

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

26 марта 2010 г.

Регистрационный № 142-1209

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЦЕПТОРНЫХ
ТИРОЗИНКИНАЗ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО
МИЕЛОЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.М. Кустанович, д-р мед. наук, проф.
О.В. Алейникова, Н.П. Кирсанова, М.А. Кривко, А.А. Мигас

Минск 2010

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Термоциклер
Центрифуги с охлаждением на 14000 об/мин
ПЦР боксы
Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле
Вакуумный аспиратор
Варипипетки (дозаторы)
Вортекс
Документирующая система
Камера Горяева
Магнитная мешалка с подогревом
Морозильник -20 °С
Спектрометр
Термомиксер
Histopaque
Тақ-полимераза
В-меркаптоэтанол
Агароза
Вода деионизованная
Изопропанол
Ингибитор РНКаз
Маркер молекулярного веса
Обратная транскриптаза
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
Рэндом гексамеры
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
Фосфатно-солевой буфер
Хлороформ
Этанол 70%
Этанол 96%
TRI-reagent
Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем — от 0,1 до 1000 мкл) и пробирки (объем — 0,2–50 мл)
Праймеры и пробы
Гистопак или Лимфопреп

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) объединяет группу заболеваний кроветворной системы, характеризующуюся опухолевой прогрессией клеток миелоидной линии гемопоэза. За последние десятилетия в лечении ОМЛ достигнут определенный успех. Прогресс был достигнут не только благодаря новым терапевтическим возможностям с использованием наиболее эффективных комбинаций цитостатических препаратов, трансплантации

костного мозга, но и новым диагностическим методам, основанным на изучении биологии лейкемических клеток.

Успехи цитогенетики и изучение молекулярных дефектов, обусловленных хромосомными aberrациями, позволили разделить ОМЛ на 3 группы. Первая — группа со сбалансированными хромосомными aberrациями, т. е. с aberrациями, при которых не происходит потери генетического материала. Эта группа представлена в основном реципрокными транслокациями с образованием химерных генов, в результате чего нарушается функция генов, кодирующих транскрипционные факторы, играющие ключевую роль в гемопоэзе. Так, для группы больных с благоприятным прогнозом, предвещающим хороший ответ на терапию, характерно выявление в лейкемических клетках транслокаций $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$ и $inv(16)/t(16;16)$. Больные с aberrациями этой группы при современной терапии имеют благоприятный прогноз [Haferlach T. et al., 2005]. Вторая — группа с несбалансированными хромосомными aberrациями, т. е. с aberrациями, при которых происходит потеря генетического материала, главным образом с делециями – потерей части или утратой целых хромосом. Неблагоприятный прогноз имеют больные ОМЛ, имеющие изменения 3q, 5, 7 хромосом, транслокации $t(6;9)(p23;q34)$ и $t(9;22)(q34;q13)$, сложные изменения кариотипа. Плохой прогноз у больных с хромосомными aberrациями этого типа позволяет предполагать в патогенезе ОМЛ этой группы роль антионкогенов, утрачиваемых в результате хромосомных потерь. Третью группу, в которую входят около половины всех больных ОМЛ, составляют лица с нормальным кариотипом. Дополнительно известно, что в основе 20–30% случаев ОМЛ лежат редкие клональные хромосомные изменения, прогностическое значение которых пока не установлено [Bienz M. et al., 2005].

Всемирная организация здравоохранения выделяет группу ОМЛ, в которых хромосомные aberrации не определяются цитогенетическими методами [Jaffe E.S. et al., 2001]. Отсутствие видимых цитогенетических нарушений затрудняет поиски молекулярных дефектов, поэтому патогенез лейкозов данной группы остается неясным. Больные с нормальным кариотипом традиционно относятся к группе с промежуточным прогнозом. Однако результаты применения различных лечебных программ показывают, что внутри этой группы существуют прогностически различные подгруппы. Это свидетельствует о том, что патогенетические мутации и особенности биологии их опухолевых клеток еще недостаточно изучены. Именно для этой группы пациентов актуальным является выявление дополнительных молекулярно-биологических маркеров, определяющих прогноз заболевания [Dohner K. et al., 2000, Falini V. et al., 2005, Fröhling S. et al., 2004]. В последние годы выявлены некоторые типы нарушений клеточного генома, которые не обусловлены или, по крайней мере, не всегда обусловлены видимыми хромосомными aberrациями, но вовлекают гены, играющие важную роль в гемопоэзе и патогенезе лейкозов.

