся при транслокации $t(9;22)(q34;q11.2)$ (табл. 2 и [110]). В настоящее время известно около 500 хромосомных транслокаций, ассоциированных с лейкозами [111].

Частоты наиболее распространенных (но далеко не всех часто встречающихся) хромосомных аномалий при разных типах лейкозов приведены в табл. 2. Надо заметить, что частота конкретной хромосомной аномалии сильно зависит от возраста пациентов. Например, с возрастом у больных ОЛЛ увеличивается доля $t(9;22)$ (3% у детей и 25% у взрослых) и уменьшается доля $t(12;21)$ (22% у детей и 2% у взрослых) [112]. У детей до 1 года, больных ОМЛ, мажорными являются транслокации 11-ой хромосомы (более 30% всех случаев ОМЛ), наиболее частая из которых $t(4;11)$, в то время как во всех других возрастных группах эти транслокации встречаются в 1–3% случаев ОМЛ [89]. У детей до 1 года практически не встречается транслокация $t(8;21)$, зато она наиболее частая в возрасте 1–19 лет: на ее долю приходится 15% случаев ОМЛ в этой возрастной группе [89].

Поиск точек разрыва при хромосомных транслокациях оказался одним из наиболее эффективных способов выявления новых генов, которые участвуют в регуляции клеточного роста и в индукции злокачественной трансформации. Так, например, обнаружение хромосомной транслокации $t(8;21)$ привело к открытию гена *AML1*, расположенного на 21-ой хромосоме и кодирующего одноименный транскрипционный фактор гематопозза [97].

Таблица 2.
Наиболее частые хромосомные аномалии при острых лейкозах

Хромосомная аномалия	Вовлеченные гены	Частота обнаружения при данном типе лейкоза, %			
		ОМЛ [63]	ОЛЛ [63, 259]	ХМЛ [259, 260]	ХЛЛ [261]*
t(8;21)(q22;q22)**	<i>AML1-ETO</i>	5–12			
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	3–10			
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARA</i>	6–15			
t(11q23)	<i>MLL</i>	5–8	7–10		
del(5q)		1–11			
del(7q)		1–7			
Трисомия 8-ой хромосомы		3–10			
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	1–2	5–25	90–95	
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>		10–25		
t(1;19)(q23;p13.3)	<i>TCF3-PBX1</i>		2–5		
t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3-HLF</i>		1		
t(8;14), t(2;8), t(8;22)	<i>MYC</i>		1–2		
Трисомия 12-ой хромосомы					13
del(13q14)					45
del(11q22-q23)					15
del(17p13)	<i>TP53</i>				6
del(6q21)					5
Гипердиплоидность (>50 хромосом)			10–25		
Гиподиплоидность (<45 хромосом)			1–5		
Нормальный кариотип		30–50	20–45		18

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ОЛЛ – острый лимфоидный лейкоз; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз.

* – данные пересчитаны как проценты от всех случаев ХЛЛ (в оригинальной статье приведены как проценты от всех хромосомных аномалий при ХЛЛ).

** – рекуррентные аномалии по классификации ВОЗ выделены жирным шрифтом.

Расшифровка аббревиатур генов (синонимы даны в соответствии с базами данных «GenAtlas» [113] и «Genecards» [43]; подчеркнут основной вариант названия в соответствии с Номенклатурой HGNC [262]:

AML1 (RUNX1, PEBP2A2, CBFA2, AMLC1, RUN1, EVI13, TSG21A, AML1-EVI-1, EVI-1) – acute myeloid leukemia.

Окончание табл. 2. см. на сл. стр.

Окончание табл. 2.

BCR (*ALL, CML, PHL, D22S11, D22S662, BCR-ABL1, BCR1, FLJ16453*) – breakpoint cluster region.

CBFB (*PEBP2B*) – core-binding factor, beta subunit.

ETO (*RUNX1TL, MTG8, AMIL1T1, CDR, CBFA2T1, MGC2796, MTG8b, ZMYND2*) – *ETO* – eight twenty one protein, *MTG8* – myeloid translocation gene on 8q22.

HLF – hepatic leukemia factor.

MLL (*EC 2.1.1.43, ALL1, CDK6/MLL fusion protein, CXXC7, FLJ11783, HRX, HRX1, HTRX, HTRX1, KMT2A, MLL/GAS7, MLL1A, MLL-AF4 der(11) fusion protein, TET1-MLL, TRX1*) – myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia.

MYH11 (*SMHC, SMMHC, AAT4, FAA4, FLJ35232, MGC126726, MGC32963, KIAA0866*) – myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle.

MYC (*c-MYC, bHLHe39, MRTL*) – v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian).

PBX1 (*HOXP, PMX1, DKFZp686B09108, MGC126627, PRL*) – pre-B cell leukemia homeobox 1.

PML (*MYL, TRIM19, PP8675, RNF71*) – promyelocytic leukemia.

RARA (*NR1B1, C13A4, RAR, RAR-alpha*) – retinoic acid receptor, alpha.

TCF3 (*E2A, ITF1, TCFE2A, EVI104, TFE2, MGC129647, MGC129648, bHLHb21, VDIR*), – transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47).

TEL (*ETV6, TEL/ABL, TEL1*) – TEL oncogene.

TP53 (*LFS1, TRP53, p53, FLJ92943*) – tumor protein p53.

Многие гены получили свои названия по типу лейкозов, при которых их обнаружили, например, название гена *AML1* происходит от типа лейкозов, которые возникают при его нарушениях, – «acute myeloid leukemia», что означает «острый миелоидный лейкоз» (другие примеры такого рода названий приведены в подписи к табл. 2). Ген *BCR*, вовлеченный в транслокацию t(9;22), получил свое название от «breakpoint cluster region» («область скопления точек разрыва») при идентификации точек разрыва в 22-ой хромосоме в участке слияния этого гена с геном *ABL* [96].

Как выяснилось позже, многие из открытых таким образом генов, в частности, представленных здесь, кодируют киназы – тирозиную (*ABL*) или сериновую (*BCR*) – и ключевые факторы транскрипции (*AML1, MLL, PML, ETO, PBX1*) [33, 66, 113, 114]. Понятно, что при изменении таких генов нарушается целый ряд процессов в организме.

Хромосомные транслокации, ассоциированные с острым миелоидным лейкозом

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – агрессивный тип лейкоза, чаще возникающий в раннем детстве и в пожилом возрасте [115].

К рекуррентным (периодически повторяющимся) хромосомным аномалиям при ОМЛ по классификации ВОЗ от 2001 г.

относят $t(8;21)(q22;q22)$ (*AML1-ETO*), $inv(16)(p13q22)$ или $t(16;16)(p13;q22)$ (*CBF-MYH11*), $t(15;17)(q22;q12)$ (*PML-RARA*) и аномалии 11q23 (*MLL*), составляющие 30% всех случаев ОМЛ [116] и имеющие благоприятный прогноз [117]. В 2008 году к рекуррентным хромосомным аномалиям при ОМЛ были добавлены $t(6;9)(p23;q34)$ (*DEK-NUP214*), $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$ (*RPNI-EVII*), $t(1;22)(p13;q13)$ (*RBM15-MKLI*) [45].

Хромосомная транслокация $t(8;21)(q22;q22)$

Диагностику онкологических заболеваний, ассоциированных с транслокациями, мы разрабатывали на примере диагностики лейкоза, ассоциированного с транслокацией $t(8;21)(q22;q22)$. Этот вариант лейкоза составляет до 12% всех случаев острых миелоидных лейкозов (табл. 2) и имеет благоприятный прогноз [118]. Пятилетняя выживаемость пациентов (в возрасте до 55 лет) при этой хромосомной аномалии составляет от 60% до 70% [119].

При этой транслокации в результате слияния генов *AML1* (находится на 21 хромосоме, номер в ген банке D43969) и *ETO* (находится на 8 хромосоме, номер в ген банке D14289) образуется химерный ген *AML1-ETO* [98], при экспрессии которого синтезируется мРНК *AML1-ETO*, являющаяся маркером данного вида лейкоза [3, 46]. В соответствии с номенклатурой HGNC эта мРНК имеет название *RUNX1-RUNX1T1* (табл. 2).

Ген *AML1*, длиной 150 т.п.о., включает в себя 9 экзонов [3] и кодирует ключевой транскрипционный фактор кроветворения, регулирующий экспрессию целой группы генов [120, 121, 122]. Помимо $t(8;21)(q22;q22)$, ген *AML1* участвует еще, по крайней мере, в 31 транслокации, из которых три, как и в случае *AML1-ETO*, вовлекают восьмую хромосому [123]. Ген *ETO*, длиной 87 т.п.о., включает в себя 13 экзонов [3] и кодирует транскрипционный корепрессор, взаимодействующий с другими корепрессорами, в том числе с гистон-деацетилазами [124, 125].

Точки разрыва генов при $t(8;21)(q22;q22)$ приходится на интроны, и, хотя обнаружено несколько областей точек разрыва и слияния генов [126], при этой транслокации образуется единственный тип химерного транскрипта *AML1-ETO*, в котором экзон 5 гена *AML1* слит с экзоном 2 гена *ETO* и область стыка в мРНК *AML1-ETO* у всех больных этим видом лейкоза совпадает с точностью до нуклеотида [46, 127, 128].

В работах 1990-х гг. были указания на существование вариантов альтернативного сплайсинга со сдвигом рамки считывания, в которых

между пятым экзоном *AML1* и вторым экзоном *ETO* присутствуют вставки длиной 46–82 нт [129, 130]. Однако во всех случаях такие варианты были дополнительными к основному варианту [129, 130], и не исключена возможность, что эти варианты возникли как артефакты при использовании ретровирусных полимераз для обратной транскрипции [131] и/или полимераз из термостабильных организмов для ПЦР [2, 132, 133].

Были обнаружены варианты альтернативного сплайсинга мРНК *AML1-ETO*, кодирующие укороченный химерный белок, однако имеющие в области стыка ту же последовательность, что и основной вариант [134, 135].

Последствия транслокации многогранны [125]. Анализ влияния транслокаций, в том числе, $t(8;21)$, показал, что при ОМЛ наблюдаются изменения профиля экспрессии более 1000 генов, вовлеченных в транскрипцию, клеточный цикл, синтез белка и апоптоз [136]. Недавние исследования выявили разностороннюю способность химерного белка *AML1-ETO* непосредственно ингибировать ключевые транскрипционные факторы кроветворения, являющиеся супрессорами злокачественных опухолей в нескольких узловых точках дифференцировки [137].

*Достаточно ли хромосомной транслокации
для возникновения заболевания?*

Хромосомные транслокации является частым и генетически ранним, иницирующим событием, но необязательно приводящим к заболеванию [138].

Изучение случаев лейкоза у монозиготных близнецов и ретроспективное исследование архивных неонатальных пятен крови показали, что часто (но не всегда) хромосомные транслокации, ассоциированные с детскими лейкозами, возникают в утробе матери [139–141]; причем, латентный период в некоторых случаях превышает 10 лет [142]. Возможна также пренатальная передача лейкозного клона от матери к ребенку [143, 144].

Хромосомная транслокация не обязательно приводит к онкологическому заболеванию. Например, транслокации $t(8;21)$ и $t(12;21)$ обнаруживаются в клетках пуповинной крови у новорожденных с частотой в 100 раз большей, чем детская заболеваемость соответствующим типом лейкоза [145]. В большинстве случаев для возникновения лейкоза нужны дополнительные генетические изменения [146, 47], то есть нужен «второй удар» [147–149]. Так, например, было показано возникновение лейкоза в ситуациях, когда *ETO*-часть химерного

белка теряет способность связываться с гистон-деацетилазным комплексом [150]. Утрата этой способности может вызываться разными причинами: отсутствием в ЕТО-части связывающего домена [135] из-за ранней терминации трансляции (например, из-за возникновения раннего стоп-кодона в результате альтернативного сплайсинга [151], 135) или протеолитического расщепления, а также из-за мутаций в самом гистон-деацетилазном комплексе [152]. Генетическим изменениям и перерождению прелейкозного клона в злокачественный могут способствовать и другие факторы [115], в том числе неправильный иммунный ответ на инфекцию [153].

Необходимость дополнительных генетических изменений для возникновения заболевания не умаляет терапевтической и диагностической значимости выяснения вида транслокации при возникновении заболевания и слежения за химерными продуктами в процессе лечения. Возникнув, болезнь стойко связана с существованием злокачественного клона клеток, несущего хромосомную транслокацию, и наличием в клинических образцах маркерной химерной РНК [110, 154].

III. МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ

ЧТО ТАКОЕ МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ

Важной характеристикой онкологических заболеваний, в том числе лейкозов, является минимальная остаточная болезнь (МОБ) – состояние организма после лечения, при котором сохраняется популяция опухолевых клеток, не выявляемая при стандартном цитологическом исследовании крови и костного мозга, но выявляемая более чувствительными методами [110] (см. «Методы диагностики минимальной остаточной болезни»).

В последнее время, в связи с появлением эффективных противолейкозных препаратов и развитием чувствительных методов детекции молекулярных маркеров лейкозов, стали различать клинико-гематологическую ремиссию, когда нет клинических проявлений [4, 155], и «молекулярную ремиссию». Есть некоторое расхождение в определении термина «молекулярная ремиссия». Одни авторы под «молекулярной ремиссией» подразумевают «стойкое длительное отсутствие специфического РНК-маркера или сохранение его низкого уровня в крови и костном мозге» [156]. Другие источники определяют «молекулярную ремиссию» как полное отсутствие специфического РНК-маркера в крови и костном мозге при использовании для

детекции самого чувствительного на сегодняшний день метода – ПЦР [157]. Такое же разночтение наблюдается и с определением «молекулярного рецидива». В качестве консенсуса «молекулярный рецидив» можно определить как «появление РНК-маркера или увеличение его количества во время гематологической ремиссии» [156].

Вероятно, причина отсутствия четких критериев молекулярной ремиссии и молекулярного рецидива кроется в том, что неизвестно, какое количество маркерной РНК можно считать «низким уровнем» или какое ее количество содержится в крови и костном мозге, когда она не детектируется, и какой продолжительности должно быть «стойкое длительное отсутствие» маркерной РНК, чтобы не было опасности рецидива.. Неопределенность этих параметров связана с ограничениями методов, используемых для определения МОБ, в частности, с проблемами традиционной ПЦР (то есть ПЦР, проводимой в жидкости) [8].

АКТУАЛЬНОСТЬ ОБНАРУЖЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Исследование молекулярных механизмов лейкогенеза способствовало выявлению молекулярных мишеней для терапевтического воздействия [63, 158]. Применение новых химиопрепаратов привело к значительному улучшению результатов лечения разных типов лейкозов [119, 159–161].

В момент постановки диагноза острого миелоидного лейкоза в крови или костном мозге обнаруживают 20% и более бластных клеток – слабо дифференцированных клеток, которые в норме и при клинико-гематологической ремиссии практически отсутствуют в периферической крови и составляют менее 5% клеток костного мозга [45, 110]. При использовании современной интенсивной химиотерапии ремиссия наступает у 60–80% больных ОМЛ [154].

