



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

**MUTAZIONI DELLA CALRETICULINA NELLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE:
MUTAZIONE FRAMESHIFT DELL'ESONE 9 DEL GENE CALR IN PAZIENTI CON
TROMBOCITOSI**

**CALRETICULIN MUTATIONS IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIES:
FRAMESHIFT MUTATION OF CALR EXON 9 IN PATIENTS WITH THROMBOCYTOSIS**

Tesi di Laurea di
SCHIAVONI NEETA

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
BARUCCA MARCO

Sessione di Laurea straordinaria supplementare: Maggio 2021

Anno Accademico 2019/2020

Sommario

Lo studio svolto si focalizza sull'analisi genetica dei geni, le cui mutazioni possono portare ad una specifica *neoplasia mieloproliferativa*.

Si prenderà in considerazione nello specifico il gene **CARL** (della calreticulina) e solo le sue mutazioni più significative.

Si prenderà quindi in considerazione la *patologia*, il *gene* e la *mutazione* che la causa, si esamineranno lo studio e le metodiche utilizzate per evidenziare tale mutazione.

Per effettuare lo studio, viene eseguito il *sequenziamento* dell'intero *esoma* in diversi pazienti.

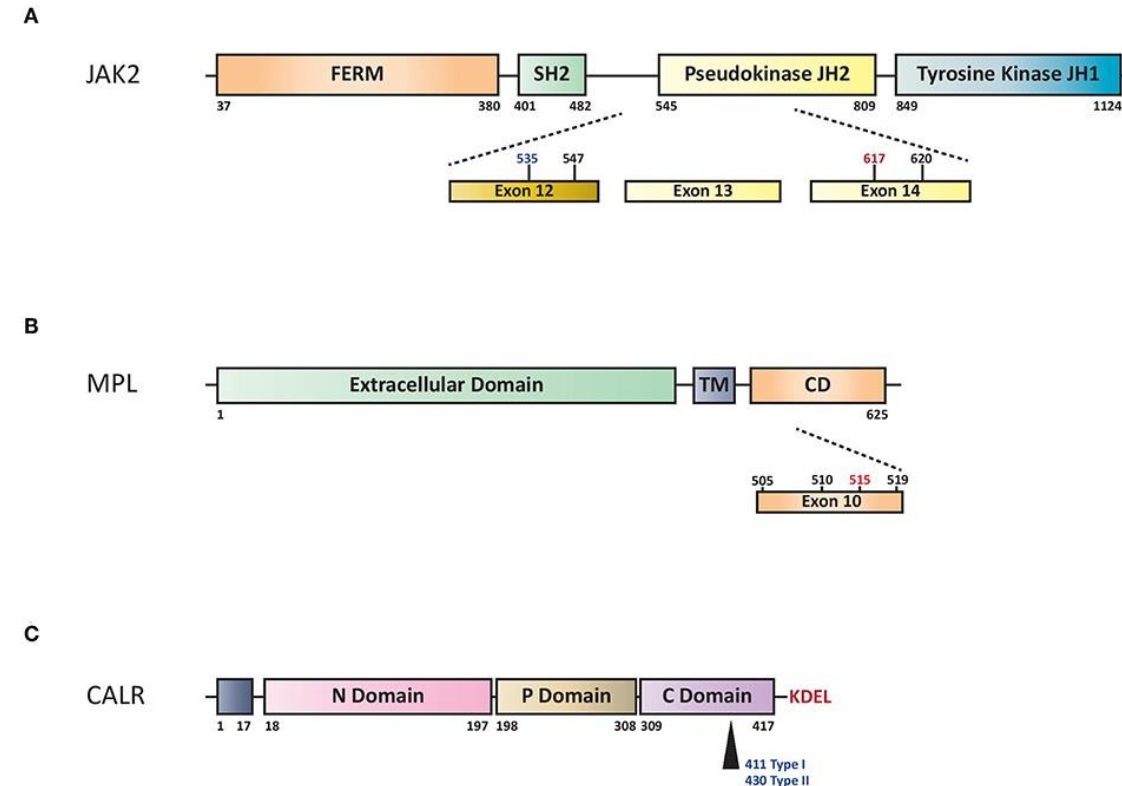
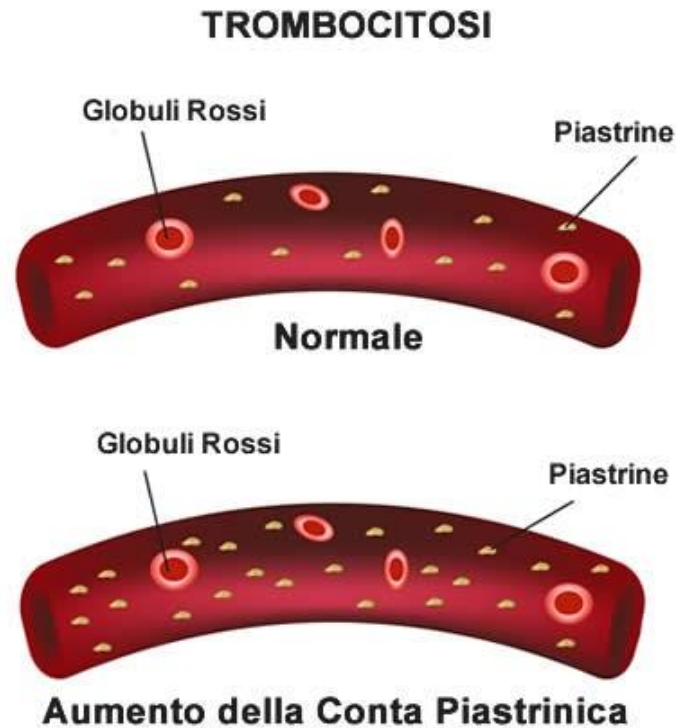
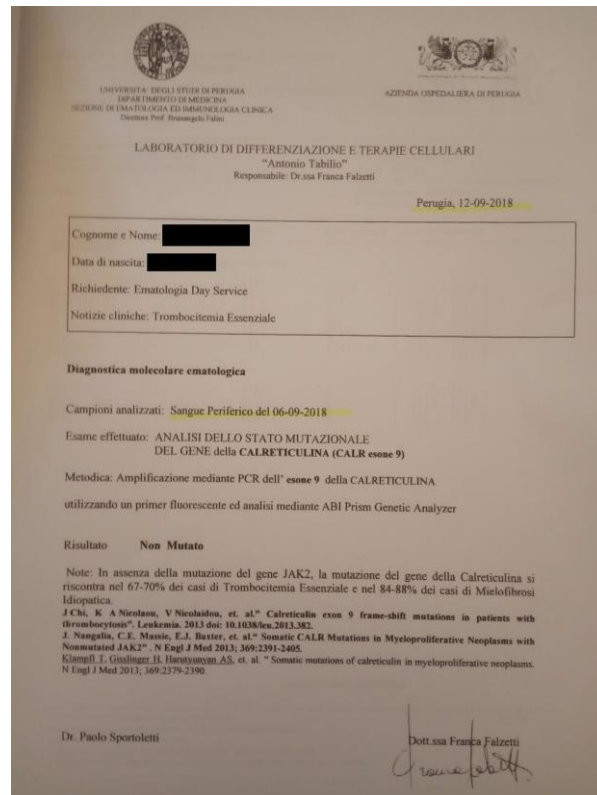
Grazie a questo studio si possono aprire nuove prospettive per la cura e la trattazione di questo tipo di malattie mieloproliferative, poiché nella maggior parte dei casi, la mutazione principe è a carico del gene JAK2, ma in alcuni pazienti non è presente questo marcatore. Tutto questo rende più difficile la diagnosi e la terapia, per questo in un secondo momento, si è verificato se nelle cellule di questi pazienti fosse mutato anche un secondo gene, **CARL**, riscontrandolo mutato nella maggior parte dei pazienti affetti da trombocitemia essenziale e mielofibrosi, senza riscontrare anomalie in JAK2 (gene tipicamente alterato in questo tipo di patologie, come riportato sopra).