Количество клинически значимых хромосомных aberrаций, мутантных или aberrантно экспрессирующихся генов значительно выросло в последнее время в результате масштабного скрининга с использованием секвенирования, микрочипов и т.д. и включает мутации генов *KIT*, *NPM1*, *C/EBP*, *WT1* [Fröhling S. et al., 2004, Goemans B.F. et al., 2005], внутреннюю tandemную дупликацию гена *FLT3-ITD* [Moreno I. et al. 2003; Nanri T. et al., 2005], aberrантно высокую экспрессию генов *WT1* [Ogawa H. et al., 2004], *BAALC* [Baldus C.D. et al., 2006].

В последние годы появилась и развивается новая концепция лейкозогенеза, согласно которой ОМЛ возникает в результате взаимодействия мутаций двух типов — I класса, пролиферативных, и мутаций II класса, блокирующих [Gilliland D.G., 2002]. До недавнего времени модель двухударного лейкозогенеза ограничивалась отсутствием четких примеров подобных мутаций. Однако сейчас известно, что химерный онкоген *CBFB-MYH11*, нарушающий функционирование транскрипционных факторов, является мутацией II класса. А лейкозные клетки 70% таких пациентов несут взаимно исключающие мутации рецепторных тирозинкиназ *KIT*, *FLT3*, которые формируют пролиферативный сигнал, характерный для мутаций I класса. Именно комбинации мутационных изменений генов-маркеров определяют биологическое поведение опухолевых клеток, поэтому подобные сочетания включены в современные протоколы терапии ОМЛ, такие как ОМЛ-ММ-2006. Кроме этого, выявление новых прогностически значимых молекулярно-биологических маркеров призвано увеличить число пациентов, для которых возможна стратификация по группам риска и, тем самым, более эффективная терапия.

FLT3. Ген *FLT3* кодирует рецептор тирозинкиназы, участвующий в пролиферации и дифференцировке клеток гемопоэза. Рецептор *FLT3* относится к III классу тирозинкиназных рецепторов, включающих *FMS*, *PDGFR*, *c-KIT* [Gilliland D.G. et al., 2002; Shurin M.R. et al., 1998]. При возникновении мутации в гене, кодирующем рецептор *FLT3*, происходит лиганд-независимая активация рецептора, его спонтанная димеризация и активация сигнальных путей в клеточное ядро для запуска клеточной пролиферации. Распространенным нарушением является мутация в гене *FLT3*, при которой происходит удвоение (дупликация) последовательности, кодирующей подмембранный домен (JM-домен) *FLT3/ITD* (*FLT3 Internal Tandem Duplication* — внутреннее tandemное удвоение). Длина дублируемой ДНК варьирует от 3 до 400 нуклеотидов в каждом индивидуальном случае ОМЛ, но всегда находится в пределах экзонов 14 и 15 подмембранного домена *FLT3*. Так как образующиеся при этом последовательности нуклеотидов находятся в пределах рамки считывания и не нарушают ее, эти изменения не препятствуют образованию функционально активного белка — *FLT3*-тирозинкиназы [Shurin M.R. et al., 1998].

Выделяют внутреннюю tandemную дупликацию юкстамедуллярного домена (*FLT3/ITD*) и точечные мутации (*FLT3/TKD*). Мутации

конститутивно активируют эту рецепторную тирозинкиназу за счет автофосфорилирования. Считают, что в результате этих мутаций происходит остановка дифференцировки, характерная для миелоидных лейкозных клеток [Lacayo N.Y. et al., 2004].