Однако без применения дополнительной терапии почти во всех случаях ОМЛ в течение нескольких недель или месяцев возникает рецидив [154] (возобновление клинических проявлений, часто начинающееся с появления очагов лейкозной инфильтрации [162]). Оставшиеся после лечения лейкозные клетки могут стать устойчивыми к противолейкозной терапии и привести к повышению уровня МОБ, несмотря на то, что цитоморфологически пациент остается в ремиссии [154]. В большинстве случаев происходит возобновление роста популяции лейкозных клеток, что приводит к клиническому рецидиву. Именно от рецидивов, которые при лейкозе, ассоциированном с $t(8;21)(q22;q22)$, наблюдаются в 30–50% случаев [163, 164], больные в конечном итоге умирают.

Количественная диагностика МОБ важна практически на всех стадиях лечения болезни [165]. При использовании современных препаратов на ранних этапах лечения содержание лейкозных клеток быстро снижается до цитологически недетектируемого уровня и определение МОБ на этом этапе лечения служит прогностической информацией, превосходящей все известные классические прогностические факторы [166]. Исследования показали, что пациенты с недетектируемой МОБ имеют отличный прогноз и являются хорошими кандидатами для деинтенсификации лечения или, по крайней мере, не должны подвергаться дальнейшей интенсификации лечения. В отличие от пациентов с высоким уровнем МОБ, которые нуждаются в экстренной необходимости интенсификации лечения и даже использовании для лечения новых подходов [110, 166, 167]. Предпосылками успешной пересадки костного мозга являются максимальное снижение МОБ до пересадки [168, 166] и благоприятные результаты отслеживания кинетики МОБ после пересадки костного мозга [169]. Особенно важно следить за МОБ в ремиссии для раннего обнаружения и предотвращения надвигающегося рецидива [154, 170].

Принимая все это во внимание, можно сделать вывод, что отслеживание МОБ важно не только для контроля течения и прогноза заболевания, но также для выбора наиболее эффективной и сопряженной с меньшим риском стратегии лечения [154], и поэтому определение МОБ необходимо включать во все протоколы лечения с целью выяснения эффективности выбранной лечебной процедуры для данного пациента [166].

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Методы, используемые для определения МОБ, должны отвечать следующим требованиям: высокая чувствительность, специфичность, точное измерение количества маркера, техническая осуществимость (простота стандартизации и быстрое получение результатов для клинического применения), а также внутрилабораторная и межлабораторная воспроизводимость [166].

МОБ определяют с применением разных методов: флюоресцентной *in situ* гибридизации, проточной цитометрии и ПЦР [44]. Чувствительность диагностики МОБ выражают величиной, обратной числу нормальных клеток, приходящихся на одну выявленную лейкозную клетку.

Флуоресцентная in situ гибридизация

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) заключается в гибридизации интерфазных или метафазных хромосом с ген-специфическими флуоресцентными зондами и подсчетом меченых хромосом с помощью флуоресцентного микроскопа.

Чувствительность FISH зависит от типа зондов, числа исследуемых клеток [44] и находится в диапазоне 10^{-1} – 10^{-3} , при этом транслокации обнаруживаются с меньшей чувствительностью, чем потери или увеличение числа хромосом [110].

В вариантах FISH, известных как SKY (spectral karyotyping – спектральное кариотипирование) и M-FISH (мультиплексный FISH) используют наборы зондов, специфичных к разным хромосомам и окрашенных в разные цвета [44]. Когибридизация разных зондов с метафазными хромосомами позволяет выявить комплекс генетических нарушений, в том числе транслокации [171]. Метод заключается в приготовлении метафазных хромосом, подготовки их к гибридизации, собственно гибридизации, сканировании, обработки изображения и занимает около 6 дней [171].

FISH применим в 40–60% случаев, и, помимо невозможности анализа большого числа клеток, его чувствительность ограничена ложноположительными результатами из-за случайной колокализации сигналов [110].

Проточная цитометрия

Метод основан на том, что лейкозные клетки имеют аномальный иммунофенотип – LAIP (leukemia-associated aberrant immunophenotypes). Процедура определения МОБ с помощью проточной цитометрии состоит в следующем: выделяют ядерные клетки крови или костного мозга, затем их инкубируют с моноклональными антителами, специфичными к поверхностным антигенам лейкозных клеток и мечеными флуоресцентными группами, и пропускают через проточный цитометр, регистрируя флуоресцентный сигнал от клеток, несущих антитело [44]. Наиболее точные результаты получают с помощью мультипараметрической проточной цитометрии при использовании до 6 антител, меченных разными флуорофорами [172, 173, 174, 175]. К достоинствам метода относят применимость в тех ситуациях, когда отсутствуют генетические маркеры (химерные гены или другие генетические аномалии) относительно дешевизну и быстроту (1–2 дня) [175].

Теоретически чувствительность метода может достигать 10^{-6} , но на практике она гораздо ниже [175]. Факторы, снижающие чувств-

вительность проточной цитометрии, следующие: (1) недостаточное различие антигенных профилей опухолевых и нормальных клеток, (2) существование нескольких субпопуляций лейкозных клеток, некоторые из которых малочисленны и поэтому трудно определяемы, (3) неспособность отследить изменение иммунофенотипа лейкозных клеток в период между диагнозом и рецидивом, (4) необходимость подсчета большого числа клеток и использования высоко квалифицированных кадров [175], (5) потеря клеток, зависящая от типа клеток и процедуры, используемой для их выделения [176].

Если иммунофенотип лейкозных клеток достаточно отличим от иммунофенотипа нормальных клеток, то чувствительность составляет 10^{-4} . В остальных случаях, когда иммунофенотипы лейкозных и нормальных клеток частично перекрываются, чувствительность детекции понижается до 10^{-3} [177].

Для достижения большей специфичности предлагалось для каждого пациента определять индивидуальный иммунофенотип лейкозных клеток, используя большой набор антител, и сравнивать этот иммунофенотип с иммунофенотипом нормальных клеток костного мозга того же пациента для нахождения максимальной разницы [154]. Однако на конференции в Бетезде в 2006 г. пришли к выводу, что даже при таком подходе в 50% случаев использования проточной цитометрии не удастся получить достоверные результаты. В целях сокращения финансовых затрат Международный Консенсус рекомендовал сводить к минимуму первоначальные исследования и направлять усилия на более интенсивный анализ образцов тех пациентов, у которых при первоначальных исследованиях выявляется ярко выраженный aberrантный иммунофенотип, при этом для первичного скрининга предлагается использовать около 30 видов антител [178].

Изменчивость иммунофенотипа лейкозных клеток в период между диагнозом и рецидивом, которая наблюдается у 90% пациентов [173], — еще более серьезная проблема, часто приводящая к невозможности детекции МОБ и возникающая, вероятно, либо из-за нестабильности генома злокачественных клеток, либо из-за экспансии при рецидиве небольшого пула лейкозных клеток, фенотипически отличающегося от основного и недетектируемого при постановке диагноза [154, 166]. Вероятно, со временем удастся выявить закономерности изменения иммунофенотипов лейкозных клеток, сопоставив эти изменения с рекуррентными генетическими нарушениями, свойственными тому или иному виду лейкоза, как, например, это удалось выявить для хромосомной транслокации $t(15;17)$ (*PML-RARA*) [179].

Полимеразная цепная реакция

Если лейкоз связан с образованием химерной РНК, то наиболее чувствительный и специфичный метод – это детекция маркерной РНК с использованием обратной транскрипции (ОТ) и последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР) [154]. Метод заключается в выделении из клинического образца суммарной РНК, синтеза кДНК с помощью обратной транскрипции и последующего размножения кДНК с использованием ПЦР. В ПЦР размножают область стыка составных частей химерной кДНК, используя праймеры, комплементарные последовательностям, лежащим по разные стороны от места стыка. Поскольку лишь при лейкозе данного вида эти последовательности оказываются в пределах одной молекулы, синтез ДНК при ОТ–ПЦР должен в идеале происходить тогда и только тогда, когда образец содержит соответствующую химерную РНК.

Наибольшее признание получил вариант метода, позволяющий детектировать продукт ПЦР в процессе синтеза – в режиме «реального времени». Этот вариант метода обозначают как RQ-PCR [173] или как qPCR (qRT-PCR) [180]. ПЦР проводят в присутствии флуоресцентных репортерных молекул (флуоресцентных интеркалирующих красителей и/или комплементарных ПЦР-продукту флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов), флуоресценция которых усиливается при взаимодействии с размноженной ДНК. Количество мишени оценивают по номеру цикла ПЦР, при котором флуоресцентный сигнал начинает превышать фон. Чем больше стартовое количество мишени, тем раньше наблюдается это превышение.

Чувствительность ОТ–ПЦР при детекции химерного транскрипта – 10^{-4} – 10^{-6} [173]. При рутинном использовании, как правило, не превышает 10^{-5} [181].

К факторам, ограничивающим чувствительность детекции РНК-мишени, относят подверженность РНК деградации и неопределенность (невоспроизводимость) выхода обратной транскрипции [177], ограниченную специфичность праймеров, снижающую чувствительность детекции в присутствии других нуклеиновых кислот [180], необходимость нормирования сигнала с использованием внешнего и внутреннего стандартов и связанная с таким нормированием несопоставимость данных разных лабораторий [154], невоспроизводимость измерения малых количеств мишени [180].

Если лейкоз не ассоциирован с образованием химерных транскриптов, то для детекции МОБ с помощью ОТ–ПЦР используют другие мишени, например, абберрантно экспрессируемые гены. Так, ген опухоли Вильмса (*WT1* – Wilms' tumor) имеет высокий уровень

экспрессии у 70% пациентов с диагнозом острого лейкоза и обнаружение в крови или в костном мозге мРНК этого гена говорит о наличии, продолжении или возобновлении заболевания [182]. Ограничением при таком подходе является высокий фон от РНК нормальных клеток костного мозга, который во многих случаях снижает надежность определения. [177].

Есть и другие потенциальные мишени для детекции МОБ, например: мутантный ген нуклеофосмина *NPM1*, экспрессия которого резко возрастает при ОМЛ [183]. Специфическими мишенями (как для обнаружения МОБ с использованием QRT-PCR, так и для терапии) могут быть miRNA, набор которых коррелирует с разными типами лейкозов [63].

Вероятно, не стоит спорить о том, какой из приведенных методов лучше. Каждый по-своему хорош в конкретной ситуации. На стадии постановки диагноза, когда количество лейкозных клеток в крови велико и не нужна высокая чувствительность анализа, но необходимо определить тип генетической аномалии и найти возможные маркеры, логично использовать FISH и другие цитологические методы.

Для диагностики МОБ, если болезнь ассоциирована с транслокацией и, соответственно, с появлением химерной РНК, предпочтительнее использовать количественную ОТ–ПЦР как наиболее чувствительный метод и как метод, детектирующий мишень, непосредственно связанную с лейкемогенезом [110, 154, 166]. Если же данный тип лейкоза не ассоциирован с транслокацией и химерного маркера нет, то тогда можно использовать мультипараметрическую проточную цитометрию (но при этом необходимо сначала определить иммунофенотип лейкозных клеток) и/или использовать количественную ОТ–ПЦР для определения других маркеров заболевания (иные генетические аномалии, гиперэкспрессия генов).

IV. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОКОЛОНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

НАНОКОЛОНИИ

Принцип нанокolonий

Нанокolonии (или молекулярные колонии) образуются, когда экспоненциальное размножение наномолекул, к которым относятся РНК и ДНК, проводят в твердой среде с нанометровыми порами [9, 12]. Ключевым моментом метода является иммобилизация среды. В такой среде отсутствует конвекция, в результате потомство каждой исходной молекулы не распространяется по всему реакционному

объему, как это происходит в жидкости, а концентрируется вокруг родительской молекулы, образуя колонию. Таким образом, каждая колония представляет собой потомство одиночной молекулы, то есть является молекулярным клоном, и состоит из идентичных молекул, что позволяет обнаруживать, подсчитывать и анализировать одиночные молекулы ДНК и РНК.

Для выращивания нанокolonий можно использовать любую ферментативную систему амплификации нуклеиновых кислот [6]. Один из вариантов этого метода – размножение ДНК в полиакриламидном геле с использованием полимеразной цепной реакции [9, 12, 19, 184]. При проведении ПЦР в тонком слое геля нанокolonии располагаются в одной плоскости, в результате чего получают их двумерное изображение. Простой подсчет нанокolonий позволяет прямо определить титр исходных молекул ДНК и РНК в образце.

Выращивание колоний ДНК

Так как ПЦР требует температурного циклирования в широком диапазоне температур, в том числе, нагрева до 92–94°C для расплавления двухцепочечной ДНК, то для выращивания колоний ДНК с помощью этой реакции используют термостойкую среду – полиакриламидный гель [9, 12]. Гель приготавливают в лунке, сделанной в предметном стекле для микроскопии [7, 19]. Гель полимеризуют, промывают и высушивают.

Если анализируют РНК, то сначала проводят обратную транскрипцию (ОТ), чтобы перевести РНК в форму ДНК. Непосредственно перед экспериментом гели пропитывают полной реакционной смесью, содержащей дезоксинуклеотиды, олигонуклеотидные праймеры, термостабильную ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и исследуемый образец – ДНК или кДНК, и герметизируют. Затем стекла с гелями помещают в термоциклер с плоской рабочей поверхностью (такие обычно используют для ПЦР *in situ*) и проводят температурное циклирование, то есть собственно ПЦР.

Для ОТ и ПЦР при обнаружении химерной AML1-ETO мРНК, являющейся маркером лейкоза, ассоциированного с транслокацией t(8;21), мы использовали праймеры, рекомендованные консорциумом «Европа против рака» (организацией, которая, в частности, занимается разработкой стандартов для диагностики лейкозов) для детекции МОБ [3].

Детекция химерных нанокolonий

Детектировать нанокolonии можно разными способами [18, 28, 185, 186]. Для детекции химерных колоний (то есть состоящих из молекул,

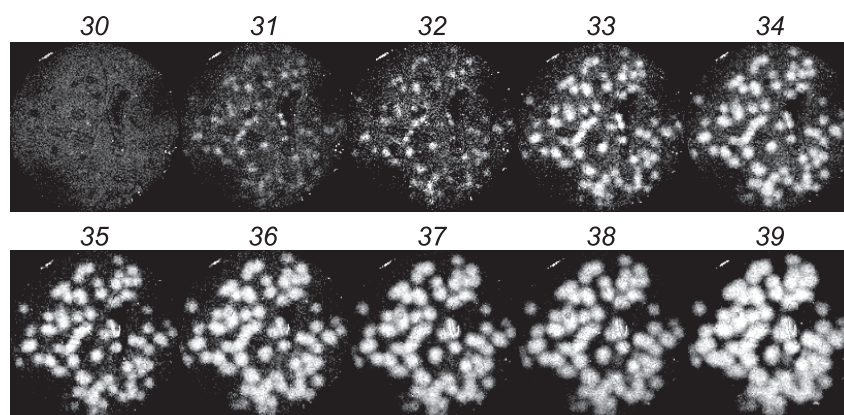


Рис. 3. Обнаружение химерной кДНК AML1-ETO в режиме «реального времени».