Neoplasie mieloproliferative:

- Leucemia mieloide cronica (LMC)
- Policitemia vera (PV)
- Mielofibrosi primitiva (MP)
- **Trombocitemia essenziale (TE)**

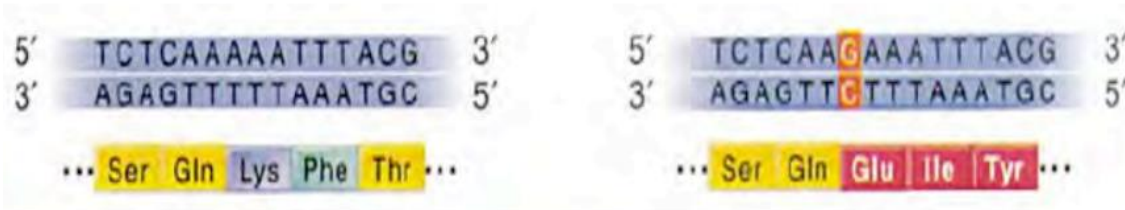
Causate dalla combinazioni di mutazioni di molti geni, tra cui:

- JAK2
- MPL
- **CALR**



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00321/full>

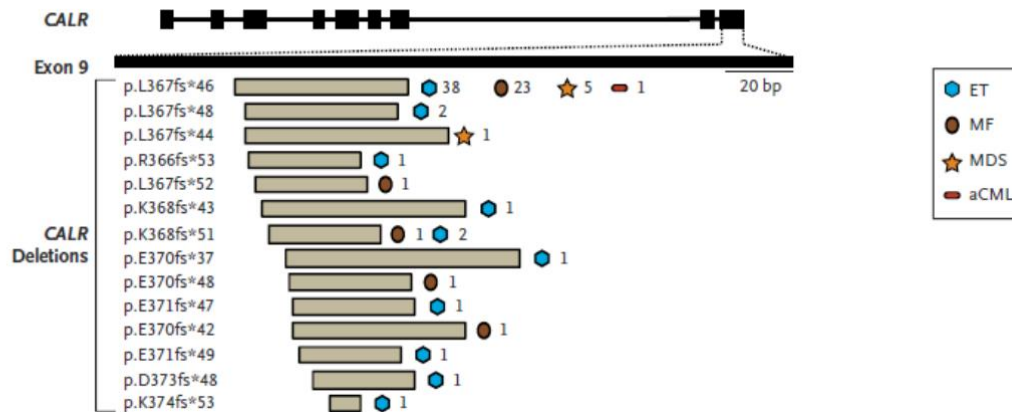
Di che cosa si tratta?



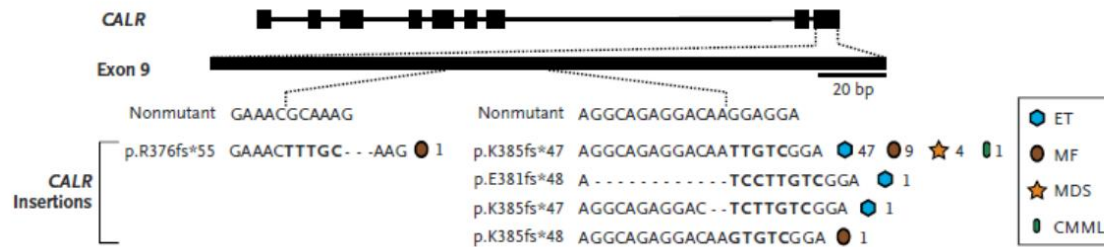
<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/664022>

La *mutazione* è il processo che altera la sequenza di coppie di basi in una molecola di DNA.
 Mutazione *frameshift* (o *scivolamento della cornice di lettura*): mutazione causata da indel di un numero di nucleotidi in una sequenza di DNA che non è divisibile per tre.

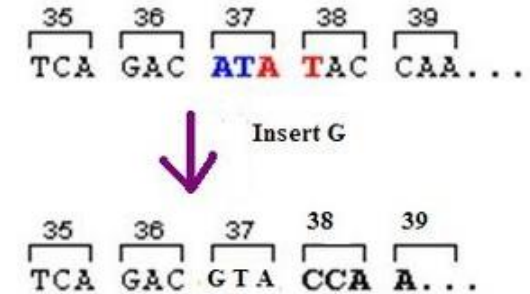
C Genomic Location of CALR Deletions



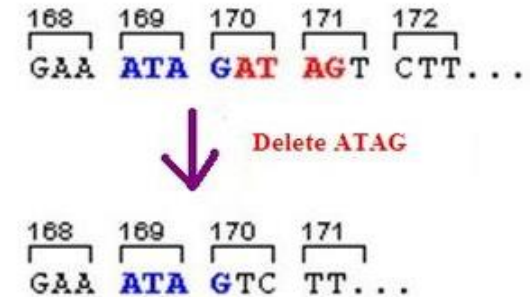
D Genomic Location of CALR Insertions



B



D



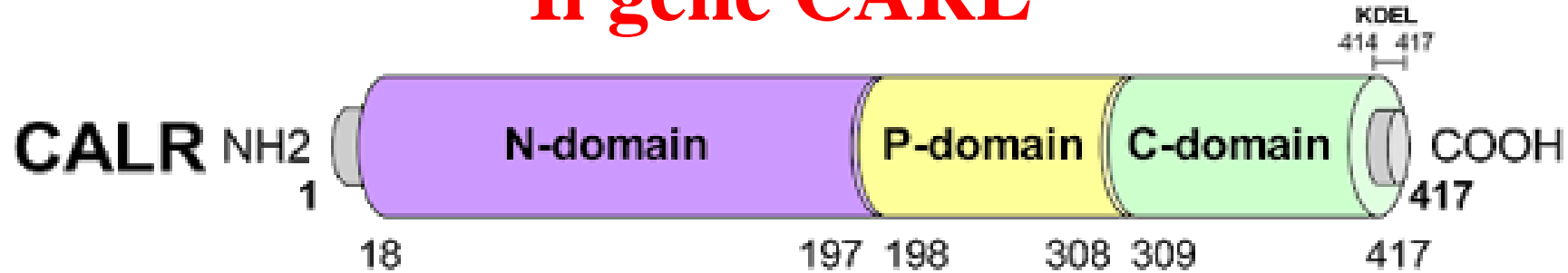
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Frameshift_mutation.jpg

Esempio di INDEL del gene CARL.