Частота FLT3/ITD при ОМЛ, по данным различных исследований, составляет от 16 до 26% больных [Thiede Ch. et al., 2002; Chen W. et al., 2005]. Эта мутация была обнаружена у 3% больных с миелодиспластическим синдромом [Frohling S. et al., 2002] и не обнаружена при хроническом миелолейкозе, хроническом лимфолейкозе, неходжкинских лимфомах и у здоровых доноров в клетках костного мозга и пуповинной крови, имеющих физиологически высокую экспрессию FLT3. У взрослых пациентов наиболее часто FLT3/ITD встречается при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ), особенно часто при его вариантной форме — M3v [Gale R.E. et al., 2005]. На втором месте по частоте обнаружения FLT3/ITD находится острый монобластный лейкоз, его вариант M5b. Реже данная мутация обнаруживается при M1-, M2- и M4-вариантах ОМЛ, а при M0, M6 и M7 — лишь у отдельных больных. Почти так же часто, как при остром промиелоцитарном лейкозе, FLT3/ITD обнаруживается у больных ОМЛ с нормальным кариотипом. У детей частота FLT3/ITD при ОМЛ примерно такая же, как у взрослых, хотя имеются некоторые отличия в частоте данной мутации при различных вариантах ОМЛ. Однако в отличие от взрослых основную группу детей с FLT3/ITD составляют больные с M1- и M2-вариантами ОНЛЛ — на их долю приходится 59% среди всех обследованных с данной мутацией, хотя так же, как у взрослых, FLT3/ITD очень редко встречалась при M2 с t(8;21). FLT3/ITD редко обнаруживается у детей с M3. FLT3/ITD не обнаружена ни у одного из детей с частыми при детском ОНЛЛ абберациями 11q23 [Chillón M.C. et al., 2004]. Более чем 50% больных детей с FLT3/ITD имеют нормальный кариотип [Gaidzik V., Döhner K., 2008]. Ch. Zwaan et al. (2003) обнаруживали FLT3/ITD достоверно чаще у детей старших групп: медиана возраста больных с мутацией составила 13,4 года, без указанной мутации — 8,8 года ($p < 0,001$). В отличие от взрослых мутация чаще встречалась у мальчиков. Частота FLT3/TKD при ОНЛЛ у детей достоверно неизвестна в связи с редкостью у них этого вида острого лейкоза и единичными проведенными исследованиями.

Наряду с FLT3 к семейству рецепторных тирозинкиназ III типа относится рецептор KIT. Ген KIT расположен на хромосоме 4q12 и кодирует трансмембранный гликопротеин, являющийся членом семейства рецепторных тирозинкиназ третьего типа. Лигандом данного рецептора является белок ФСТ (фактор стволовой клетки) [Blume-Jensen P., Hunter T., 2001; Reilly J.T., 2003]. Связывание ФСТ приводит к димеризации и трансфосфорилированию KIT, что, в свою очередь, вызывает активацию внутриклеточных сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции и survival, в особенности, в гемопоэтических стволовых клетках [Lennartsson J. et al., 2005]. Мутации данного гена наиболее часто встречаются в группе пациентов с СВФ-ОМЛ.

Активирующие мутации в данном гене наблюдаются в 8, 11, 12 и 17 экзонах. Инсерции/делеции в экзоне 8 или внутренние тандемные дубликации в экзоне 11 затрагивают внеклеточную часть рецептора с-KIT и предполагается, таким образом играют определенную роль в его димеризации. Точечные замены в 17 экзоне способны влиять на структуру активационной петли в тирозинкиназном домене [Gari M. et al., 1999; Beghini A. et al., 2000; Care R.S. et al., 2003; Kohl T.M. et al., 2005]. Наиболее часто встречающаяся мутация в 17 экзоне — D816V наблюдается в 2% случаев, в 8 экзоне — в 6–8% [Gari M. et al., 1999; Beghini A. et al., 2000; Care R.S. et al., 2003; Kohl T.M. et al., 2005; Ning Z.Q. et al., 2001; Schnittger S. et al., 2006]. Внутренние тандемные дубликации в экзонах 11 и 12 и имеют место в 7% детских ОМЛ [Beghini A. et al., 2004]. При ОМЛ встречаются активирующие мутации KIT, которые вызывают цитокин-независимое существование клеток и определяют ростовые преимущества опухолевых клеток.