Колонии AML1-ETO кДНК получены с помощью асимметричной ПЦР в присутствии FRET-зондов. Числа обозначают номер цикла ПЦР, после которого гель сканировали с использованием синего лазера (488 нм) и красного эмиссионного фильтра (670 нм). Длина размножаемого ПЦР-продукта – 260 п.о.

несущих слитые последовательности фрагментов генов *AML1* и *ETO*) мы разработали 2 способа флуоресцентной детекции. Оба они основаны на гибридизации размноженной ДНК со специфическими зондами, комплементарными внутреннему участку размноженной мишени.

Один способ заключается в гибридизации нанокolonий на нейлоновой мембране [185, 187]: после ПЦР колонии переносят из геля на мембрану при помощи блотинга и затем мембрану гибридизуют со смесью двух независимых флуоресцентных зондов. Один зонд, специфичный к AML-части, мечен красным флуорофором (цианин-5 – Cy5), другой – специфичный к ETO-части – мечен зеленым флуорофором (цианин-3 – Cy3) (схема на рис. 6А). Далее эту мембрану сканируют с помощью флуоресцентного сканера в двух режимах: для красного и зеленого флуорофоров соответственно. Гибридизация колонии с двумя зондами, специфичными к разным генам, свидетельствует о том, что данная колония образована химерной молекулой.

Другой способ детекции заключается в гибридизации колоний прямо в геле, в реальном времени (рис. 3). Для этого была разработана система детекции, использующая FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии [188] – и представляющая собой пару гибридизующихся рядом зондов, на сближенных концах которых находятся флуорофоры: донор и акцептор (схема на рис. 6А). Для эффек-

тивного FRET расстояние между участками гибридизации зондов не должно превышать несколько нуклеотидов [189]. Гель сканируют в процессе ПЦР, возбуждая донор (при этом происходит резонансный перенос энергии на акцептор, который в результате такого переноса флуоресцирует) и регистрируя флуоресценцию акцептора. Зонды комплементарны AML1-ЕТО кДНК в месте стыка последовательностей AML1 и ЕТО, причем один зонд комплементарен AML-части, другой – комплементарен ЕТО-части.

Для обнаружения химерных РНК в клинической практике наиболее подходит второй способ. Во-первых, он не требует разгерметизации геля после амплификации мишени, что упрощает процедуру и сводит к минимуму риск перекрестного загрязнения образцов. Во-вторых, достаточно одного режима сканирования, сразу выявляющего только химерные колонии, то есть для выявления химерных колоний не нужно сопоставлять сканы, полученные для разных флуорофоров.

Вместо FRET-зондов можно использовать один зонд, комплементарный к месту стыка составных частей химерной кДНК: молекулярный бакен [190] или комбинацию интеркалирующего красителя и обычного зонда. Способность таких зондов выявлять нанокolonии была нами продемонстрирована [186]. Используя несколько таких зондов, меченных разными флуорофорами, можно выявлять нанокolonии, образованные разными мишенями при проведении мультиплексной ПЦР.

Некоторые транслокации, имеющие у разных пациентов разные участки разрыва и точки стыка, приводят к образованию нескольких вариантов химерных РНК с разной последовательностью в области стыка. Такое наблюдается при транслокациях $t(9;22)$ (*BCR-ABL1*), $t(4;11)$ (*MLL-AF4*), $t(15;17)$ (*PML-RARA*), $inv(16)$ (*CBFB-MYH11*) [46]. Поэтому в ситуации, когда вариант химерной РНК не установлен, для выявления химерных колоний в режиме реального времени (и одновременно идентификации варианта химерной РНК) полезно использовать набор молекулярных бакенов, меченных разными флуорофорами и комплементарных разным частям химерной последовательности или разным вариантам области стыка.

*Чувствительность обнаружения ДНК
с использованием нанокolonий*

Исследования показали, что число посеянных молекул ДНК-мишени в пределах статистического разброса совпадает с числом выросших нанокolonий [19, 20, 24]. Таким образом, нанокolonии позволяют

выявить 100% молекул ДНК. Другими словами, если в образце, внесенном в гель, окажется хотя бы одна молекула ДНК-мишени, она будет обнаружена, то есть чувствительность обнаружения ДНК-мишени составляет 1 молекулу.

Чувствительность обнаружения мишеней не уменьшается при проведении мультиплексной ПЦР (даже при разнице в концентрациях мишени более чем 10^6 раз), а также при проведении ПЦР в присутствии многократного по отношению к мишени избытка посторонней ДНК [19].

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА И ЕЕ РАЗРАБОТКА

Оптимальное качество анализируемого образца является необходимым условием для получения надежных количественных данных [191, 192], поэтому выход и целостность РНК в результате проведения ряда манипуляций (сбор образца, его консервация и транспортировка, а также выделение РНК) являются критическими параметрами для успеха анализа с использованием ОТ–ПЦР [180].

При разработке диагностики МОБ мы ориентировались на рекомендации консорциума «Европа против рака» для наблюдения МОБ с помощью ОТ–ПЦР [3, 5, 46, 193], так как рекомендации консорциума являются лучшим из всего, что существует в области диагностики минимальной остаточной болезни на сегодняшний день.

Материалом для диагностики МОБ с помощью ОТ–ПЦР является РНК, которую выделяют из крови или костного мозга пациента. Однако такие клинические образцы содержат большое количество рибонуклеаз, что делает выделение интактной РНК трудной задачей. Кроме того, кровь и костный мозг содержат много различных ингибиторов ОТ и ПЦР (гем, железо, полифенолы, полисахариды и др.). Максимальной чувствительности детекции достигают, только если сначала из крови или костного мозга выделяют моноядерные клетки, из которых уже затем выделяют РНК [173] (именно такая методика рекомендована консорциумом «Европа против рака» [193]). Такой подход избавляет от подавляющей массы ингибиторов обратной транскрипции и ПЦР, но обладает рядом недостатков, которые могут приводить как к ложноположительным (то есть когда химерной РНК в образце нет, но делается вывод о ее присутствии), так и к ложноотрицательным результатам (то есть к невыявлению химерной РНК, присутствующей в образце). Выделение моноядерных клеток является дорогой, длительной и технически сложной процедурой для рутинного использования в клинических лабораториях и велика опасность взаимного загрязнения образцов и, следовательно, ложноположительного результата. Кроме того, при

этом теряется 40–60% клеток [194], что затрудняет количественную оценку и велика опасность деградации РНК [195] и, следовательно, ложноотрицательного результата.

Поэтому нами был разработан метод выделения РНК не из фракционированных клинических образцов, а непосредственно из цельной крови и костного мозга. Кроме того, были оптимизированы и количественно охарактеризованы все стадии диагностической процедуры. Собственно обнаружение мишени проводили с помощью нанокolonий.

Консервация клинических образцов

В процессе работы мы столкнулись с потребностью в методе консервации образцов крови и костного мозга, который бы обеспечил полную сохранность нуклеиновых кислот, прежде всего РНК, до их выделения. В 1979 г. Д.Чергвин с коллегами предложил лизировать животные ткани раствором, содержащим компоненты: тиоцианат гуанидина (сильный хаотропный агент), саркозил (детергент), 2-меркаптоэтанол (восстановитель S–S-связей), ЭДТА (хелатор поливалентных металлов) и цитрат (буфер) [196]. Такая комбинация реагентов особенно эффективно депротеинизирует нуклеиновые кислоты и подавляет рибонуклеазы. Смешивая цельную кровь с таким лизирующим раствором, нам удалось показать, что РНК и ДНК крови в составе лизата сохраняются без видимых изменений при +4°C в течение, по крайней мере, двух недель [197, 198]. При необходимости, гуанидинтиоцианатные лизаты цельной крови можно хранить при –20°C более года с сохранением как ДНК, так и РНК. Для удобства транспортировки образцов сохранность РНК можно обеспечить и при комнатной температуре (по крайней мере, до двух недель), если нуклеиновые кислоты осадить добавлением к лизату двойного объема изопропанола. Лизат полностью совместим с большинством из широко используемых процедур выделения нуклеиновых кислот, в том числе, с выделением РНК с помощью экстракции кислым фенолом [199] и с выделением РНК и ДНК с помощью адсорбции на мелкодисперсных силикатных или стеклянных носителях [200], применяемых, например, в экстракторе NucliSens (Organon Teknika, Нидерланды). Лизат с добавленным изопропанолом полностью совместим с разработанным нами методом одновременного выделения РНК и ДНК [20] и с выделением РНК с помощью экстракции кислым фенолом, надо только перед проведением стандартной процедуры растворить изопропанольный осадок в лизирующем растворе (неопубликованные данные авторов этого обзора). Фактически,

процесс консервации образца заменяет стадию получения лизата, предусмотренную указанными способами. Таким образом, способ консервации образцов заключается в том, что немедленно после взятия пробы у пациента ее смешивают с лизирующим раствором, содержащим перечисленные компоненты.

Выделение РНК

За основу способа выделения РНК мы использовали известный метод Хомчинского, предложенный для выделения РНК из животных тканей и клеток [199]. Метод заключается в фенольной экстракции гуанидинтиоцианатных лизатов при рН 4, при которой в водной фазе остается только РНК, а ДНК в комплексе с белками переходит в органическую фазу. С использованием внутренних контролей мы показали, что при использовании этого метода для экстракции лизатов цельной крови выход высокомолекулярной РНК составляет 85–90% [20].

Однако оказалось, что полученный препарат содержит примеси, ингибирующие и ОТ, и ПЦР. От ингибиторов удалось освободиться, дополнив метод выделения осаждением РНК смесью ацетона и этанола и гель-фильтрацией в миниколонках [27].

Оптимизация обратной транскрипции

Консорциум «Европа против рака» рекомендует осуществлять стадию ОТ с использованием смеси случайных гексануклеотидов в качестве праймера, 200 ед. [3] или 100 ед. [46] обратной транскриптазы MMLV, лишенной активности РНКазы Н, и в ПЦР использовать 10% продукта, полученного в реакции ОТ.

Для синтеза кДНК мы использовали специфический обратный праймер. Хотя использование случайных гексануклеотидов для праймирования ОТ дает наивысший выход кДНК, оно по ряду причин не очень пригодно для количественного определения РНК [201]. Одна из причин – искусственно завышенный выход ОТ, поскольку ОТ может стартовать с многих точек и, следовательно, с одной молекулы РНК может синтезироваться более одной молекулы кДНК. При этом число копий кДНК на одну РНК-матрицу непостоянно и зависит как от длины и структуры РНК, так и от степени ее деградации. Другая причина заключается в том, что при случайном праймировании на РНК, выделенной из клинических образцов, большая часть кДНК синтезируется путем копирования рибосомных РНК, составляющих более 90% препарата, и эти кДНК могут конкурировать с размножением специфической мишени, присутствующей в образце в низкой кон-

центрации. Использование же при ОТ специфического праймера вместо случайных гексануклеотидов может привести к относительно большому выходу специфического ПЦР-продукта [202].

Рекомендация использовать для ПЦР лишь 10% кДНК, полученной в результате осуществления ОТ, приводит к искусственному занижению чувствительности анализа и связана, по-видимому, с тем, что некоторые низкомолекулярные компоненты реакции ОТ (в частности, дитиотрейтол) ингибируют ПЦР. Мы обнаружили, что гель-фильтрация продуктов ОТ полностью снимает ингибирование и позволяет использовать для ПЦР всю синтезированную кДНК.

Оказалось, что использование рекомендованных количеств обратной транскриптазы ингибирует рост колоний, причем, даже если в качестве матрицы для ПЦР использовать уже готовую кДНК [27]. То есть, если сначала провести ОТ на РНК донорской крови (не содержащей химерной РНК), а затем перед ПЦР добавить кДНК AML1-ЕТО к продукту ОТ, то колонии химерной ДНК вырастают до меньшей интенсивности по сравнению с контролями, в которых продукт ОТ не добавляли или препарат РНК добавляли в гель непосредственно перед ПЦР, не проводя через стадию ОТ. Вероятно, причиной подавления роста колоний является конкуренция со стороны неспецифических кДНК, синтезирующихся на РНК крови при обратной транскрипции. Ингибирование можно полностью убрать, если в 100 раз понизить количество обратной транскриптазы [27]. Уменьшение количества обратной транскриптазы также увеличивает выход обратной транскрипции, то есть число колоний увеличивается, достигая 50% от числа молекул химерной РНК, взятой в ОТ [27].

Количественная оценка диагностической процедуры

Количественный контроль каждой стадии разработанной нами диагностической процедуры позволяет достаточно точно рассчитать абсолютный титр определяемой мишени в исходном клиническом образце, не прибегая к определению контрольных (референсных) РНК.

Количественная оценка всех стадий процедуры приводит к следующему результату: сбор и консервация клинических образцов, исключающие деградацию РНК, дают выход РНК, равный 100% [197]; усовершенствованная процедура выделения РНК дает выход РНК, близкий к 100% [27]; обратная транскрипция AML1-ЕТО мРНК дает стабильный выход кДНК, равный 50% [27], и, наконец, чувствительная и количественная ПЦР, устойчивая к фону, обусловленному присутствием избытка РНК нормальных клеток, дает выход колоний ДНК, равный 100% [19, 20, 27]. Общий выход диагностической

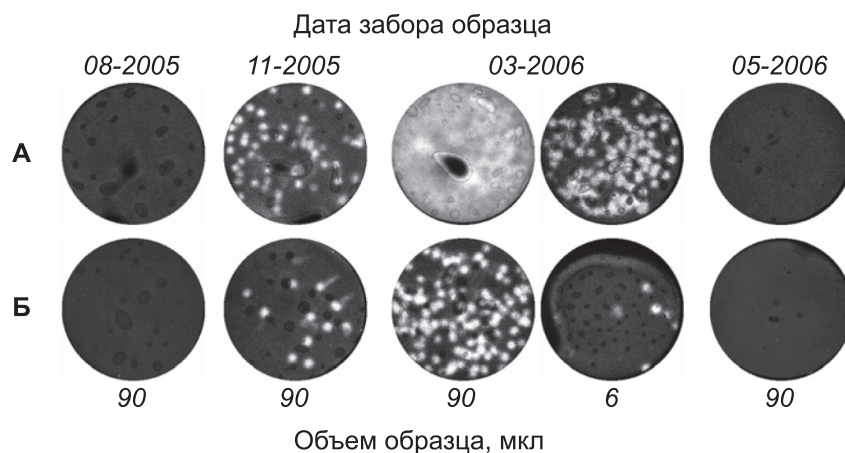


Рис. 4. Ретроспективный анализ динамики изменения титра AML1-ETO мРНК в крови и костном мозге больного лейкозом, ассоциированным с хромосомной транслокацией t(8;21)(q22;q22).