Il pannello C mostra la posizione genomica delle *delezioni* CALR. I numeri indicano il numero di pazienti con ciascuna malattia.

Il pannello D mostra la posizione genomica delle *inserzioni* CALR (mostrata in rosso).

Il gene CALR



http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CALR.html

Struttura e funzione

Il gene possiede **tre domini** con differenti proprietà strutturali e funzionali.

Il dominio globulare N (terminale), un dominio P (ricco in prolina) e un dominio C (anch'esso terminale) acido. Come evidenziato in figura, la regione C-terminale contiene una sequenza *KDEL* capace di sequenziare più siti con *elevata capacità di legare Ca* e siti per il legame alla superficie cellulare e alla coagulazione dei fattori del sangue.

Tipologie di mutazioni

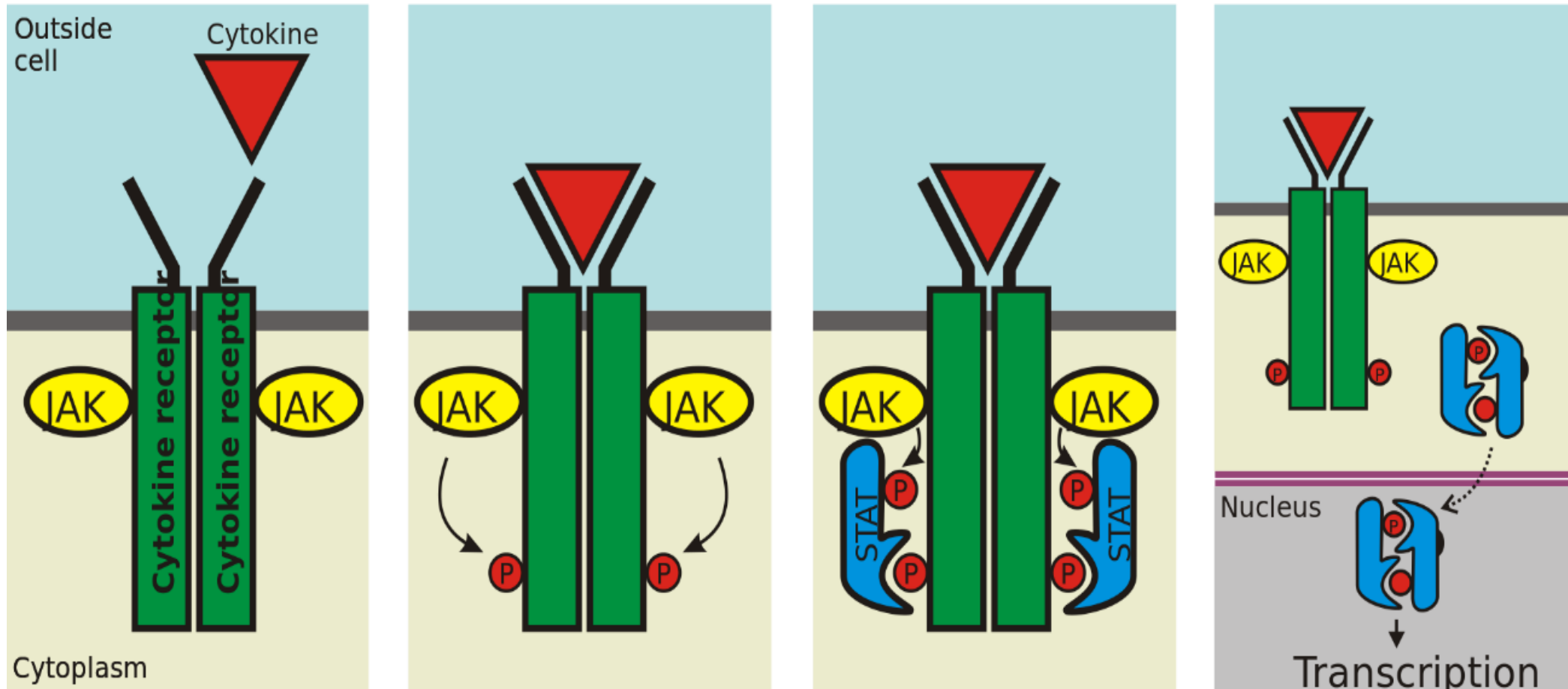
Le mutazioni a carico di CALR sono inserzioni o delezioni dell'esone 9.

Le *due* principali mutazioni sono presenti nell'85% dei casi.

La **Mutazione di tipo 1** che consiste in delezioni di 52 basi dell'esone 9 e la **Mutazione di tipo 2** che consiste in inserzioni di 5 basi dell'esone 9.

