

Sindroamele mieloproliferative si gena JAK-2

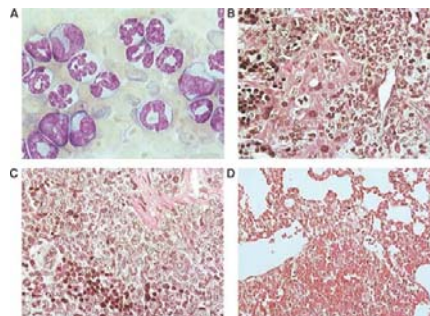
Mihalcea Razvan
student anul VI

Coordonatori: Conf.dr. Daniel Coriu
Asist.univ. Rodica Talmaci



Sindroamele mieloproliferative

- ▶ Policitemia vera
- ▶ Trombocitemia esentiala
- ▶ Metaplazia mieloida cu mielofibroza

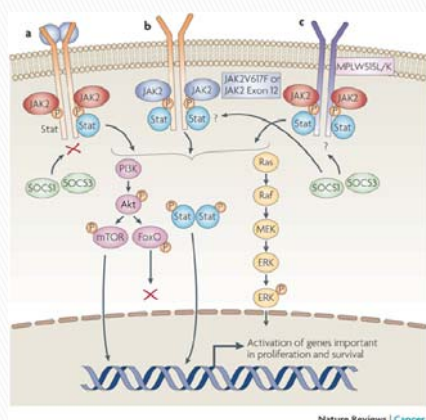


- ▶ Gena situată pe cromozomul 9 p24.
- ▶ Mutatia identificata in 2005 (Vainchenker et al. Paris)
- ▶ Mutatia este prezenta la 65–97 % din pacientii cu PV

	23–57 %	TE
35–57	%	MMM

traducerea semnalului primit de la citokine.

Jak-2 fosforileaza anumite proteine intracelulare incluzand si sistemul STAT (signal transducer and activation of transcription)



- ▶ Afectarea domeniului JH2, cu activitate reglatorie negativa este intrerupta, ducand la intreruperea activitatii auto-inhibitorii a proteinei Jak-2

Gena Jak-2



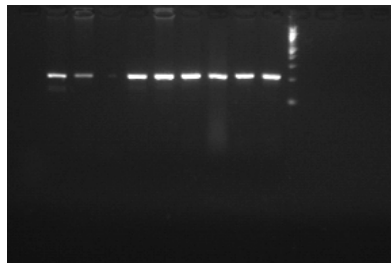
- ▶ In activitatea de cercetare ne concentram asupra identificării mutației v617f prezenta la cei mai multi pacienti cu sindroame mieloproliferative

- ▶ Mutatia v617f consta in inlocuirea unei singure baze azotate (guanina in loc de timina la pozitia 1849) care rezulta in codificarea valinei din lantul polipeptidic in locul fenil-alaninei
- ▶ Acest lucru duce la modificarea activitatii intregii proteine si impiedica activitatea de control, ducand in final la o proliferare necontrolata a unor linii celulare.

Materiale si metode

- ▶ Pentru identificarea acestei mutatii s-a izolat ADN din sangele pacientilor, pe kit-ul Qiagen, pe care l-am amplificat apoi prin diferite tehnici PCR.
- ▶ Am folosit metodele RFLP, ARMS si Real-time PCR

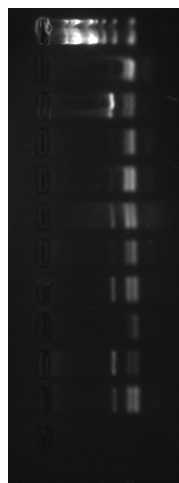
Imagine dupa amplificare PCR



RFLP

- ▶ Metoda calitativa–**Restriction fragment length polymorphism**–necesita amplificarea prealabila prin PCR, apoi verificarea prin electroforeza pe gel de agaroză 2%(arata prezenta fragmentului de amplificat sau din contra, lipsa lui, caz in care PCR-ul se reia).
- ▶ Urmata de o etapa finala in care fragmentul amplificat este supus “digestiei” enzimatice cu Bsa XI.
- ▶ Dezavantaje: timp crescut de lucru, etape intermediare, si incapacitatea metodei de a distinge intre statusul de hetero/homozigot pentru mutatie.

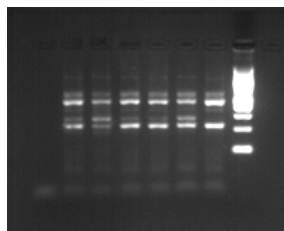
Imagine dupa restrictia enzimatica



ARMS

- ▶ Metoda calitativa, care foloseste un amestec de 4 primeri in aceeași reacție, care se leaga specific atât de mutație (in cazul in care este prezenta) dar și de gena normala.
- ▶ Prin construcția speciala a primerilor, asigura un timp mai scurt de lucru, precum și capacitatea de a distinge între statusul de hetero/homozigot.

Imagini după amplificarea ARMS



Real-time PCR

- ▶ Metoda cantitativa, ce ne ajuta sa aflam exact “cate” copii ale genei respective avem, atat normale cat si mutante.
- ▶ Utila atat pentru diagnostic, cat si pentru monitorizarea ulterioara a pacientilor cu sindroame mieloproliferative.

Ceea ce am enuntat mai devreme se poate urmări foarte simplu pe schema:

Extracție ADN (kit de extracție Qiagen)

ARMS-PCR---→electroforeza (gel agaroză 2%)

Real-time PCR→rezultate în timp real

Concluzii si discutii

- ▶ In urma activitatii desfasurate am pus la punct o metoda de identificare a acestei mutatii care sa poata fi aplicata in diagnosticarea corecta si cat mai exacta a sindroamelor mieloproliferative in Romania.