Рисунок из статьи [27].

Содержание AML1-ETO мРНК в указанных объемах костного мозга (А) и крови (Б), взятых у пациента в указанные даты, определяли с использованием разработанной диагностической процедуры: обратной транскрипции РНК, выделенной из клинических образцов, и последующей ПЦР в режиме «реального времени».

процедуры – 50% молекул AML1-ETO мРНК в клиническом образце или, другими словами, определяется каждая вторая молекула РНК-мишени [27].

Таким образом, разработанная нами диагностическая процедура снимает большинство проблем, сопряженных с использованием ОТ–ПЦР для детекции МОБ.

ОБНАРУЖЕНИЕ МОБ С ПОМОЩЬЮ НАНОКОЛОНИЙ

Обнаружение химерной AML1-ETO мРНК в клинических образцах

Разработанная диагностическая процедура была испытана путем определения абсолютного титра химерной AML1-ETO мРНК в крови и костном мозге, взятых у прошедших курс химиотерапии больных лейкозом, ассоциированным с хромосомной транслокацией t(8;21)(q22;q22) [27].

На рис. 4 приведена динамика титра для одного из пациентов. Первая проба дала отрицательный результат. Однако в пробе, взятой за 5 мес. до клинического рецидива и сопутствующего всплеска титра, была обнаружена химерная РНК. Хотя во всех случаях ее содержание

в костном мозге было примерно на порядок больше, чем в крови, тем не менее, анализ крови тоже позволяет обнаружить появление химерной РНК, что, в свою очередь, дает возможность использовать менее травматичную для пациента процедуру забора образца. Повторный курс химиотерапии после наступления клинического рецидива понизил титр этой РНК до нуля.

Таким образом, определение AML1-ЕТО мРНК с помощью наноклоний позволяет диагностировать минимальную остаточную болезнь за несколько месяцев до клинического рецидива.

*Достоверность отрицательного результата анализа
клинических образцов*

Исследуемые препараты РНК, выделенные из клинических образцов, подвергали проверке на выход РНК с использованием спектрофотометрического анализа и дополнительно на выход и целостность РНК с использованием электрофоретического анализа. Данные электрофоретического анализа позволяют утверждать, что модифицированный метод выделения РНК дает хорошо воспроизводимые результаты и обеспечивает целостность РНК (рис. 5А, [27]). Выход РНК из костного мозга выше, чем из такого же объема крови, что коррелирует с более высоким содержанием ядерных клеток в костном мозге [203]. Сохраняется даже 28S РНК, длиной почти 5000 нуклеотидов, что гарантирует практически полную сохранность более короткого размножаемого в ПЦР фрагмента AML1-ЕТО мРНК длиной 260 нуклеотидов.

Спектрофотометрический анализ проводили путем снятия спектра, а не просто измерением поглощения образца при 260 нм (как это рекомендовано консорциумом «Европа против рака» [193]), так как помимо присутствия РНК поглощение при 260 нм может быть обусловлено светорассеянием образца, а также наличием поглощающих примесей ненуклеотидной природы, содержащимися как в крови, так и в реагентах, используемых при выделении, в частности: полифенолами, фенолом, меркаптоэтанолом. При расчете титра РНК-маркера число обнаруженных молекул относили к объему клинического образца, так как содержание ядерных клеток сильно варьирует между образцами. Поэтому с целью стандартизации выхода РНК при экстракциях, отбирали точный (и поэтому заведомо неполный) объем водной фазы.

Достоверность отрицательных результатов подтверждали контролем: к анализируемым препаратам суммарной РНК, давшим отрицательный результат, добавляли AML1-ЕТО РНК и наблюдали

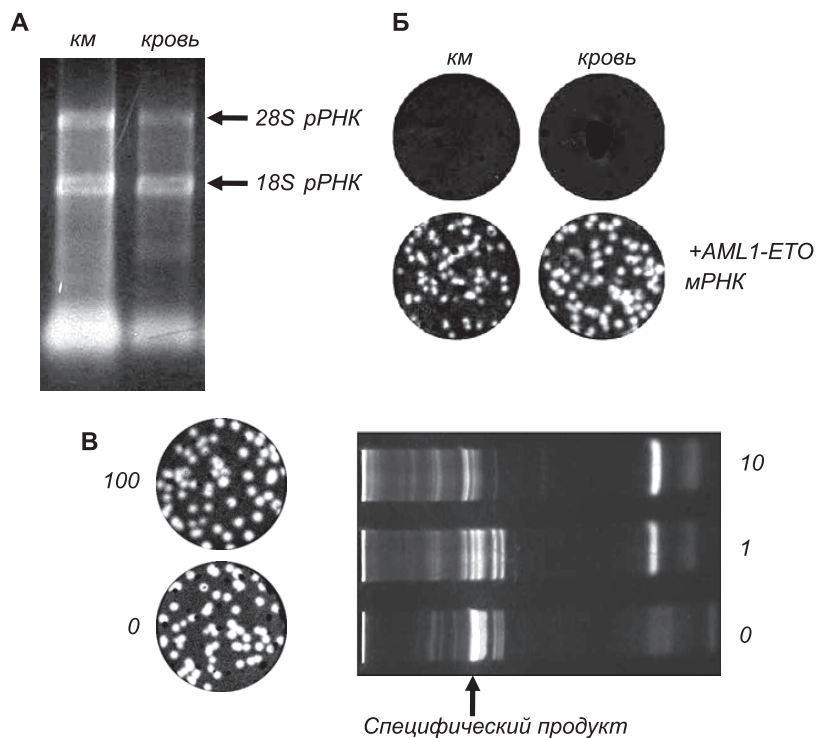


Рис. 5. Исключение ложноотрицательных результатов при детекции химерной РНК AML1-ETO с использованием нанокolonий.

А. Качественная и количественная характеристика препаратов РНК, выделенных из клинических образцов, с помощью электрофореза в 1% агарозе. Количество РНК в лунке геля соответствует 20 мкл костного мозга (KM) или цельной крови (кровь). Стрелками указано положение тРНК и рибосомных 18S и 28S РНК.

Б. Подтверждение достоверности отрицательного результата (верхний ряд) появлением ДНК-колоний при добавлении к анализируемым образцам 135 молекул AML1-ETO мРНК (нижний ряд). Колонии ДНК выявляли посредством гибридизации в геле с FRET-зондами.

В. Устойчивость обнаружения химерной РНК-мишени с использованием нанокolonий к помехам со стороны большого количества посторонней РНК. Посторонняя РНК, присутствующая в препарате РНК, выделенном из клинического образца, существенно снижает количество специфического продукта стандартной ПЦР (справа), но не мешает выявлению нанокolonий (слева). Продукт обратной транскрипции смеси AML1-ETO РНК и суммарной РНК, выделенной из крови (числа указывают объем крови в мкл), размножали с использованием ПЦР в геле (слева; нанокolonии AML1-ETO кДНК детектировали с помощью гибридизации с флуоресцентно меченным зондом) и стандартной, то есть жидкостной, ПЦР (справа; продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания бромистым этидием).

появление колоний в количестве, соответствующем 50% добавленной РНК-мишени, что свидетельствовало об отсутствии в анализируемых препаратах ингибиторов ОТ и ПЦР (рис. 5Б). Отсюда следует, что если бы в препаратах РНК, выделенных из крови и костного мозга, содержались хотя бы две молекулы химерной РНК, то они были бы обнаружены.

*Преодоление ложноотрицательных результатов,
характерных для жидкостной ПЦР*

Основной причиной ложноотрицательных результатов является неспецифический синтез [8], который неизбежно происходит из-за ограниченной специфичности и, как следствие, ошибочной гибридизации праймеров с огромным количеством разнообразных по последовательностям посторонних (по отношению к детектируемой мишени) РНК, присутствующих в препаратах, выделенных из клинических образцов. Проблема неспецифического синтеза усиливается при детекции химерной РНК из-за присутствия многократного избытка мРНК из нормальных (не лейкозных) клеток, в которых экспрессируются оба гена, составляющих химеру. Для каждого из этих генов один из используемых праймеров является полностью комплементарным, поэтому специфичность размножения химерной кДНК определяется только вторым праймером. Неспецифическое включение любого из праймеров может привести к образованию нехимерного продукта, в том числе и высокомолекулярного, размножение которого будет конкурировать с размножением детектируемой мишени. В результате, реальная чувствительность диагностики, в том числе, ПЦР в реальном времени, определяемая как минимальная детектируемая доля лейкоэмических клеток от общего числа ядерных клеток, обычно не лучше, чем 10^{-4} [4, 5]. Это означает, что, с учетом содержания ядерных клеток в 1 мл крови ($\approx 10^7$) и костного мозга ($\approx 10^8$), лейкозные клетки выявляют, лишь при довольно высоких концентрациях: 10^3 в 1 мл крови и 10^4 в 1 мл костного мозга. Таким образом, из-за ограниченной чувствительности стандартной ОТ–ПЦР минимальная остаточная болезнь нередко остается не выявленной, а из-за трудностей количественного определения химерной мРНК часто не удается отследить динамику развития рецидива болезни.

Другая ситуация наблюдается при использовании нанокolonий. Благодаря тому, что нанокolonии, образованные специфической и неспецифической ДНК, пространственно разделены, они не мешают размножению друг друга. Так, проведение ПЦР в геле в присутствии продуктов обратной транскрипции РНК, выделенной из 100 мкл крови, не влияет на число нанокolonий и позволяет достоверно определить

титр РНК-мишени (рис. 5В, слева), в то время, как осуществление ПЦР в жидкости в присутствии продуктов ОТ РНК, выделенной из на порядок меньших количеств крови, приводит к снижению выхода специфического продукта и накоплению неспецифических продуктов, причем как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных (рис. 5В, справа).

Сопоставление результатов, полученных на одних и тех же препаратах кДНК с использованием нанокolonий и с использованием стандартной (жидкостной) ПЦР в реальном времени, показало, что при высоком титре AML1-ETO РНК в крови или костном мозге больных наблюдалось удовлетворительное совпадение результатов, полученных с помощью этих двух методов [204]. Такой высокий титр наблюдается до лечения или при рецидиве заболевания. Однако на стадии ремиссии, когда титр РНК-мишени низкий, чувствительности стандартной ПЦР не всегда хватает для обнаружения МОБ [204].

Преодоление ложноположительных результатов

Неспецифический синтез может приводить и к ложноположительным результатам. По данным консорциума «Европа против рака» ложноположительные результаты получают в 10% случаев при проверке клинических образцов на присутствие AML1-ETO РНК [46]. И это в лучших (эталонных) лабораториях.

Рис. 6 иллюстрирует как проблему ложноположительного фона, так и способы ее решения. Стрелками отмечены колонии ДНК, которые гибридизуются с зондом, специфичным к AML-части, но не гибридизуются с зондом, специфичным к ETO-части. Эти колонии образованы нехимерными молекулами, содержащими только последовательность гена *AML1*. То, что мРНК AML1 образует ложноположительные колонии чаще, чем мРНК ETO, неслучайно и обусловлено тем, что уровень экспрессии гена *AML1* в здоровых клетках значительно выше, чем гена *ETO* [205].

Использование FRET-зондов также позволяет дискриминировать колонии, образованные химерными и нехимерными молекулами. Так как резонансный перенос энергии возможен лишь тогда, когда флуорофоры находятся в непосредственной близости друг от друга, свечение колоний доказывает, что они состоят из химерных последовательностей, способных к гибридизации с обоими зондами.

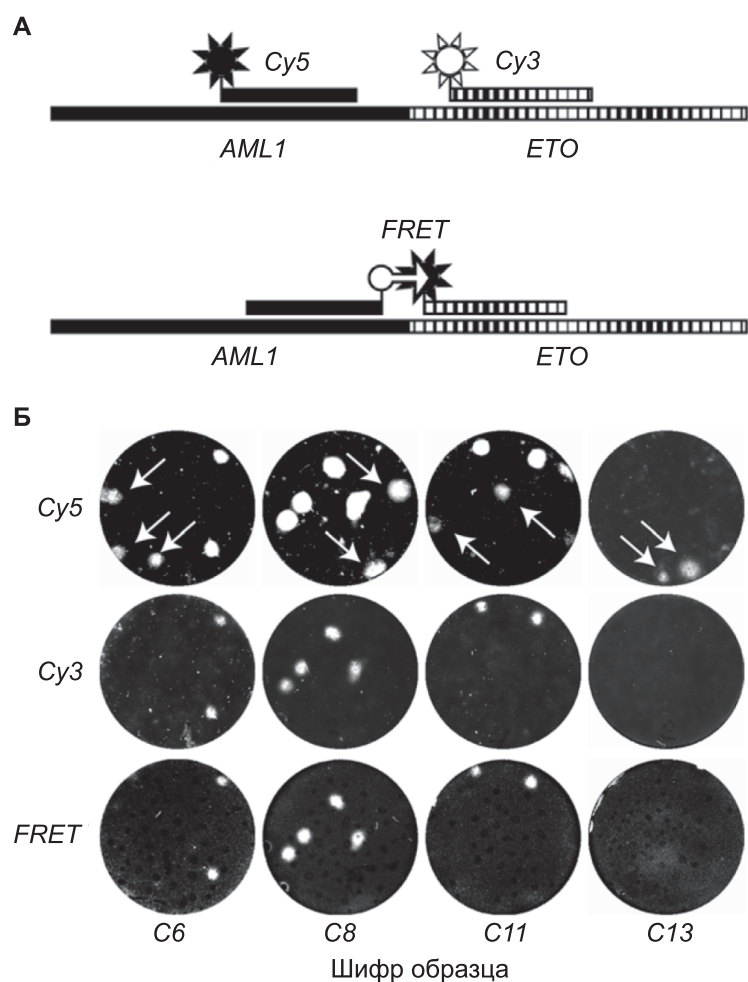


Рис. 6. Исключение ложноположительных результатов при детекции химерной AML1-ETO РНК с использованием нанокolonий.

Рисунок из статьи [27].

А. Схемы гибридизации AML1-ETO-химеры с независимыми зондами, мечеными красным (Cy5) и зеленым (Cy3) флуорофорами, и с парой зондов, меченных группами, способными к FRET – FAM (донор энергии) и Cy5 (акцептор энергии).

Б. Гибридизация нанокolonий, выросших при ОТ-ПЦР РНК, выделенной из клинических образцов, с зондами, мечеными Cy5 (верхний ряд), Cy3 (средний ряд) и с FRET-зондами (нижний ряд). Стрелками указаны колонии, гибридирующие с зондом Cy5-AML1, но не гибридирующие с зондом Cy3-ETO и с FRET-зондами.

*Чувствительность обнаружения МОБ
с использованием нанокolonий*

Используя изложенную выше диагностическую процедуру, включающую ПЦР-версию нанокolonий, можно обнаружить 1 лейкозную среди 10^7 – 10^8 нормальных клеток (рис. 7). Этот расчет основан на двух допущения: (1) что в 1 мл крови и костного мозга пациента содержится стандартное количество лейкоцитов (5×10^6 и 5×10^7 , соответственно [203]) и (2) что в одной лейкоцитарной клетке, как следует из весьма разнородных литературных данных, содержится не менее 100 молекул мРНК AML1-ETO [27].