Клинически значимым считается также наличие мутаций в генах *NPM1* и *CEBPA*.

Одним из наиболее распространенных нарушений у взрослых с ОМЛ (30–60% случаев) являются мутации в гене *NPM1*, кодирующем фосфопротеин, который перемещается из ядра в цитоплазму. Мутации приводят к конститутивной цитоплазматической локализации белка. Основным типом мутаций являются тетра-нуклеотидные вставки в 12 экзоне гена, хотя отмечаются и другие варианты мутаций. Большинство случаев с мутацией *NPM1* имеют нормальный кариотип и мутации в FLT3. Морфология и линейная принадлежность клеток с мутацией может значительно варьировать. В то же время практически отсутствует экспрессия CD34; это может говорить о том, что источником мутантного клона могут быть сравнительно дифференцированные клетки-предшественники. При этом пациенты с мутацией сравнительно хорошо отвечают на индукционную терапию, что позволяет относить лиц с мутацией и нормальным кариотипом в группу с промежуточным риском [Falini V. et al., 2007; Suzuki R., 2007].

Ген *CEBPA* (локализованный на 19q13.1) принадлежит к семейству ССААТ/энхансер-связывающих белков (С/EBP α , С/EBP β , С/EBP γ , С/EBP δ , С/EBP ϵ и С/EBP ζ), регулирующих баланс процессов пролиферации и терминальной дифференцировки. мРНК гена может транслироваться как с первого триплета AUG, кодируя изоформу белка размером 42 кДа, так и со второго, расположенного на 508–510 нуклеотидах, кодируя белок размером 30 кДа, в котором отсутствуют первые 119 аминокислот, включающих функциональную область TAD1 [Pabst et al., 2009].

Белок размером 42 кДа имеет 4 основных домена: цинковые пальцы, отвечающие за гомо- и гетеродимеризацию, ДНК-связывающий домен и два регуляторных и трансактивирующих домена TAD1 и TAD2. Белок представляет собой транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку различных типов клеток. *CEBPA* играет центральную роль на ранних этапах миелоидной дифференцировки. *CEBPA* вызывает снижение экспрессии С-МУС, что стимулирует дифференцировку клеток, повышает

экспрессию генов, специфичных для гранулоцитов, и действует совместно с другими генами (комплекса CBF и PU.1) при миелопоэзе. Помимо связывания ДНК СЕВРа действует, непосредственно взаимодействуя с другими белками. Основными партнерами выступают p21, CDK2, CDK4 и E2F. Репрессия E2F-зависимой транскрипции генов, активация транскрипции p21/WAF1, стабилизация p21 и ингибирование CDK2 и CDK4 приводят к остановке пролиферации и индукции дифференцировки.

Важная роль СЕВРа в гранулоцитарной дифференцировке указывает на этот ген как на ключевую мишень в лейкогенезе. Pabst T. et al. (2001) обнаружил, что утрата функции гена СЕВРа приводит к нарушению дифференцировки гранулоцитов и блокированию их преимущественно на ранних этапах развития (на стадиях M1 или M2 по FAB-классификации).

Описано три механизма инактивации СЕВРа:

1. Снижение экспрессии *СЕВРа*, вызванное *AML1-ETO* [Pabst T., et al., 2001]. В клеточной линии с *AML1-ETO* или в клетках пациентов с экспрессией *AML1-ETO* экспрессия *СЕВРа* отсутствует.

2. Ингибирование трансляции мРНК *СЕВРа* в результате взаимодействия с hnRNPE2, индуцированном BCR-ABL [Perrotti D. et al., 2002]. Этот механизм может быть вовлечен в переход от хронической фазы к бластному кризу при ХМЛ в результате блока миелоидной дифференцировки.

