

IDENTIFICAZIONE DEI POLIMORFISMI del gene CALR

(Type 1, 52bp del e Type 2, 5 bp ins) in Real time PCR

AMPLI-set CALR

Cat. n. 1.009

Janus chinasi (JAK) è una famiglia di tirosina chinasi non-recettore che trasducono segnali mediati da citochine attraverso la via metabolica *JAK-Stat*. Questa famiglia di chinasi è stata chiamata "just another kinase - JAK" 1 & 2 ("solo un'altra chinasi" nell'inglese, dato che le JAK sono solo due fra un grande numero di chinasi scoperte in un esperimento basato con tecnica PCR). Hanno ricevuto, comunque, la denominazione "Janus chinasi". Il nome è preso dal Dio romano Janus, Dio delle porte, che aveva due facce, mentre le JAK hanno due domini quasi identici che trasferiscono fosfato. Uno di questi presenta l'attività di chinasi, mentre l'altro regola l'attività del primo. La via di segnalazione delle JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita. Le proteine Janus chinasi (JAKs) e le proteine trasduttrici del segnale ed attivatore della trascrizione (STATs), (*Signal transducers and activators of transcription, ossia trasduttori del segnale ed attivatori della trascrizione*) traducono il segnale generato dall'attività delle citochine e dei fattori di crescita a una risposta intracellulare, provocata dall'azione delle proteine STAT attivate, che, una volta nel nucleo cellulare, modificano l'espressione genica. Anche se le proteine STATs originalmente sono state scoperte come bersagli delle Janus chinasi, ora si sa che determinati stimoli possono attivarle indipendentemente dalle JAKs. La via svolge un ruolo centrale nelle decisioni principali riguardanti al destino delle cellule, regolando i loro processi di proliferazione, differenziazione e apoptosi. La via è particolarmente importante. Le mutazioni ricorrenti del gene *JAK2* (sia la mutazione puntiforme V617F nell'esone 14 che le mutazioni nell'esone 12) sono presenti in oltre il 97% dei pazienti con policitemia vera (PV); la mutazione JAK2V617F e mutazioni *MPL* (Proto-Oncogene, Thrombopoietin Receptor) (prevalentemente a carico del codone 515) si riscontrano in circa il 60-65% dei pazienti con trombocitemia essenziale (TE) e mielofibrosi primaria (PMF). A dicembre 2013 il gruppo di Tony Green e Robert Kralovics contemporaneamente hanno descritto nuove mutazioni nel gene **calreticulina (CALR)** (Klampfl T et al, 2013; Nangalia J et al, 2013). Queste mutazioni sono presenti in circa il 20% dei pazienti con ET e PMF e **sono espresse pressoché esclusivamente dai soggetti non mutati per JAK2 o MPL (per definizione, pertanto, le mutazioni di CALR risultano assenti nella PV)**. Il gene *CALR*, localizzato sul cromosoma 19, codifica per una proteina multifunzione (ha attività nota come chaperone molecolare; lega ioni calcio e ne regola l'accumulo a livello del reticolo endoplasmico; interviene nel controllo del corretto folding di proteine e glicoproteine) e con molteplici localizzazioni cellulari (si trova, oltre che nel reticolo endoplasmico, nel cytosol, sulla membrana citoplasmatica e a livello nucleare; quali siano le funzioni di calreticulina in questi compartimenti non è noto, sebbene quando la proteina risulta espressa sulla membrana cellulare può promuovere la fagocitosi della cellula). Le mutazioni di *CALR* sono eterogenee, ma il **Tipo 1 (una delezione di 52 bp)** e il **Tipo 2 (inserzione di 5bp)** da sole rappresentano circa l'80-85% dei casi; sono tutte localizzate nell'esone 9 del gene e comportano un frameshift che genera una proteina con una porzione C-terminale nuova, comune alle mutazioni note fino ad oggi. Il cambiamento di sequenza della porzione C-terminale della proteina potrebbe, in linea di principio, alterarne la stabilità, le funzioni intracellulare; allo stato attuale, su nessuno di questi aspetti sono disponibili informazioni sperimentali definitive. Evidenze iniziali indicano però che l'espressione di calreticulina mutata in linee cellulari può indurre ipersensibilità, e indipendenza proliferativa da citochine emopoietiche attivando la via di segnalazione JAK/STAT, come suggerito dal riscontro di aumentati livelli di STAT5 fosforilato e dall'effetto antiproliferativo esercitato *in vitro* da fedratinib, un inibitore di JAK2. La stretta associazione delle mutazioni di *CALR* con la trombocitemia essenziale e la mielofibrosi giustifica l'inclusione di questa variabile molecolare come criterio diagnostico maggiore nella revisione della classificazione della WHO (Tefferi A et al, 2014).

Principio del metodo:) estrazione del DNA genomico B) amplificazione e rivelazione mediante l'utilizzo dell'apparecchio Real-Time PCR

Applicabilità: Su DNA genomico estratto e purificato da campioni di Sangue Intero.

Numero di Test: 25.

CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

AMPLIFICAZIONE E RIVELAZIONE

PCR mix 5X	-20°C
Primers -Probe mix 20X CALR TYPE 1	-20°C
Primers -Probe mix 20X CALR TYPE2	-20°C
H ₂ O sterile	-20°C
Controllo eterozigote	-20°C

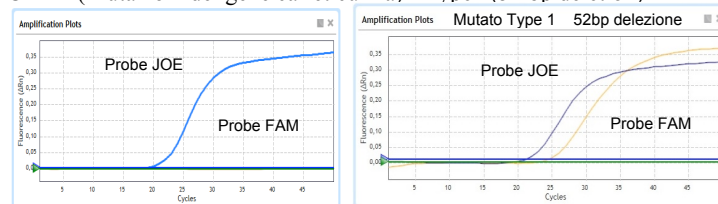
Stabilità: superiore a 12 mesi se correttamente conservato.

Bibliografia:

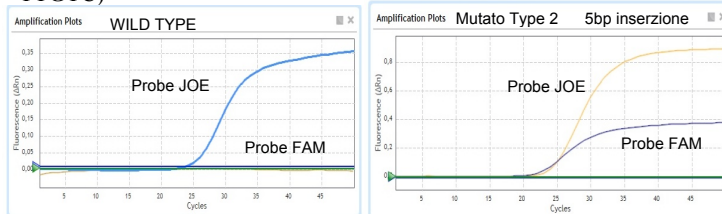
Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al New England Journal of Medicine 2013;369:2379-90.
Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. New England Journal of Medicine 2013;369:2391-405.
Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. Leukemia 2014 Jan 20.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

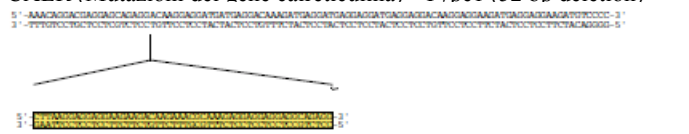
CALR (Mutazioni del gene calreticulina) - Type1 (52 bp deletion)



CALR (Mutazioni del gene calreticulina) - Type 2 (5bp insertion TTGTC)



CALR (Mutazioni del gene calreticulina) - Type1 (52 bp deletion)



CALR (Mutazioni del gene calreticulina) - Type 2 (5bp insertion TTGTC)