Одна из особенностей нашей процедуры состоит в том, что немедленно после забора клинический образец подвергается лизису. Это высвобождает из клеток содержащиеся в них молекулы РНК. Эти РНК распределяются по всему объему лизата. Если 1 мл образца содержит 1 лейкозную клетку, то в лизате окажется сотня молекул химерной РНК. Порция суммарной РНК, которую мы берем в обратную транскрипцию и ПЦР, соответствует 100 мкл исходного образца (или 1/10 части). В этой порции окажется 10 молекул химерной РНК, которые дадут в среднем 5 колоний. То есть, единственная лейкозная клетка, которая окажется в лизате, будет обнаружена. Можно, анализируя кровь, достичь такой же чувствительности, как и при анализе костного мозга, если лизировать 10 мл крови и брать в ОТ–ПЦР РНК, эквивалентную 1 мл крови. Это соответствует чувствительности диагностики 10^7 – 10^8 , что на несколько порядков выше максимальной чувствительности, достигаемой с помощью других способов.

Преимущества использования нанокolonий для обнаружения МОБ

Помимо непревзойденной чувствительности, устойчивости к помехам со стороны неспецифического синтеза и возможности дискриминировать химерный и нехимерный ПЦР-продукты, нанокolonии обладают и другими преимуществами по сравнению со стандартной (жидкостной) ПЦР.

Пространственное разделение нанокolonий не только значительно снижает помехи со стороны неспецифического синтеза, но и устраняет конкуренцию между мишенями [19], что позволяет осуществлять в геле мультиплексную ПЦР и следить за МОБ не только по детекции химерной РНК, но и по сочетанию маркеров, отягощающему течению того или иного типа лейкоза [117]. Пространственное разделение мишеней также исключает рекомбинацию между матрицами, наблюдаемую при проведении ПЦР в жидкости [2, 132,

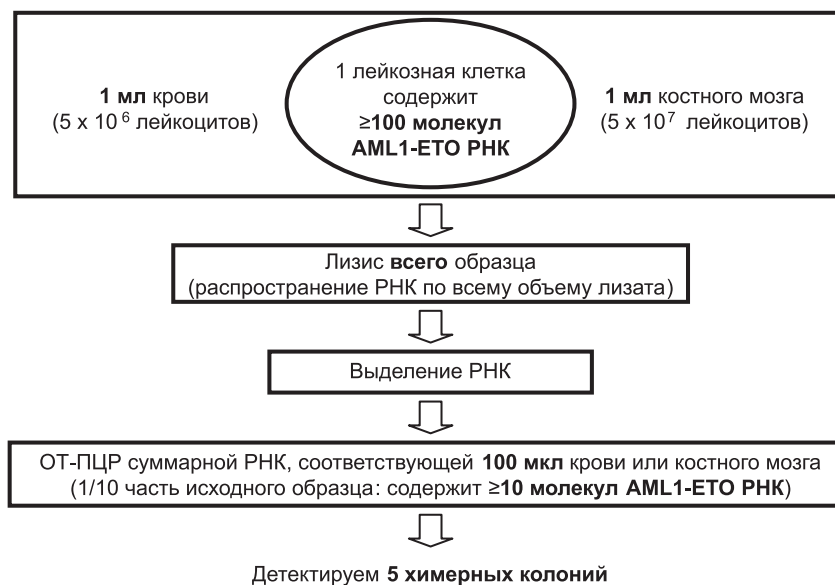


Рис. 7. Чувствительность диагностики минимальной остаточной болезни (МОБ) с использованием нанокolonий.

Если предположить, что 1 мл анализируемого образца (крови или костного мозга) содержит хотя бы одну лейкозную клетку, то она будет обнаружена. Таким образом, чувствительность диагностики МОБ равна 10^{-7} – 10^{-8} .

133] и способную приводить к появлению артефактных химерных последовательностей и, как следствие, к ложноположительным результатам.

Подсчет колоний позволяет определять абсолютный титр РНК-мишени в клинических образцах. Метод нанокolonий является цифровым: здесь не требуется измерять интенсивность сигнала; важно только, чтобы колония «доросла» до детектируемого уровня. Проблемы, свойственные стандартной ПЦР (невоспроизводимость условий реакции, неодинаковые скорости размножения разных мишеней при мультиплексной ПЦР, проблемы количественного определения [8]), в случае использования нанокolonий могут влиять на размер колоний, но не на их число. Таким образом, метод нанокolonий является действительно количественным и более точным и надежным по сравнению с «аналоговыми» методами, основанными на измерении величины сигнала, к которым относится и стандартная (жидкостная) ПЦР.

Технически метод нанокolonий отличается от стандартной ПЦР лишь тем, что реакционную смесь вносят не в пробирку, а в лунку с пленкой сухого геля. Промышленное производство одноразовых кассет (прототип такой кассеты разработан [206, 207]) с уже готовым для пропитывания ПЦР-смесью гелем могло бы сделать процесс применения нанокolonий не более трудоемким, чем использование стандартной ПЦР.

ПЦР в нанокolonиях по стоимости сравнима со стандартной ПЦР: объем геля в представленных экспериментах составлял всего 65 мкл; то есть, расход реактивов здесь почти такой же, как в стандартной ПЦР объемом 50 мкл. Можно также использовать более тонкие гели [184] и сократить, таким образом, расход реактивов. Фактически же технология нанокolonий дешевле, чем стандартная ПЦР, так как позволяет многократно сократить общее число проб, требуемых для проведения анализа.

V. ДРУГИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ НАНОКОЛОНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Возможности нанокolonий гораздо шире, чем обнаружение и количественное определение химерной или другой маркерной РНК. Некоторые из этих возможностей успешно продемонстрировали зарубежные коллеги, используя нанокolonии под названием «полоний» (*polonies* – то есть «полимеразных колоний») [184] или «ПЦР-колоний» (*PCR colonies*) [208, 209].

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

Секвенирование в нанокolonиях

Часто возникает необходимость не только обнаружения, но и определения нуклеотидной последовательности химерной мРНК [210]. Нанокolonии предоставляют такую возможность [15].

Джордж Чёрч с соавторами показал, что нанокolonии можно использовать для быстрого и дешевого секвенирования с помощью, по крайней мере, двух подходов: секвенирования путем лигирования олигонуклеотидов [211] и секвенирования путем удлинения праймера [30]. Оба подхода основаны на том, что каждая колония содержит один из фрагментов секвенируемой длинной последовательности и секвенирование колоний (другими словами, «расшифровка» последовательности всех фрагментов) происходит одновременно.

Секвенирование путем лигирования олигонуклеотидов заключается в матрицезависимом *in situ* лигировании гибризованного

праймера с флуоресцентно меченным олигонуклеотидом. Один цикл секвенирования состоит из гибридизации секвенируемой последовательности с праймером и пулом флуоресцентно меченных вырожденных олигонуклеотидных наномеров (в каждом пуле цвет флуорофора соответствует одному из четырех возможных оснований в определенном положении наномера), лигирования гибризованного праймера и наномеров, отмывания невключенных наномеров, сканирования при 4-х длинах волн, денатурации гибридов и отмывания продукта лигирования. В следующих циклах гибридизацию и лигирование проводят с другим пулом наномеров, несущими кодируемые флуорофорами основания в другом положении наномеров.

Секвенирование путем удлинения праймера основано на методе, разработанном фирмой Affimetrix для обнаружения однонуклеотидных замен (SNP – single nucleotide polymorphism) [212] и в усовершенствованном варианте заключается в гибридизации иммобилизованной ДНК с праймером, комплементарным фланкирующему участку с известной последовательностью, и многократном повторении цикла процедур: удлинении праймера при помощи ДНК-полимеразы флуоресцентно меченными нуклеотидами с обратимо заблокированным 3'-гидроксиллом (каждому виду основания соответствует свой вид флуорофора), отмывании геля от невключенного нуклеотида, сканировании, удалении флуорофора и разблокировании 3'-гидроксила.

Так как в одном геле могут быть различимы многие тысячи колоний [184, 213], секвенирование *in situ* обладает очень большой «пропускной способностью», вплоть до секвенирования всего генома. Таким образом, секвенирование в наноклониях может выявить весь спектр генетических изменений, характерных для опухоли конкретного пациента, и определить все возможные молекулярные диагностические маркеры и мишени для индивидуальной терапии.

По существу, секвенирование в наноклониях есть ни что иное, как метод широкомасштабного тотального секвенирования [214, 215]. Широкомасштабное секвенирование индивидуальных человеческих геномов под разными названиями, в частности, «массивное параллельное секвенирование» (*massively parallel sequencing*) [215], интенсивно используется в последнее время для поиска хромосомных транслокаций и других генетических аномалий, ассоциированных со злокачественными опухолями эпителиального происхождения – с наиболее распространенными видами рака [216, 217].

Обнаружение SNP и анализ гаплотипа

Аналогично тому, как осуществляют секвенирование в колониях, можно обнаруживать SNP («single-nucleotide polymorphisms») – однонуклеотидные замены, называемые однонуклеотидным полиморфизмом. Для этого достаточно только одного цикла удлинения флуоресцентно меченным нуклеотидом праймера, гибридизованного рядом с предполагаемым SNP.

Во многих случаях влияние SNP на экспрессию гена или функцию кодируемого белка обусловлено не единичной заменой, а множественными заменами, то есть гаплотипом [218]. Определение гаплотипа имеет важное диагностическое и прогностическое значение при злокачественных заболеваниях, в частности, при лейкозе [219], однако представляет собой трудную задачу в связи с необходимостью разделения сестринских хромосом.

Нанокolonии помогают преодолеть эту проблему благодаря тому, что размножение в геле двух и более участков одной молекулы ДНК (например, локусов одной и той же хромосомы) приводит к образованию перекрывающихся колоний. В то же время, при амплификации участков разных молекул (например, разных хромосом) образуются отдельные колонии. В результате последующего SNP-анализа с использованием удлинения праймеров флуоресцентно меченными нуклеотидами либо одна и та же колония окажется меченной разными флуорофорами (если замены принадлежат одной хромосоме), либо мечеными окажутся разные колонии (если замены находятся в разных хромосомах). В результате, нанокolonии позволяют определить гаплотип с малыми материальными затратами и при этом достаточно легко и быстро [28].

Относительно недавно Дж. Чёрч с коллегами картировал SNP на участке седьмой хромосомы человека длиной 153×10^6 п.н. [220]. По мнению авторов этой работы с помощью такого удаленного гаплотипирования могут быть обнаружены и охарактеризованы рекомбинации, возникающие в одиночных клетках при мейозе, и даже более редкие рекомбинации, возникающие при митозе, а также хромосомные транслокации, приводящие к трансформации нормальных клеток в злокачественные [220].

Определение копийности аллелей

Течение злокачественных заболеваний, в том числе ассоциированных с хромосомными транслокациями, осложняется в случае потери целой хромосомы или ее части, несущей нормальный (нехимерный) ген или гены опухолевых супрессоров [221, 222], то есть когда происходит потеря гетерозиготности (LOH).

Благодаря тому, что нанокolonии позволяют прямо подсчитывать число колоний, они идеально подходят для любых количественных измерений ДНК- и РНК-мишеней, в том числе и для обнаружения ЛОН. Дж. Эдвардс и коллеги с использованием нанокolonий при анализе линии панкреатических клеток (Panc-1) обнаружили, что число колоний гена *K-ras2* \approx в 2 раза превышало число колоний гена p53, что указывает на ЛОН в районе гена p53 [223].

Определение лекарственной устойчивости

Устойчивость лейкозных клеток к терапии при рецидиве объясняют появлением и последующим быстрым размножением пула лейкозных клеток, несущих мутации, обуславливающие устойчивость к тому или иному лекарственному препарату [224, 225]. Для выбора адекватной схемы лечения конкретного пациента необходимо знать о наличии таких мутаций.

Более 90% случаев устойчивости к ингибитору киназы иматинибу, широко используемому для химиотерапии ХМЛ, ассоциированного с t(9;22)(q34;q11.2), обусловлены девятью мутациями в киназном домене химерного гена *BCR-ABL* [226]. Применение нанокolonий позволяет обнаружить одну устойчивую к иматинибу клетку среди 10^4 чувствительных к нему клеток [26].

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА

Альтернативный сплайсинг

Унаследованные и приобретенные генетические изменения могут проявлять себя в онкологических заболеваниях и через механизм альтернативного сплайсинга. Широкомасштабный анализ двух миллионов EST («expressed sequence tag» – короткие фрагменты кДНК, являющиеся метками мРНК) выявил специфичные для злокачественных опухолей варианты альтернативного сплайсинга у 316 человеческих генов [29] и позволил выделить 3 группы последствий альтернативного сплайсинга, наблюдаемых при злокачественных заболеваниях: более половины последствий связаны с потерей одной из форм, одна треть – с заменой одной изоформы другой, остальные – с увеличением количества изоформы при заболевании. Многие из последствий оказались связаны с нарушением супрессии опухолевого процесса. Аналогичный подход других авторов выявил более 15 тысяч опухоль-специфичных изоформ альтернативного сплайсинга у почти 10000 генов при 27 видах рака и в некоторых случаях была обнаружена корреляция между видом рака и вариантом альтернативного сплайсинга [227].

Аналогично тому, как можно установить, являются ли наноклонии AML1-ETO химерными, возможны поиск и количественное измерение разных вариантов сплайсинга: после проведения обратной транскрипции и последующей ПЦР в геле с парой праймеров, соответствующих концевым константным экзонам (или проведения мультиплексной ПЦР с праймерами, специфичными к каждому возможному экзону), колонии выявляют гибридизацией с экзон-специфичными флуоресцентно мечеными зондами. Комбинация зондов, гибридизующаяся с одной колонией (или перекрывание колоний при мультиплексной ПЦР), выявляет набор экзонов, присутствующий в молекуле мРНК. Колонии можно также детектировать путем удлинения праймера меченым нуклеотидом как и при обнаружении SNP [228].

Наноклонии позволили обнаружить новые изоформы и количественно определить все изоформы альтернативного сплайсинга, в том числе минорные [228-230]. Поиск с помощью наноклоний всех вариантов сплайсинга РНК-транскрипта гена CD44, имеющего 10 вариабельных экзонов, которые теоретически могут дать более 1000 комбинаций, выявил 69 изоформ мРНК, что более чем в 2 раза превышает число изоформ, обнаруженных ранее другими методами [228]. Количественный анализ распределения экзонов в нормальных и трансформированных клетках выявил, что распределение мажорных изоформ практически не меняется. В то же время статистически достоверно изменяется количество и пропорции минорных изоформ.

Профиль экспрессии генов

Поскольку с помощью наноклоний можно осуществлять широко-масштабное секвенирование, то их можно использовать для выявления профиля экспрессии генов.

