

BASI SCIENTIFICHE

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", 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, che aveva due facce, analogamente alle JAK che 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.

SIGNIFICATO CLINICO

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); le mutazioni *JAK2V617F* e *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). Nel 2013 sono state descritte nuove mutazioni nel gene **calreticulina (CALR)**. 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, la funzione 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.

INFORMAZIONI E PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

Il kit permette l'identificazione dei due più comuni polimorfismi del gene calreticulina (CALR): Type 1 (delezione 52 Bp) e Type 2 (inserzione di 5 bpTTGTC). La ricerca di tali polimorfismi del gene CALR viene eseguita previa amplificazione con primers specifici ed ibridazione con un probe che riconosce una sequenza interna. Il probe è marcato con due fluorofori diversi (reporter dye e quencher dye). Durante la reazione di amplificazione, il rilascio del quencher dal probe provoca un incremento della fluorescenza causata dal reporter che è, quindi, direttamente proporzionale al quantitativo di prodotto amplificato riconosciuto (real-time quantitative PCR). Nel kit utilizzato per la rivelazione dei polimorfismi Type 1 e Type 2 il probe che riconosce la sequenza mutata è coniugato al reporter FAM. Il probe che riconosce il controllo interno è coniugato al reporter VIC/JOE.

CARATTERISTICHE TECNICHE

- **Principio del metodo:** A) Estrazione del DNA genomico
B) Amplificazione e Rivelazione con un sistema di Real-Time PCR.
- **Applicabilità:** su DNA genomico estratto e purificato da campioni di sangue intero, tamponi buccali, tessuto paraffinato e liquidi biologici.
- **Numero di test:** 25.
- **Stabilità:** fino alla data di scadenza indicata sul prodotto.
- **Specificità Analitica:** Assenza di appaiamenti aspecifici di oligonucleotidi e sonde; Assenza di cross-reattività.
- **Sensibilità Analitica:**
LOD: $\geq 0,025$ ng di DNA < 1%
LOB: 0% NCN.
- **Riproducibilità:** 99,9%.
- **Specificità e Sensibilità Diagnostica** 100%/98%



UNI EN ISO 9001
UNI CEI EN ISO 13485

Il kit IVD è marcato CE.
Conforme alla direttiva 98/79.