3. Инактивирующие мутации, обнаруженные при гематологических новообразованиях, в частности при ОМЛ [Nerlov C., 2004].

Мутации СЕВРа выявляются в 5–14% ОМЛ, в M1, M2, M4, M5 подтипах. При этом частота мутаций снижается по мере увеличения уровня дифференцировки бластных клеток. В M0, M3, M6, M7 мутации не определяются. Выход в ремиссию не связан с мутациями гена СЕВРа, тогда как безрецидивная и общая выживаемость выше в случае мутации гена.

Каким образом мутации СЕВРа участвуют в лейкозогенезе ОМЛ и влияют на прогноз — не совсем ясно. Выделяют две группы случаев с мутацией гена. Одна характеризуется повышенным содержанием короткой доминантно-негативной формы белка, что приводит к непрямой утрате функций гена СЕВРа. В другой группе определяются мутации, в т. ч. и биаллельные. Однако утрата функций происходит не полностью (например, не было описано биаллельных нуль-мутантов), а также частично компенсируется функционированием других членов белкового семейства, что приводит к неполной миелоидной дифференцировке бластных клеток.

Почему мутации гена ассоциированы с более благоприятным прогнозом — тоже не понятно. Но показано, что *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11* или *PML-RARα*, относящиеся к благоприятным прогностическим факторам, могут репрессировать экспрессию гена [Radomska et al., 2006; Thiede C. et al., 2007].

Таким образом, эти и ряд других описанных генов, как было показано недавно, характеризуются точечными мутациями, дупликациями, а сочетание

их с другими мутациями позволяет более точно стратифицировать пациентов и, тем самым, определить оптимальную терапию.

В настоящее время повышение эффективности терапии ОМЛ у детей обусловлено как разработкой новых стратегий лечения (препаратов, протоколов лечения, моноклональных антител, технологий пересадки стволовых кроветворных клеток), так и более углубленной характеристикой молекулярно-цитогенетических нарушений, характерных для биологии опухолевых клеток. Основная проблема в настоящее время состоит в более точной идентификации новых, прогностически значимых молекулярно-цитогенетических изменений и определении их прогностического значения для детей с ОМЛ. Выявление этих маркеров позволит проводить более точное разделение пациентов по группам риска и в соответствии с этим — адекватную терапию. Кроме того, идентификация молекулярно-генетических маркеров позволит отслеживать минимальную остаточную болезнь в процессе терапии ОМЛ у детей даже в тех случаях, когда стандартное цитогенетическое исследование не диагностировало хромосомных aberrаций. Выявление молекулярно-биологических маркеров в дальнейшем приведет к разработке терапии, направленной именно на эти молекулярные мишени, что позволит повысить прицельность терапии и снизить побочные эффекты. В конечном итоге расширение перечня молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток на этапах установления диагноза и на этапах лечения повысит эффективность проводимой терапии, качество жизни и снизит смертность при ОМЛ у детей.

Таким образом, для принятия оптимального терапевтического решения при лечении ОМЛ, стратификации пациентов по группам риска, прогнозирования возникновения рецидива необходимо оценивать наличие мутаций в ряде генов, включая гены рецепторных тирозинкиназ *FLT3* и *c-KIT*.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Для определения мутаций генов используется секвенирование ПЦР-амплифицированной области гена с прескринингом мутаций при помощи электрофореза в агарозном геле (в случае вставок или делеций из нескольких (десятков) нуклеотидов, как в случае *FLT3-ITD*), определения конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов продуктов ПЦР (при наличии точечных мутаций, например, в *c-KIT*).

Выделение мононуклеарных клеток (МНК)

Образец КМ (ПК) наслаивали на 0,5 объема Histopaque и центрифугировали при комнатной температуре в течение 25 мин при 1000 g. Слой МНК переносили в чистую пробирку и дважды отмывали в ФСБ (400 g, 10 мин, при +4 °C).