Так, например, с помощью массивного параллельного секвенирования Л.Гарвай с соавт. обнаружил 11 новых химерных транскриптов в опухоли меланомы [231].

Тотальное секвенирование мРНК имеет ряд преимуществ по сравнению с гибридизацией на микрочипах, так как, в частности, позволяет обнаруживать соматические мутации и точно измерять аллель-специфичную экспрессию. Сотрудники Life Technologies Inc. и Mayo Clinic использовали секвенирование РНК для сравнения профилей экспрессии генов опухолевой и нормальных тканей у трех больных с плоскоклеточной карциномой полости рта [232]. В опухолях был выявлен аллельный дисбаланс, приводящий к подавлению экспрессии ряда генов, и были идентифицированы специфические гены,

известные по другим видам рака, но не замеченные ранее в участии исследуемого вида рака.

Способность нанокolonий точно измерять экспрессию аллелей одного и того же гена была продемонстрирована при измерении уровня экспрессии протеинкиназы D2 у 8 гетерозиготных пациентов с SNP 4208G/A и полученные результаты были сопоставлены с литературными данными [233]. Аллельные варианты мРНК детектировали так же, как и при SNP-анализе: гибридизацией колоний ДНК с праймером и последующим удлинением этого праймера на один меченый нуклеотид. Простым подсчетом колоний, меченных разными флуорофорами, оказалось возможным точно определить соотношение активностей аллелей. В качестве контроля определяли соотношение самих аллелей, которое оказалось равным 1 : 1. Дж.Эдвардс с соавт. пришли к выводу, что нанокolonии имеют, по крайней мере, два неоспоримых преимущества: цифровой способ измерения (более точный, чем «аналоговый») и абсолютное измерение уровней экспрессии аллелей.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

Аберрантное метилирование

Диагностика и лечение злокачественных заболеваний направлены на мишени, обусловленные как генетическими изменениями, так и эпигенетическими событиями. Одним из таких эпигенетических событий является аберрантное метилирование ДНК (метилирование остатков цитозина в ДНК путем ферментативного присоединения к нему метильной группы, которое в норме не происходит) [234, 63].

Анализ метилирования генома пациентов с диагнозом ОМЛ выявил 16 подгрупп ОМЛ, причем 5 из них оказались новыми [235, 236]. Также была обнаружена корреляция профиля метилирования генов с генетическими аномалиями (хромосомные транслокации *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, и *PML-RARA* ассоциированы со специфическими профилями метилирования) и клиническим исходом заболевания.

Метилирование промотор-ассоциированных CpG-богатых участков (CpG островков) может привести к инактивации опухолевых генов-супрессоров и прогрессированию заболевания [237]. Испытания 5-азациитидина, ингибитора ДНК-метилтрансферазы, снижающего уровень метилирования промоторов и тем самым активирующего опухолевые гены-супрессоры [238]) показали, что этот препарат эффективен у 48% больных с ОМЛ [239].

Нанокolonии позволяют с высокой чувствительностью обнаружить и количественно охарактеризовать аберрантное метилирование.

Так, наноклонии, полученные с использованием изотермической системы амплификации RCA (размножение по механизму катящегося кольца) применили для количественного анализа метилирования гена опухолевого супрессора p16 в клетках опухоли желудка [240]. Анализ основан на том, что предварительная обработка ДНК бисульфитом приводит к превращению немодифицированного цитозина в урацил, не затрагивая метилированные цитозины. Образовавшиеся в результате такой обработки замены С на U детектируют путем гибридизации с флуоресцентными зондами. Такой подход позволяет обнаружить одну метилированную последовательность среди миллиона неметилированных и выяснить, в какой пропорции метилируются сайты, принадлежащие одной молекуле (если анализируют несколько сайтов метилирования).

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2006 г. в России выявлено почти полмиллиона (475432 человек) новых больных злокачественными новообразованиями [104]. Эти заболевания являются, как и во многих других странах, второй причиной смертности, уступая лишь болезням системы кровообращения. Всего от злокачественных новообразований в 2006 г. в России умерло 286232 человек, что составило 333 умерших на 100000 населения [108]. По данным за 2004-2006 г.г. Национального Института рака (США) вероятность заболеть злокачественными новообразованиями в течение жизни составляет 40% [103].

Долгое время считалось, что хромосомные транслокации ассоциированы, в основном, со злокачественными опухолями кроветворной и лимфатической тканей. Однако к 2004 г. было выявлено 64 химерных гена, ассоциированных с солидными опухолями (к которым относятся наиболее распространенные виды злокачественных новообразований) [241], в том числе с опухолями рака молочной железы [242]. В 2005 г. было обнаружено, что 80% случаев рака простаты ассоциированы с перестройками генов *ERG* и *ETV1* ETS-семейства транскрипционных факторов, в том числе с хромосомными транслокациями, вовлекающими какой-либо из этих генов и ген *TMPRSS2* [243]. Химерную мРНК *TMPRSS2-ERG* выявляют в 40-60% случаев рака простаты [243, 244, 245], и наблюдают корреляцию между ее появлением (в том числе и появлением ее определенных изоформ) и клиническим исходом заболевания [244, 245]. В 2007 г. в Японии было обнаружено, что 6,7% случаев немелкоклеточного рака легких ассоциировано с хромосомной инверсией *inv(2)(p21;p23)*,

приводящей к появлению химерной РНК EML4-ALK [246]. Эта же химерная РНК выявлена в 2,4% случаев рака молочной железы, 2,4% случаев колоректального рака и 11,3% немелкоклеточного рака легких в США [247].

К 2007 г. было установлено, что 20% всех случаев онкологических заболеваний ассоциированы с хромосомными транслокациями [248]. В настоящее время хромосомные транслокации рассматриваются в качестве основной причины возникновения многих типов злокачественных опухолей [34, 249, 250]. Наблюдается бум поиска новых хромосомных транслокаций, приводящих к появлению химерных РНК и белков, которые могут служить как диагностическими маркерами заболевания, так и терапевтическими мишенями [251, 252].

Широкомасштабное секвенирование индивидуальных человеческих геномов позволяет выявить весь спектр хромосомных аномалий и способствует обнаружению новых транслокаций, которые невозможно выявить другими методами [216, 217]. Понятно, что следующий этап – это выяснение, какие из хромосомных аномалий являются рекуррентными и способствуют злокачественному переждению клеток, а какие – неспецифичны и не имеют отношения к злокачественному процессу, или, как теперь принято говорить, какие аномалии являются «водителями» (drivers), а какие – «пассажирами» (passengers) канцерогенеза [253–255].

В апреле 2008 г. был организован Международный Консорциум Генома Рака (ICGC) для координации создания каталогов генетических аномалий (соматических мутаций) опухолей 50 различных типов злокачественных заболеваний, имеющих клиническую и социальную важность во всем мире [256]. В апреле 2010 г. ICGC объявил о своих планах по расшифровке геномов 25000 образцов злокачественных опухолей (по 500 опухолей каждого типа злокачественного новообразования) [257], что вполне реально при использовании методов секвенирования нового поколения. Цель такого глобального исследования – получить всеобъемлющее описание геномных, транскриптомных и эпигеномных изменений в 50 различных типах опухолей и/или подтипах для поиска закономерностей таких изменений (то есть для обнаружения «водителей» заболеваний) и как можно быстрее сделать собранные данные доступными для исследователей всего мира, публикуя их по мере появления на сайте Консорциума в бесплатном доступе [257]. В этом проекте участвуют 11 стран [256].

По сути, начинается новая эра в лечении злокачественных заболеваний – становится возможной «персональная медицина». «Мы вступаем в эпоху, когда рекомендации по лечению рака должны основыв-

ваться на генетике опухоли конкретного пациента», – заявил в пресс-релизе член ICGC Э.Ландер президент и директор Общего Института (Broad Institute) Гарвардского Университета и Массачусетского Технологического Института [258].

Прогресс в медицине и других науках стремителен, и есть основания для надежды, что онкологические заболевания в скором времени перейдут из разряда пугающих своим фатальным исходом во вполне «нормальные», поддающиеся лечению. Мы надеемся, что в решение этой задачи весьма существенный вклад внесут наноклонии, став основой эффективных методов скрининга и ранней диагностики, выяснения действенности лекарственных препаратов у конкретного пациента. Наноклонии позволяют быстро выявлять наличие устойчивых к терапии злокачественных клеточных клонов, подобрать оптимальную схему лечения МОБ, предсказать возможность рецидива. С помощью наноклоний реально проведение широкомасштабного секвенирования геномов для обнаружения полного спектра хромосомных аномалий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) *Science*, **230**, 1350–1354.
2. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) *Science*, **239**, 487–491.
3. van Dongen, J.J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Díaz, M.G., Malec, M., Langerak, A.W., San Miguel, J.F., Biondi, A. (1999) *Leukemia*, **13**, 1901–1928.
4. Baer, M.R. (2002) *Curr. Oncol. Rep.*, **4**, 398–402.
5. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J. (2003) *Leukemia*, **17**, 1013–1034.
6. LeDuc J.W., Damon I., Meegan J.M., Relman D.A., Huggins J., Jahrling P.B. (2002) *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 743–745.
7. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (2002). Молекуляр. Биология, **36**, 320–327.
8. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (2003). Молекуляр. Медицина, **2**, 30–40.
9. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (1995) Патент РФ № 2048522.
10. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (1998) Патент РФ № 2114175.
11. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (1998) Патент РФ № 2114915.
12. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V. (1997) U.S. Patent 5,616,478.
13. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V. (1999) U.S. Patent 5,958,698.
14. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V. (1999) U.S. Patent 6,001,568.
15. Четверина Е.В., Четверин А.Б. (2008) Успехи Биол. Химии, **48**, 3–64.

16. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V.* (2008) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **82**, 219–255.
17. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Munishkin, A.V.* (1991) *J. Mol. Biol.*, **222**, 3–9.
18. *Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2349–2353.
19. *Chetverina, H.V., Samatov, T.R., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B.* (2002) *BioTechniques*, **33**, 150–156.
20. *Chetverina, H.V., Falaleeva, M.V., Chetverin, A.B.* (2004) *Anal. Biochem.*, **334**, 376–381.
21. *Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I., and Chetverin, A.B.* (1999) *FEBS Lett.*, **450**, 89–94.
22. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I.* (1997) *Cell* **88**, 503–513.
23. *Chetverin, A.B., Kopein, D.S., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8748–8755.
24. *Samatov, T. R., Chetverina, H. V., Chetverin, A. B.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e145.
25. *Chetverin, A.B., Samatov, T.R., Chetverina, H.V.* (2008) *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols / A.S. Spirin, J.R. Swartz, Weinheim: Wiley-VCH*, 191–206.
26. *Nardi, V., Raz, T., Cao, X., Wu, C.J., Stone, R.M., Cortes, J., Deininger, M.W., Church, G., Zhu, J., Daley, G.Q.* (2008) *Oncogene*, **27**, 775–782.
27. *Фалалеева М.В., Четверина Е.В., Кравченко А.В., Четверин А.Б.* (2009) *Молекуляр. биология*, **43**, 180–189.
28. *Mitra, R.D., Butty, V.L., Shendure, J., Williams, B.R., Housman, D.E., Church, G.M.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 5926–5931.
29. *Xu, Q., Lee, C.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5635–5643.
30. *Mitra, R.D., Shendure, J., Olejnik, J., Krzymanska-Olejnik, E., Church, G.M.* (2003) *Anal Biochem.*, **320**, 55–65.
31. *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2010) / Eds. F. Mitelman, B. Johansson, F. Mertens, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, данные на 18 февраля 2010 г.*
32. *Kleihues, P., Sobin, L.H.* (2000) *World Health Organization classification of tumors. Cancer*, **88**, 2887.
33. *Fröhling, S., Döhner, H.* Chromosomal abnormalities in cancer. (2008) *N. Engl. J. Med.*, **359**, 722–734.
34. *Nambiar, M., Kari, V., Raghavan, S.C.* (2008) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1786**, 139–152.
35. *An international system for human cytogenetic nomenclature (1978), ISCN. (1978) Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. (1978) / Ed. D. Bergsma, Basel: S. Karger.*
36. *ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (1995) / Ed. F. Mitelman, Basel: S. Karger.*
37. *ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (Cytogenetic & Genome Research). (2005) / Basel: S. Karger.*
38. *Brothman, A.R., Persons, D.L., Shaffer, L.G.* (2010) *Cytogenet. Genome Res.*, **127**, 1–4.
39. *Belloni, E., Trubia, M., Mancini, M., Derme, V., Nanni, M., Lahortiga, I., Riccioni, R., Confalonieri, S., Lo-Coco, F., Di Fiore, P.P., Pelicci, P.G.* (2004) *Genes Chromosomes Cancer*, **41**, 272–277.
40. *Kim, J., Pelletier, J.* (1999) *Physiol Genomics.*, **1**, 127–138.
41. *Ladanyi, M.* (2002) *Cancer Biol. Ther.*, **1**, 330–336.
42. *Sorensen, P.H.B., Lessnick, S.L., Lopez-Terrada, D., Liu, X.F., Triche,*

- T.J., Denny, C.T. (1994) *Nat. Genet.*, **6**, 146–151.
43. Weizmann Institute of Science, Israel, <http://www.genecards.org/>
44. Gulley, M.L., Shea, T.C., Fedoriw, Y. (2010) *J. Mol. Diagn.*, **12**, 3–16.
45. Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. (2009) *Blood*, **114**, 937–951.
46. Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J.M., Cavé H., Pane F., Aerts J.L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., González M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J.J. (2003) *Leukemia*, **17**, 2318–2357.
47. Peterson, L.F., Boyapati, A., Ahn, E.Y., Biggs, J.R., Okumura, A.J., Lo, M.C., Yan, M., Zhang, D.E. (2007) *Blood*, **110**, 799–805
48. Kakizuka, A., Miller, W.H.Jr, Umesono, K., Warrell, R.P.Jr, Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., Evans, R.M. (1991) *Cell*, **66**, 663–674.
49. Alcalay, M., Zangrilli, D., Fagioli, M., Pandolfi, P.P., Mencarelli, A., Lo Coco, F., Biondi, A., Grignani, F., Pelicci, P.G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 4840–4844.
50. Stams, W.A., den Boer, M.L., Beverloo, H.B., Meijerink, J.P., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., Pieters, R. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2974–2980.
51. de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J.R. (1982) *Nature*, **300**, 765–767.
52. Ben-Neriah, Y., Daley, G.O., Mes-Masson, A.M., Witte, O.N., Baltimore, D. (1986) *Science*, **233**, 212–214.
53. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999) *N. Engl. J. Med.*, **341**, 164–172.
54. Clark, S.S., McLaughlin, J., Crist, W.M., Champlin, R., Witte, O.N. (1987) *Science*, **235**, 85–88.
55. Hermans, A., Heisterkamp, N., von Linden, M., van Baal, S., Meijer, D., van der Plas, D., Wiedemann, L.M., Groffen, J., Bootsma, D., Grosveld, G. (1987) *Cell*, **51**, 33–40.
56. Melo, J.V., Gordon, D.E., Cross, N.C., Goldman, J.M. (1993) *Blood*, **81**, 158–165.
57. Melo, J.V., Gordon D.E., Tuszynski, A., Dhut, S., Young, B.D., Goldman, J.M. (1993) *Blood*, **81**, 2488–2491.
58. Zheng, X., Oancea, C., Henschler, R., Moore, M.A., Ruthardt, M. (2009) *PLoS One*, **4**, e7661.
59. Diamond, J., Goldman, J.M., Melo, J.V. (1995) *Blood*, **85**, 2171–2175.
60. Zheng, X., Güller, S., Beissert, T., Puccetti, E., Ruthardt, M. (2006) *BMC Cancer*, **6**, 262.
61. ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G., Croce, C.M. (1983) *Science*, **222**, 390–393.
62. Nishikura, K., ar-Rushdi, A., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G., Croce, C.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4822–4826.
63. Chen, J., Odenike, O., Rowley, J.D. (2010) *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 23–36.
64. Birnold, L.P., Coghlan, B., Jersmann, H. (2009) *Cell Oncol.*, **31**, 61.
65. Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960) *Science*, **132**, 1497.
66. Rowley, J.D. (2001) *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 245–250.
67. Копнин Б.П. (2007) *Молекул. биология*, **41**, 369–380.
68. Winkelmann, A. (2007) *Clin. Anat.*, **20**, 231–234.
69. Flemming, W.J. (1965) *Cell Biol.*, **25**, 3–69.
70. Paweletz, N. (2001) *Nature Rev. Cell Biol.*, **2**, 72–75.

71. Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. (1981) М.: Мир., (Stent, G.S., Calendar, R. Molecular Genetics. An introductory Narrative., 2nd Edition. San Francisco: W.H. Freeman and Company.)
72. Sturtevant, A.H., Bridges, C.B., Morgan, T.H. (1919) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **5**, 168–173.
73. Morgan, T.H., Sturtevant, A.H., Bridges, C.B. (1920) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **6**, 162–164.
74. Boveri, T. (2008) J. Cell Sci. **121**, Suppl 1: 1–84.
75. McKusick, V.A. (1985) J. Med. Genet., **22**, 431–440.
76. Mendel, G. (1986) American Zoologist **26**, 749–752.
77. Уотсон Д. (1978) Молекулярная биология гена. М.: Мир. (Watson, J.D. Molecular biology of the gene. 3rd Edition, Harvard University and Cold Spring Harbor Laboratory.)
78. Sturtevant, A.H. (1921) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **7**, 235–237.
79. Belling, J., Blakeslee, A.F. (1926) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **12**, 7–11.
80. Muller, H.J. (1928) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **14**, 714–726.
81. Stadler, L.J. (1928) Science, **68**, 186–187.
82. McClintock, B. (1930) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **16**, 791–796.
83. Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M. (1944) J. Exp. Med., **79**, 137–158.
84. Watson, J.D., Crick, F.H. (1953) Nature, **171**, 737–738.
85. Tjio, J.H., Levan, A. (1956) Hereditas, **42**, 1–6.
86. Garcia-Sagredo, J.M. (2008) Biochim. Biophys. Acta, **1779**, 363–375.
87. Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U., Simonson, E. (1969) Exp. Cell. Res., **58**, 128–140.
88. Caspersson, T., Lomakka, G., Zech, L. (1971) Hereditas, **67**, 89–102.
89. Rowley, J.D. (2008) Blood, **112**, 2183–2189.
90. Rowley, J.D. (1973) Ann. Genet., **16**, 109–112.
91. Rowley, J.D. (1973) Nature, **243**, 290–293.
92. Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K., Klein, G. (1976) Int. J. Cancer, **17**, 47–56.
93. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7837–7841.
94. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., Croce, C.M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7824–7827.
95. Erikson, J., Finan, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5611–5615.
96. Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., Grosveld, G. (1984) Cell, **36**, 93–99.
97. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., Ohki, M. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 10431–10434.
98. Erickson, P., Gao, J., Chang, K.S., Look, T., Whisenant, E., Raimondi, S., Lasher, R., Trujillo, J., Rowley, J., Drabkin, H. (1992) Blood, **80**, 1825–1831.
99. World Cancer Report 2008 International agency for research on Cancer. (2008) / Eds. P. Boyle, B. Levin. Lyon.
100. Henderson, E.S., Han, T. (1986) CA Cancer J. Clin., **36**, 322–350.
101. Справочник-путеводитель практикующего врача. 2000 болезней от А до Я. Ред. И.Н. Денисова, Э.Г. Улумбекова, 1999, М.: ГЭОТАР-МЕД.

102. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (2001) / Eds. E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein et al. Lyon, France: IARC.
103. SEER Cancer Statistics Review (1975–2006) / Eds. Horner, M.J., Ries, L.A.G., Krapcho, M. et al.. Bethesda, MD: National Cancer Institute. (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009).
104. Давыдов М.И., Аксель Е.М. (2008) Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, **19**, 52–90.
105. Козиней Г.И., Сарычева Т.Г., Луговская С.А., Дягилева О.А., Погорелов В.М., Проценко Д.Д. (2009) Гематологический атлас: настольное руководство врача-лаборанта. М.: Практическая медицина, 191.
106. Лейкозы у детей. (2009) / Ред. Г.Л. Менткевич, С.А. Маякова., М.: Практическая медицина, 381.
107. Аксель Е.М., Горбачева И.А. (2008) Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, **19**, 135–152.
108. Давыдов М.И., Аксель Е.М. (2008) Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, **19**, 91–119.
109. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics (USCS): 1999–2006 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; 2010. Available at: www.cdc.gov/uscs.
110. Raanani P, Ben-Bassat I. (2004) Acta Haematol., **112**, 40–54.
111. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>)
112. Pui, C.H., Relling, M.V., Downing, J.R. (2004) N. Engl. J. Med., **350**, 1535–1548.
113. GENE DATAbase: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>
114. Zhang, Y., Rowley, J.D. (2006) DNA Repair, **5**, 1282–1297.
115. Deschler, B., Lobbert, M. (2006) Cancer, **107**, 2099–2107.
116. Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning R.D. (2002) Blood, **100**, 2292–2302.
117. Marcucci, G. (2009) Clin. Adv. Hematol. Oncol., **7**, 448–451.
118. Mrózek, K., Bloomfield, C.D. (2006) Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program., 169–177.
119. Ravandi, F., Burnett, A.K., Agura, E.D., Kantarjian, H.M. (2007) Cancer, **110**, 1900–1910.
120. Lutterbach, B., Hiebert, S.W. (2000) Gene, **245**, 223–235.
121. Wang, L., Huang, G., Zhao, X., Hatlen, M.A., Vu, L., Liu, F., Nimer, S.D. (2009) Blood Cells Mol. Dis., **43**, 30–34.
122. Kumano, K., Kurokawa, M. (2010) J. Cell Physiol., **222**, 282–285.
123. De Braekeleer, E., Fürec, C., De Braekeleer, M. (2009) Anticancer Res., **29**, 1031–1037.
124. Hug, B.A., Lazar, M.A. (2004) Oncogene, **23**, 4270–4274.
125. Davis, J.N., McGhee, L., Meyers, S. (2003) Gene, **303**, 1–10.
126. Peterson, L.F., Zhang, D.E. (2004) Oncogene, **23**, 4255–4262.
127. Downing, J.R., Head, D.R., Curcio-Brint, A.M., Hulshof, M.G., Motroni, T.A., Raimondi, S.C., Carroll, A.J., Drabkin, H.A., Willman, C., Theil, K.S., Civin, C.I., Erickson, P. (1993) Blood, **81**, 2860–2865.

128. Kozu, T., Miyoshi, H., Shimizu, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Asou, H., Kamada, N., Ohki, M. (1993) *Blood*, **82**, 1270–1276.
129. Tighe, J.E., Calabi, F. (1994) *Blood*, **84**, 2115–2121.
130. van de Locht, L.T., Smetsers, T.F., Wittebol, S., Raymakers, R.A., Mensink, E.J. (1994) *Leukemia*, **8**, 1780–1784.
131. Goodrich, D.W., Duesberg, P.H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2052–2056.
132. Meyerhans, A., Vartanian J.P., Wain-Hobson S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1687–1691.
133. Pääbo, S. Irwin. D.M., Wilson, A.C. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 4718–4721.
134. Era, T., Asou, N., Kunisada, T., Yamasaki, H., Asou, H., Kamada, N., Nishikawa, S., Yamaguchi, K., Takatsuki, K. (1995) *Genes Chromosomes Cancer*, **13**, 25–33.
135. Yan, M., Kanbe, E., Peterson, L.F., Boyapati, A., Miao, Y., Wang, Y., Chen, I.M., Chen, Z., Rowley, J.D., Willman, C.L., Zhang, D.E. (2006) *Nat Med.*, **12**, 945–949.
136. Lee, S., Chen, J., Zhou, G., Shi, R.Z., Bouffard, G.G., Kocherginsky, M., Ge, X., Sun, M., Jayathilaka, N., Kim, Y.C., Emmanuel, N., Bohlander, S.K., Minden, M., Kline, J., Ozer, O., Larson, R.A., LeBeau, M.M., Green, E.D., Trent, J., Karrison, T., Liu, P.P., Wang, S.M., Rowley, J.D. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1030–1035.
137. Elagib, K.E., Goldfarb, A.N. (2007) *Cancer Lett.*, **251**, 179–186.
138. Bateman, C.M., Colman, S.M., Chaplin, T., Young, B.D., Eden, T.O., Bhakta, M., Gratias, E.J., van Wering, E.R., Cazzaniga, G., Harrison, C.J., Hain, R., Ancliff, P., Ford, A.M., Kearney, L., Greaves, M. (2010) *Blood*, Jan 8.
139. Ford, A.M., Ridge, S.A., Cabrera, M.E., Mahmoud, H., Steel, C.M., Chan, L.C., Greaves, M. (1993) *Nature*, **363**, 358–360.
140. Ford, A.M., Bennett, C.A., Price, C.M., Bruin, M.C., Van Wering, E.R., Greaves, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4584–4588.
141. Maia, A.T., Koechling, J., Corbett, R., Metzler, M., Wiemels, J.L., Greaves, M. (2004) *Genes Chromosomes Cancer*, **39**, 335–340.
142. McHale, C/M., Smith, M.T. (2004) *Am. J. Hematol.*, **75**, 254–257.
143. Osada, S., Horibe, K., Oiwa, K., Yoshida, J., Iwamura, H., Matsuoka, H., Adachi, K., Morishima, Y., Ohno, R., Ueda, R., et al. (1990) *Cancer*, **65**, 1146–1149.
144. Isoda, T., Ford, A.M., Tomizawa, D., van Delft, F.W., De Castro, D.G., Mitsuiki, N., Score, J., Taki, T., Morio, T., Takagi, M., Saji, H., Greaves, M., Mizutani, S. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17882–17885.
145. Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, L.E., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C., Greaves, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8242–8247.
146. Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C.J., Burel, S.A., Lagasse, E., Weissman, I.L., Akashi, K., Zhang, D.E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10398–10403.
147. Armitage, P., Doll, R. (1957) *Br. J. Cancer*, **11**, 161–169.
148. Knudson, A.G. (2001) *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 157–162.
149. Kern, S.E. (2002) *Cancer Biol. Ther.*, **1**, 571–581.

150. *Amann, J.M., Nip, J., Strom, D.K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J.R., Meyers, S., Hiebert, S.W.* (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6470–6483.
151. *Wolford, J.K., Prochazka, M.* (1998) *Gene*, **212**, 103–109.
152. *Hess, J.L., Hug, B.A.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16985–16986.
153. *Ford, A.M., Palmi, C., Bueno, C., Hong, D., Cardus, P., Knight, D., Cazzaniga, G., Enver, T., Greaves, M.* (2009) *J. Clin. Invest.*, **119**, 826–836.
154. *Kern, W., Schoch, C., Haferlach, T., Schnittger, S.* (2005) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 283–309.
155. *Ferrara, F., Palmieri, S., Mele, G.* (2004) *Haematologica*, **89**, 998–1008.
156. *Батурина Ю.А., Попа А.В., Сокова О.И., Кириченко О.П., Константинова Л.Н., Кулагина О.Е., Шаманский С.В., Маякова С.А., Масчан А.А., Флейшман Е.В.* (2002) *Гематол. и трансфузиол.*, **47**, 10–14.
157. *Ito, Y., Miyamura, K.* (1994) *Leuk. Lymphoma*, **16**, 57–64.
158. *Fathi, A.T., Grant, S., Karp, J.E.* (2010) *Cancer Treat. Rev.*, **36**, 142–150.
159. *Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C.H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D., Kantarjian, H.M.* (2010) *Cancer*, **116**, 1165–1176.
160. *Fausel, C.* (2007) *J. Manag. Care Pharm.*, **13** (8 Suppl A), 8–12.
161. *Hamilton, A., Gallipoli, P., Nicholson, E., Holyoake, T.L.* (2010) *J. Pathol.*, **220**, 404–418.
162. *Баранов А.А., Баженова Л.К., Баяндина Г.Н., Генпе Н.А., Горелов А.В., Зиновьева Г.А., Каганов Б.С., Капранова Е.И., Лыскина Г.А., Подчерняева Н.С., Шахбазян И.Е., Шишов А.Я., Эрдес С.И.* (2002). *Детские болезни. Учебн. для медвузов. М.: ГЭОТАР-МЕД.*
163. *Marcucci, G., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D.* (2003) *Eur. J. Haematol.*, **71**, 143–154.
164. *Leroy, H., de Botton, S., Grardel-Duflos, N., Darre, S., Leleu, X., Roumier, C., Morschhauser, F., Lai, J.L., Bauters, F., Fenaux, P., Preudhomme, C.* (2005) *Leukemia*, **19**, 367–372.
165. *Campana, D.* (2009) *Semin. Hematol.*, **46**, 100–106.
166. *Szczepański, T.* (2007) *Leukemia*, **21**, 622–626.
167. *Stow, P., Key, L., Chen, X., Pan, Q., Neale, G.A., Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Zhou, Y., Pui, C.H., Campana, D.* (2010) *Blood*, **115**, 4657–4663.
168. *Bader, P., Kreyenberg, H., Henze, G.H., Eckert, C., Reising, M., Wiltsch, A., Barth, A., Borkhardt, A., Peters, C., Handgretinger, R., Sykora, K.W., Holter, W., Kabisch, H., Klingebiel, T., von Stackelberg, A., ALL-REZ BFM Study Group.* (2009) *J. Clin. Oncol.*, **27**, 377–384.
169. *Spinelli, O., Peruta, B., Tosi, M., Guerini, V., Salvi, A., Zanotti, M.C., Oldani, E., Grassi, A., Intermesoli, T., Micò, C., Rossi, G., Fabris, P., Lambertenghi-Deliliers, G., Angelucci, E., Barbui, T., Bassan, R., Rambaldi, A.* (2007) *Haematologica*, **92**, 612–618.
170. *Bassan, R., Spinelli, O., Oldani, E., Intermesoli, T., Tosi, M., Peruta, B., Rossi, G., Borlenghi, E., Pogliani, E.M., Terruzzi, E., Fabris, P., Cassibba, V., Lambertenghi-Deliliers, G., Cortelezzi, A., Bosi, A., Gianfaldoni, G., Ciceri, F., Bernardi, M., Gallamini, A., Mattei, D.,*