Conseguenze nella mutazione del gene CALR

Le forme mutate di CALR ne pregiudicano la capacità di legare il Calcio e di rimanere all'interno del RE e promuovono l'interazione con il recettore della trombopoietina, *attivando la via JAK-STAT* e favorendo la proliferazione megacariocitaria tipica della TE.



https://it.wikipedia.org/wiki/Janus_chinasi#/media/File:Jakstat_pathway.svg

Meccanismo molecolare

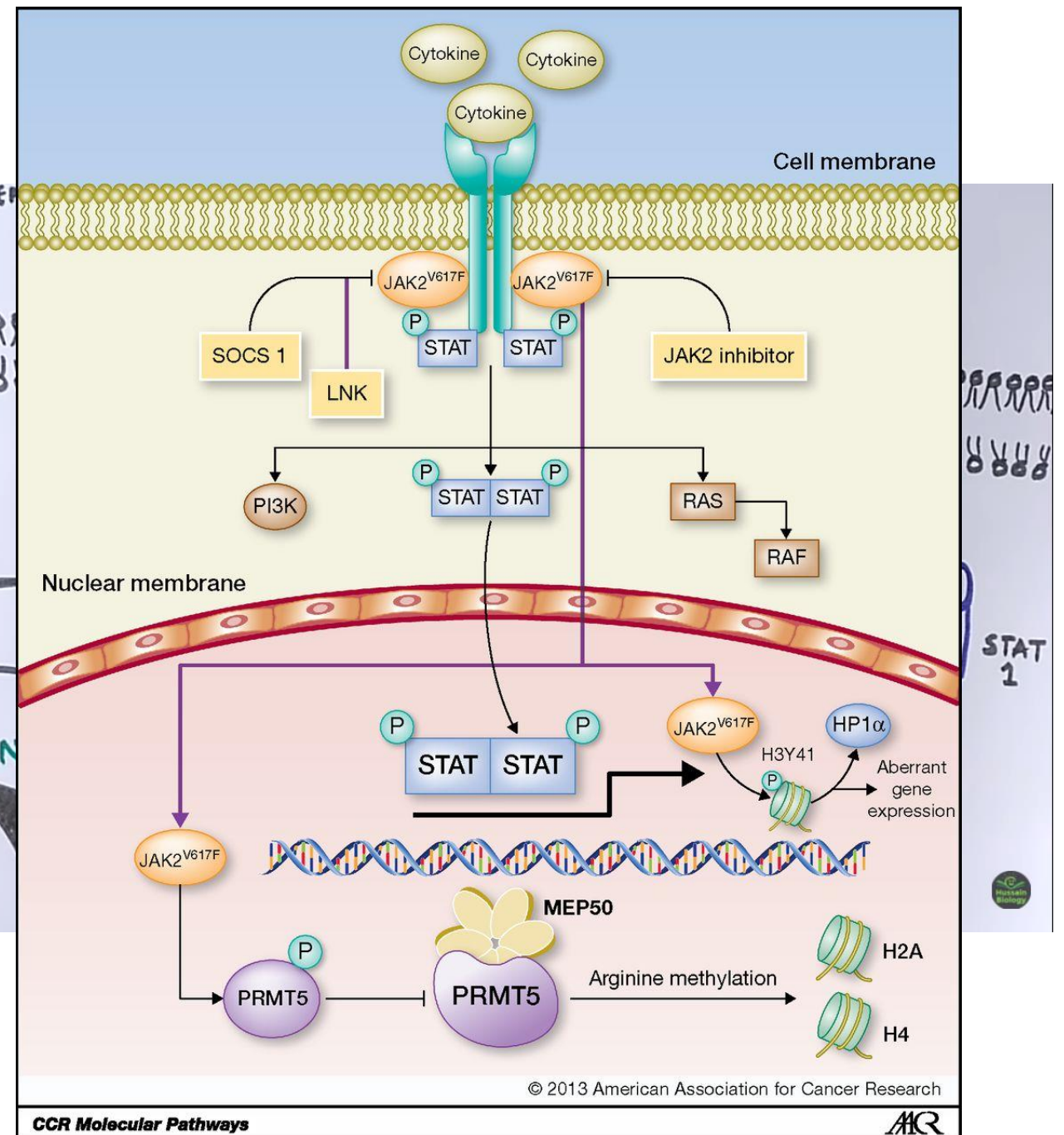
Il ligando si lega a due recettori, che si accoppiano, formando un dimero.

La formazione di dimeri del recettore attiva la proteina Janus chinasi (**JAK**), che ha una funzione di tirosina chinasi, ossia, è in grado di fosforilare residui di tirosina di altre proteine.