Выделение геномной ДНК

Выделение проводилось в соответствии с методикой Merante (Merante F., Raha S., Ling M., 1998). В 600 мкл буфера лизировали 3×10^6 клеток (10 mM

Трис-НСl рН 8,5, 5 мМ ЭДТА, 0,2% SDS, 0,2 М хлорида натрия, 0,1 мг/мл протеиназы К). После инкубации при 55 °С в течение 2 ч на термомиксере к лизату клеток добавляли равный объем фенола (рН 8,0) и перемешивали на вортексе. После 15-минутной инкубации на льду пробирку центрифугировали при 14000 g в течение 20 мин при +4 °С. После центрифугирования верхнюю фазу переносили в чистую пробирку. Добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1) и центрифугировали. Затем к образовавшейся верхней фазе добавляли равный объем хлороформа, смешанного с изоамиловым спиртом (24:1), и центрифугировали в том же режиме. К верхней фазе в чистой пробирке добавляли 500 мкл изопропанола. После осаждения преципитированной ДНК осадок отмывали с 1 мл 70% этанола, высушивали и растворяли в ТЕ буфере.

Качество и количество ДНК оценивали спектрофотометрически на спектрометре по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов — по соотношению 260/230 нм. Количественное определение концентрации ДНК проводилось аппаратом автоматически путем умножения на коэффициент 50 значения поглощения света при 260 нм. Образец суммарной ДНК считали чистым при значении показателей более 1,8.

Аmplификация фрагментов исследуемых генов, очистка и секвенирование продуктов ПЦР

Мутабельные участки генов *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1*, *CEBPa* были проамплифицированы в соответствии с отработанными и/или адаптированными методиками, проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР подвергались электрофорезу в ПААГ, специфические продукты, потенциально содержащие мутации, вырезались из геля и элюировались в ТЕ буфер или воду.

После очистки продукта проводилась реакция секвенирования с использованием BigDye Terminator 1.1 kit (Applied Biosystems, США) и 3,2 пмоль праймера для секвенирования. Продукт секвенирования очищался от невключенных нуклеотидов и подвергался капиллярному электрофорезу в генетическом анализаторе 3130 (Applied Biosystems, США). Биоинформационный анализ результатов электрофореза проводился с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США), BioEdit, баз данных NCBI и Ensembl.

В ходе выполнения работы подбирались праймеры для амплификации изучаемых участков генов, отработывались условия амплификации фрагментов генов, условия очистки ПЦР продуктов, проведения реакции секвенирования и капиллярного электрофореза.

Метод определения внутренней тандемной дупликации гена FLT3 (FLT3-ITD)

Для проведения ПЦР были подобраны пары праймеров, специфичные для участка гена, кодирующего подмембранную область FLT3-рецептора, где локализуется FLT3/ITD мутация: 11F: 5'-GCAATTTAGG-

TATGAAAGCCAGC-3', 12R: 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3' в концентрации 10 пмоль на одну реакцию [Chen W et al.].

В состав реакционной смеси, необходимой для исследования одного образца ДНК, входят следующие компоненты:

1. 5x буфер для полимеразы (100 мМ трис HCl, pH 8,3, 500 мМ KCl);
2. 25 мМ MgCl₂ в конечной концентрации 2 мМ;
3. 2,5 мМ dNTP в конечной концентрации 0,2 мМ;
4. Праймеры: 11F, 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3', 12R, 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3' в концентрации 10 пмоль на одну реакцию.
5. Деионизованная вода.

Исследование проводили с использованием термоциклера iQ iCycler Bio-Rad (США). В каждую пробирку с реакционной смесью добавили 2 мкл ДНК пациента и 1 мкл термостабильной Taq-полимеразы (1 ед.). 35 циклов амплификации (денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг при 56 °С — 1 мин, удлинение при 72 °С — 1 мин) проводили после 5-минутной инкубации при 94°С. После завершения ПЦР смесь оставляли в течение 7 мин при 72 °С. Десять мкл продуктов ПЦР смешивали с 2 мкл бромфенолового синего и вносили в лунки 3% агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Фотографию электрофореграммы обрабатывали в документирующей системе GelDoc 2000 (Bio-Rad, США).