- Di Bona, E., Romani, C., Scattolin, A.M., Barbui, T., Rambaldi, A.* (2009) *Blood*, **113**, 4153–4162.
171. *Padilla-Nash, H.M., Barenboim-Stapleton, L., Difilippantonio, M.J., Ried, T.* (2006) *Nat. Protoc.*, **1**, 3129–3142.
172. *Lucio, P., Gaipa, G., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Porwit-MacDonald, A., Faria, T., Bjorklund, E., Biondi, A., van den Beemd, M.W., Baars, E., Vidriales, B., Parreira, A., van Dongen, J.J., San Miguel, J.F., Orfao, A.* *BIOMED-I.* (2001) *Leukemia*, **15**, 1185–1192.
173. *van der Velden, V.H., Boeckx, N., van Wering, E.R., van Dongen, J.J.* (2004) *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, **18**, 146–154.
174. *Al-Mawali, A., Gillis, D., Hissaria, P., Lewis, I.* (2008) *Am. J. Clin. Pathol.*, **129**, 934–945.
175. *Al-Mawali, A., Gillis, D., Lewis, I.* (2009) *Am. J. Clin. Pathol.*, **131**, 16–26.
176. *Craig, F.E., Foon, K.A.* (2008) *Blood*, **111**, 3941–3967.
177. *Shook, D., Coustan-Smith, E., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Campana, D.* (2009) *Clin. Lymphoma Myeloma*, **9** Suppl 3:S281–285.
178. *Wood, B.L., Arroz, M., Barnett, D., DiGiuseppe, J., Greig, B., Kussick, S.J., Oldaker, T., Shenkin, M., Stone, E., Wallace, P.* (2007) *Cytometry. B. Clin. Cytom.*, **72** Suppl 1:S14–22.
179. *Dimov, N.D., Medeiros, L.J., Ravandi, F., Bueso-Ramos, C.E.* (2010) *Am. J. Clin. Pathol.*, **133**, 484–490.
180. *Bustin, S.A., Mueller, R.* (2005) *Clin. Sci. (Lond.)*, **109**, 365–379.
181. *Sessions, J.* (2007) *J. Manag. Care Pharm.*, **13** (8 Suppl A), 4–7.
182. *Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F., Minden, M.D.* (2007) *Leukemia*, **21**, 868–876.
183. *Barragan, E., Pajuelo, J.C., Ballester, S., Fuster, O., Cervera, J., Moscardo, F., Senent, L., Such, E., Sanz, M.A., Bolufer, P.* (2008) *Clin. Chim. Acta*, **395**, 120–123.
184. *Mitra, R.D., Church, G.M.* (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, e34.
185. *Четверина Е.В., Кравченко А.В., Фалалеева М.В., Четверин А.Б.* (2007) *Биоорган. химия*, **33**, 456–463.
186. *Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (2006) *Anal. Biochem.*, **356**, 300–302.
187. *Четверина Е.В., Четверин А.Б., Кравченко А.В.* (2008) *Патент РФ № 2338787 C2*, 18 с.
188. *Förster, T.* (1948) *Ann. Physik.* **2**, 55–75.
189. *Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8790–8794.
190. *Tyagi, S., Landegren, U., Tazi, M., Lizardi, P.M., Kramer, F.R.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5395–5400.
191. *Müller, M.C., Hördt, T., Paschka, P., Merx K., La Rosée, P., Hehlmann, R., Hochhaus, A.* (2004) *Acta Haematol.*, **112**, 30–33.
192. *Nucleic Acid Sample Preparation for Downstream Analyses. Principles and Methods.* (2010) *Handbooks from GE Healthcare. GE Healthcare Bio-Sciences AB.*
193. *Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V.H., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., Watzinger, F., Lion, T., van Dongen, J.J., Hokland, P.,*

- Gabert, J. (2003) *Leukemia*, **17**, 2474–2486.
194. *Boyum, A.* (1964) *Nature*, **204**, 793–794.
195. *van der Velden, V.H., Boeckx, N., Gonzalez, M., Malec, M., Barbany, G., Lion, T., Gottardi, E., Pallisgaard, N., Beillard, E., Hop, W.C., Hoogeveen, P.G., Gabert, J., van Dongen, J.J., Europe Against Cancer Program.* (2004) *Leukemia*, **18**, 884–886.
196. *Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J.* (1979) *Biochemistry*, **18**, 5294–5299.
197. *Кравченко А.В., Четверина Е.В., Четверин А.Б.* (2006) *Биоорганическая химия*, **32**, 609–614.
198. *Четверина Е.В., Четверин А.Б., Кравченко А.В.* (2008) *Патент РФ № 2322058 С2*, 12 с.
199. *Chomczynski, P., Sacchi, N.* (1987) *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
200. *Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J.* (1990) *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495–503.
201. *Bustin, S.A., Mueller, R.* (2006) *Mol. Aspects Med.*, **27**, 192–223.
202. *Leparc, G.G., Mitra, R.D.* (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, e146.
203. *Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.* (1994) *Molecular Biology of the Cell*, edn. 3. NY: Garland Publishing.
204. *Фалалеева М.В., Четверина Е.В., Кравченко А.В., Заболотнева Ю.А., Саматов Т.Р., Бобрынина В.О., Масчан М.А., Четверин А.Б.* (2006) Научно-практическая конференция «Живые системы» в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники в 2002–2006 гг.», Сборник докладов. 238–243.
205. *Okumura, A.J., Peterson, L.F., Lo, M.C., Zhang, D.E.* (2007) *Exp. Hematol.*, **35**, 978–988.
206. *Четверин А.Б., Саматов Т.Р., Четверина Е.В.* (2006) Заявка на получение патента РФ № 2006109271.
207. *Chetverin, A.B., Samatov, T.R., Chetverina, H.V.* (2007). PCT Publication WO2007111639.
208. *Merritt, J., Butz, J.A., Ogunnaiké, B.A., Edwards, J.S.* (2005) *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 519–531.
209. *Merritt, J., Roberts, K.G., Butz, J.A., Edwards, J.S.* (2007) *Genomic Med.*, **1**, 113–124.
210. *Luthra, R., Sanchez-Vega, B., Medeiros, L.J.* (2004) *Mod. Pathol.*, **17**, 96–103.
211. *Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., Church, G.M.* (2005) *Science*, **309**, 1728–1732.
212. *Shapero, M.H., Leuther, K.K., Nguyen, A., Scott, M., Jones, K.W.* (2001) *Genome Res.*, **11**, 1926–1934.
213. *Cai, F., Chen, H., Hicks, C.B., Bartlett, J.A., Zhu, J., Gao, F.* (2007) *Nat. Methods.*, **4**, 123–125.
214. *Bentley, D.R.* (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**, 545–552.
215. *ten Bosch, J.R., Grody, W.W.* (2008) *J. Mol. Diagn.*, **10**, 484–492.
216. *Campbell, P.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., O'Meara, S., Li, H., Santarius, T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Hardy, C., Teague, J.W., Menzies, A., Goodhead, I., Turner, D.J., Clee, C.M., Quail, M.A., Cox, A., Brown, C., Durbin, R., Hurles, M.E., Edwards, P.A., Bignell, G.R., Stratton, M.R., Futreal, P.A.* (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 722–729.

217. Newman, S., Edwards, P.A. (2010) *Genome Med.*, **2**, 19.
218. Davidson, S. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 1134–1135.
219. Eklund, E.A. (2010) *Curr. Opin. Hematol.*, **17**, 75–78.
220. Zhang, K., Zhu, J., Shendure, J., Porreca, G.J., Aach, J.D., Mitra, R.D., Church, G.M. (2006) *Nat. Genet.* **38**, 382–387.
221. Reeve, A.E., Sih, S.A., Raizis, A.M., Feinberg, A.P. (1989) *Mol. Cell Biol.* **9**, 1799–1803.
222. Silva, F.P., Morolli, B., Storlazzi, C.T., Anelli, L., Wessels, H., Bezrookove, V., Kluin-Nelemans, H.C., Giphart-Gassler, M. (2003) *Oncogene*. **22**, 538–547.
223. Butz, J., Wickstrom, E., Edwards, J.S. (2003) *BMC Biotechnology*, **3**, 11.
224. Warner, J.K., Wang, J.C., Hope, K.J., Jin, L., Dick, J.E. (2004) *Oncogene*, **23**, 7164–7177.
225. Wang, J.C., Dick, J.E. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 494–501.
226. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C., Druker, B.J., Gabert, J., Grimwade, D., Hehlmann, R., Kamenel-Reid, S., Lipton, J.H., Longtine, J., Martinelli, G., Saglio, G., Soverini, S., Stock, W., Goldman, J.M. (2006) *Blood*, **108**, 28–37.
227. He, C., Zhou, F., Zuo, Z., Cheng, H., Zhou, R. (2009) *PLoS One.*;4, e4732.
228. Zhu, J., Shendure, J., Mitra, R.D., Church, G.M. (2003) *Science*, **301**, 836–838.
229. Conrad, C., Zhu, J., Conrad, C., Schoenfeld, D., Fang, Z., Ingelsson, M., Stamm, S., Church, G., Hyman, B. T. (2007) *J. Neurochem.*, **103**, 1228–1236.
230. Butz, J.A., Roberts, K.G., Edwards, J.S. (2004) *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1836–1839.
231. Berger, M.F., Levin, J.Z., Vijayendran, K., Sivachenko, A., Adiconis, X., Maguire, J., Johnson, L.A., Robinson, J., Verhaak, R.G., Sougnez, C., Onofrio, R.C., Ziaugra, L., Cibulskis, K., Laine, E., Barretina, J., Winckler, W., Fisher, D.E., Getz, G., Meyerson, M., Jaffe, D.B., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Dummer, R., Gnirke, A., Nusbaum, C., Garraway, L.A. (2010) *Genome Res.*, Feb 23.
232. Tuch, B.B., Laborde, R.R., Xu, X., Gu, J., Chung, C.B., Monighetti, C.K., Stanley, S.J., Olsen, K.D., Kasperbauer, J.L., Moore, E.J., Broomer, A.J., Tan, R., Brzoska, P.M., Muller, M.W., Siddiqui, A.S., Asmann, Y.W., Sun, Y., Kuersten, S., Barker, M.A., De La Vega, F.M., Smith, D.I. (2010) *PLoS One*, **5**, e9317.
233. Butz, J.A., Yan, H., Mikkilineni, V., Edwards, J.S. (2004) *BMC Genet.*, **5**, 3.
234. Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A. (2010) *Carcinogenesis*. **31**, 27–36.
235. Figueroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P.J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., Campagne, F., Mazumdar, M., Grealley, J.M., Valk, P.J., Löwenberg, B., Delwel, R., Melnick, A. (2010) *Cancer Cell*, **17**, 13–27.
236. Bullinger, L., Armstrong, S.A. (2010) *Cancer Cell*, **17**, 1–3.
237. Toyota, M., Kopecky, K.J., Toyota, M.O., Jair, K.W., Willman, C.L., Issa, J.P. (2001) *Blood*, **97**, 2823–2829.

238. Santini, V., Kantarjian, H.M., Issa, J.P. (2001) *Ann. Intern. Med.*, **134**, 573–586.
239. Silverman, L.R., McKenzie, D.R., Peterson, B.L., et al. (2006) *J. Clin. Oncol.*, **24**, 3895–3903.
240. Zhou, D., Zhang, R., Fang, R., Cheng, L., Xiao, P., Lu, Z. (2008) *Electrophoresis*, **29**, 626–633.
241. Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 331–334.
242. Tognon, C., Knezevich, S.R., Huntsman, D., Roskelley, C.D., Melnyk, N., Mathers, J.A., Becker, L., Carneiro, F., MacPherson, N., Horsman, D., Poremba, C., Sorensen, P.H. (2002) *Cancer Cell*, **2**, 367–376.
243. Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K.J., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M. (2005) *Science*, **310**, 644–648.
244. Wang, J., Cai, Y., Ren, C., Ittmann, M. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 8347–8351.
245. Winnes, M., Lissbrant, E., Damber, J.E., Stenman, G. (2007) *Oncol. Rep.*, **17**, 1033–1036.
246. Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., Mano, H. (2007) *Nature*, **448**, 561–566.
247. Lin, E., Li, L., Guan, Y., Soriano, R., Rivers, C.S., Mohan, S., Pandita, A., Tang, J., Modrusan, Z. (2009) *Mol. Cancer Res.*, **7**, 1466–1476.
248. Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F. (2007) *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 233–245.
249. Brenner, J.C., Chinnaiyan, A.M. (2009) *Biochem. Biophys. Acta*, **1796**, 201–215.
250. Edwards, P.A. (2010) *J. Pathol.*, **220**, 244–254.
251. Morris, D.S., Tomlins, S.A., Montie, J.E., Chinnaiyan, A.M. (2008) *BJU Int.*, **102**, 276–282.
252. Howarth, K.D., Blood, K.A., Ng, B.L., Beavis, J.C., Chua, Y., Cooke, S.L., Raby, S., Ichimura, K., Collins, V.P., Carter, N.P., Edwards, P.A. (2008) *Oncogene*, **27**, 3345–3359.
253. Greenman, C., et al. (2007) *Nature*, **446**, 153–158.
254. Campbell, P.J., Plesance, E.D., Stephens, P.J., Dicks, E., Rance, R., Goodhead, I., Follows, G.A., Green, A.R., Futreal, P.A., Stratton, M.R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13081–13086.
255. Wang, X.S., Prensner, J.R., Chen, G., Cao, Q., Han, B., Dhanasekaran, S.M., Ponnala, R., Cao, X., Varambally, S., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Beer, D.G., Palanisamy, N., Sartor, M.A., Omenn, G.S., Chinnaiyan, A.M. (2009) *Nat Biotechnol.*, **27**, 1005–1011.
256. http://www.icgc.org/files/icgc/ICGC_April_29_2008_en.pdf.
257. International network of cancer genome projects. (2010) *Nature*, **15**;464, 993–998.
258. Thomas, U.G. (2010) International consortium plans to sequence 25,000 cancer tumors *BioTechnique*, **48**, News.
259. Gollin, S.M. (2007) *Semin. Cancer Biol.*, **17**, 74–79.
260. PCR testing for BCR-ABL gene rearrangement in CML. (2003) MSAC reference 9a (i) Assessment report, Canberra (<http://nzhta.chmeds.ac.nz/publications/poly04.pdf>).

261. *Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., Lichter, P.* (2000) *N. Engl. J. Med.*, **343**, 1910–1916/
262. HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (<http://www.genenames.org>).