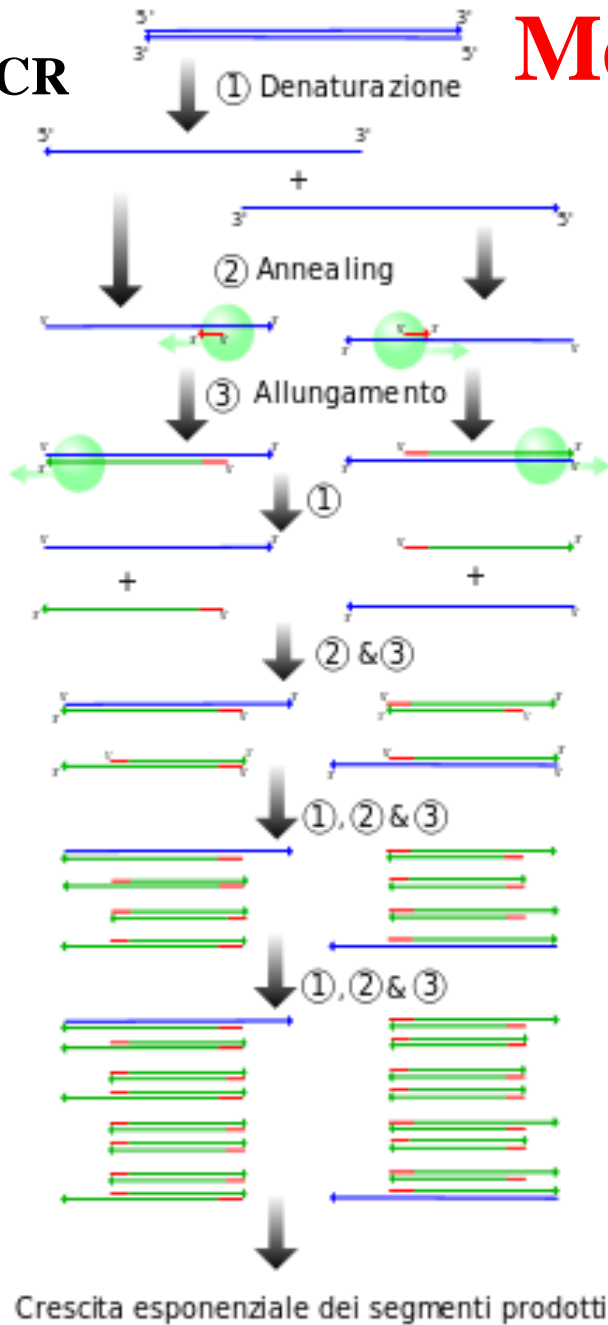
Le proteine JAK, quindi, fosforilano alcuni residui di tirosina di recettori dimerizzati, creando in questi residui siti di interazione per proteine capaci di legarsi a residui di fosfotirosina.

Le proteine **STAT**, avendo questa capacità, si legano ai recettori fosforilati, dopodiché sono fosforilate anch'esse dalle proteine JAK.

La fosforilazione delle proteine STAT promuove la loro dimerizzazione e i dimeri formati da due molecole di STAT fosforilate sono in grado di agire nel nucleo cellulare, dove regolano l'espressione genica, generando l'effetto biologico finale.