При отсутствии мутации в подмембранном домене размер транскрипта составляет 329 пар оснований.

О наличии мутации свидетельствует появление дополнительной полосы, располагающейся вследствие большего молекулярного веса на более высоком уровне. Если пациент является гетерозиготным по двум аллелям, наблюдается разделение полосы на две части, одна из которых соответствует дикому типу FLT3-wt и имеет вес 329 пар оснований, другая — мутантному. Если пациент является гомозиготным, то разделения полосы не наблюдается, продукт ПЦР мигрирует в виде одной полосы выше 329 пар оснований. Размер продуктов амплификации определяли с помощью маркера молекулярного веса PCR Marker с использованием программы Quantity One 5.0.

Метод определения мутаций гена c-Kit

Амплификация и секвенирование нуклеотидных последовательностей 8, 11, 12 и 17 экзонов осуществляется с использованием праймеров KIT_8f: TGTTGCTGAGGTTTTCCAG, KIT_8r: GTCCTCCCTCTGCATT, KIT_11f: ATTTTTCCSTTTCTCCCA, KIT_11r: CCCAAAAGGTGACATGGA, KIT_12f: ACCAGCACCATCACCATT, KIT_12r: CAAACTGATGTC AAGCGCA, KIT_17f: AGTTTTCACTTTTACAAG, KIT_17r: ACCCAT TCTCTGCTTGACA.

Метод определения мутаций гена NPM1

Для амплификации 12 экзона с использованием геномной ДНК применялись праймеры, комплементарные к интронным последовательностям, фланкирующим исследуемый экзон (NPM1-F:

ТТААСТСТСТGGTGGTAGAATGAA3' и *NPM1-R*: СААГАСТАТ ТТGCCATTCСТААС3'). ПЦР-продукты были очищены стандартными методами и просеквенированы в обоих направлениях [Falini V. et al., 2005].

Метод определения мутаций гена *СЕВРА*

Мутации *СЕВРА* путем амплификации участков геномной ДНК и последующего секвенирования в соответствии с методикой Lin et al. (2005). Праймеры для амплификации и секвенирования представлены в табл.

Таблица

Последовательности праймеров для определения мутаций в гене *СЕВРА*

Название	Последовательность 5-3	Размер продукта
PP1S	TCGCCATGCCGGGAGAACTATAAC	550 bp
PP1AS	CTGGTAAGGGAAGAGGCCCGCCAG	
PP2S	CCGCTGGTGATCAAGCAGGA	680 bp
PP2AS	CACG GTCTGGGCAAGCCTCGAGAT	
PP3S	TCGCCATGCCGGGAGAACTCT	290 bp
PP3AS	ACGGCCGCCTTGGCCTTCTCCTGCT	
PP4S	CTTCAACGACGAGTTCCTGGCCGA	279 bp
PP4AS	AGCTGCTTGGCTTCATCCTCCT	
PP5S	CCGCTGGTGATCAAGCAGGA	371 bp
PP5AS	CCGGTACTCGTTGCTGTTCT	
PP6S	CCGCACCTGCAGTTCAGAT	538 bp
PP6AS	CACGGTCTGGGCAAGCCTCGAGAT	

ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем геномную ДНК, KCl (50 мМ/л), Tris-HCl (20 мМ/л, pH 8,4), MgCl₂ (2,5 мМ/л), 5% DMSO, 2 мМ/л праймеров, 0,1 мМ/л нуклеотидов, 0,5 Е Таq-полимеразы. Смесь была денатурирована при 94 °С в течение 1 мин. Отжиг проводился 40 с при 61 °С, и ПЦР-продукт достраивался в течение 90 с при 72 °С (35 циклов). ПЦР-продукты анализировались на 2% агарозном геле, очищались и секвенировались с помощью BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, США) на ABI-3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).