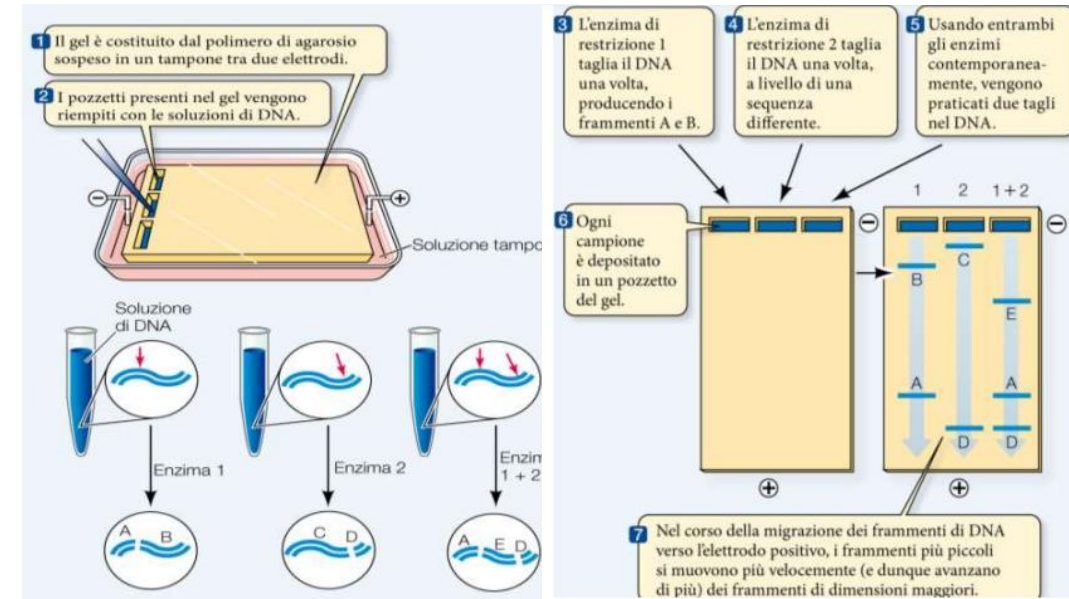


PCR



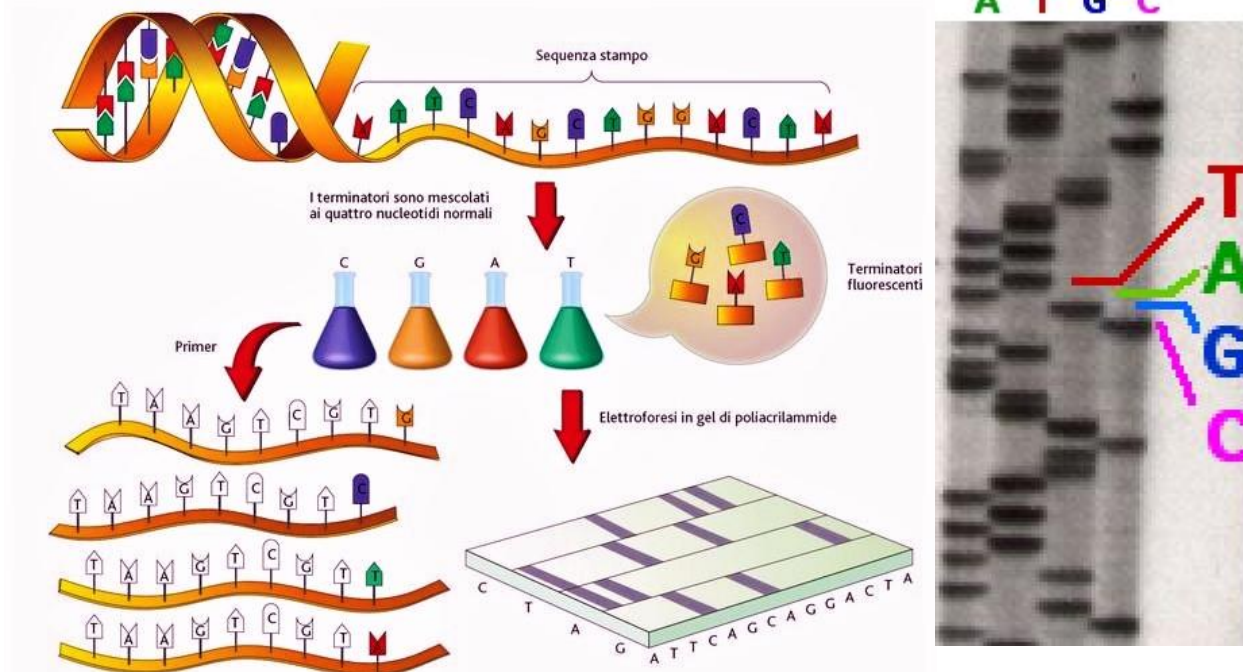
Metodiche utilizzate

ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO



https://dna507.files.wordpress.com/2017/05/biotecnologie_utile-per-prove-del-dna.pdf

SEQUENZIAMENTO

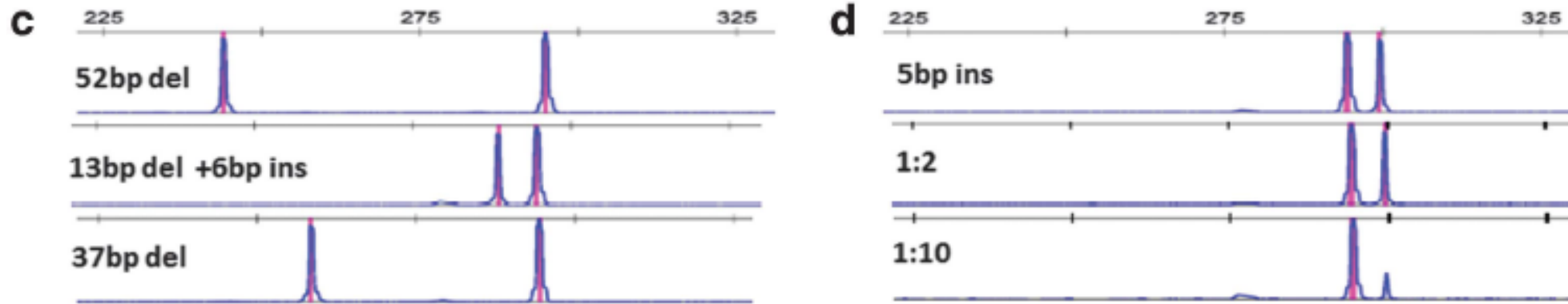


<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/frederick-sanger/>

https://it.wikipedia.org/wiki/Sequenziamento_del_DNA

Risultati

Primo studio: Mutazioni frameshift dell'esone 9 del gene CARL in pazienti con trombosi



(c) Risultati dell'analisi dei frammenti PCR di CALR esone 9 in tre pazienti con diverse mutazioni di indel.

(d) Esempio di analisi di frammenti da un paziente con un inserimento di 5 bp diluito.

Il normale DNA di controllo mostra che la mutazione è facilmente rilevabile dopo una diluizione 1:10.

Per determinare la sensibilità di analisi di PCR, viene dimostrato che il metodo per il rilevamento della mutazione, sebbene semplice e facile da eseguire ha la capacità di coprire l'ampia gamma di mutazioni dell'esone 9 CALR ed è abbastanza sensibile da rilevare bassi carichi di mutazione, anche dopo aver eseguito delle diluizioni.

Risultati

Secondo studio: Mutazioni CALR somatiche nelle NMP con JAK2 non mutato

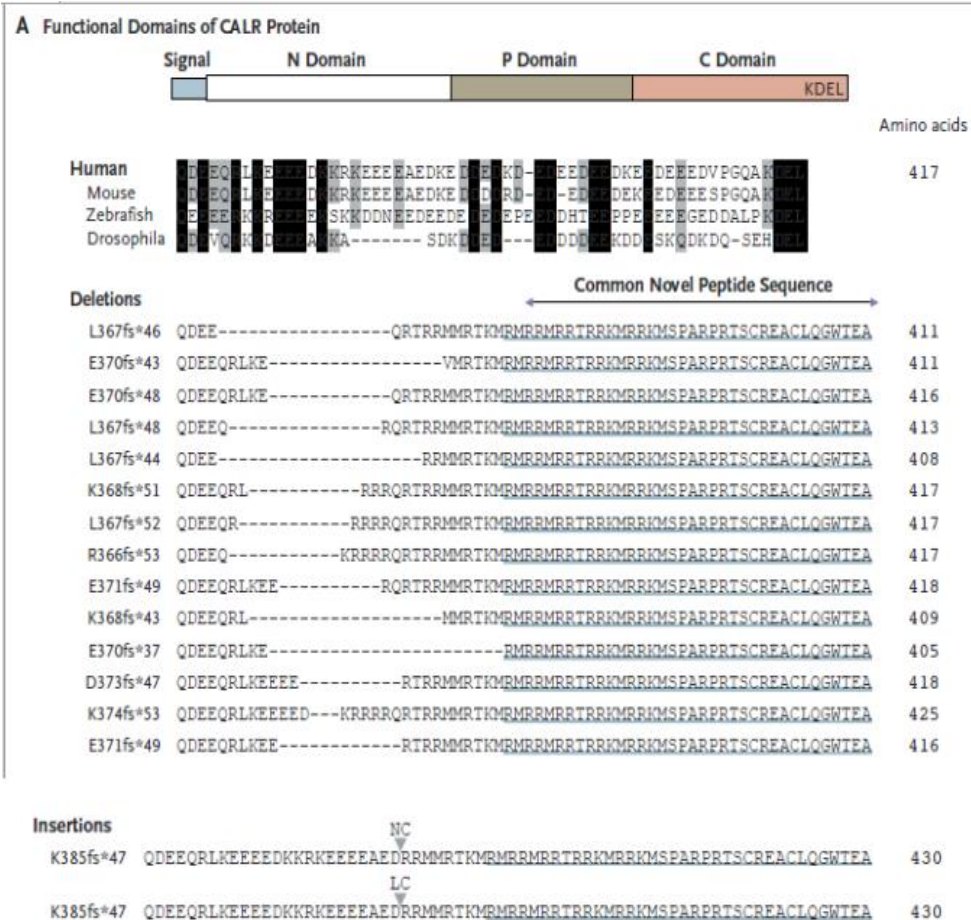
La sequenza amminoacidica *KDEL* [Lys-Asp-Glu-Leu] è presente su alcune proteine residenti nel reticolo endoplasmatico e consente il recupero di queste proteine dall'apparato del Golgi al reticolo endoplasmatico.

Questa perdita di funzione aumenta la possibilità di ritenzione compromessa o recupero nel reticolo endoplasmatico.

Tutte le mutazioni CALR spostano il frame di lettura di una coppia di basi.

Il *pannello A* mostra i domini funzionali della proteina CALR, con (da sinistra a destra) sequenza di segnali, dominio N (N-terminale), dominio P (ricco di prolina), dominio C (C-terminale) e *KDEL* (ritenzione del reticolo endoplasmatico segnale). La conservazione della porzione interessata del dominio C tra le specie è rappresentato dall'ombreggiatura, con il nero che indica le regioni conservate e il grigio che indica regioni parzialmente conservate.

Viene mostrata tutta la gamma di mutazioni frameshift da inserzione e delezione nell'esone 9 CALR, tutti risultati hanno in comune una coppia di basi +1 che comporta un frame di lettura alterato e prevede un nuovo C-terminale sequenza peptidica priva del motivo KDEL.

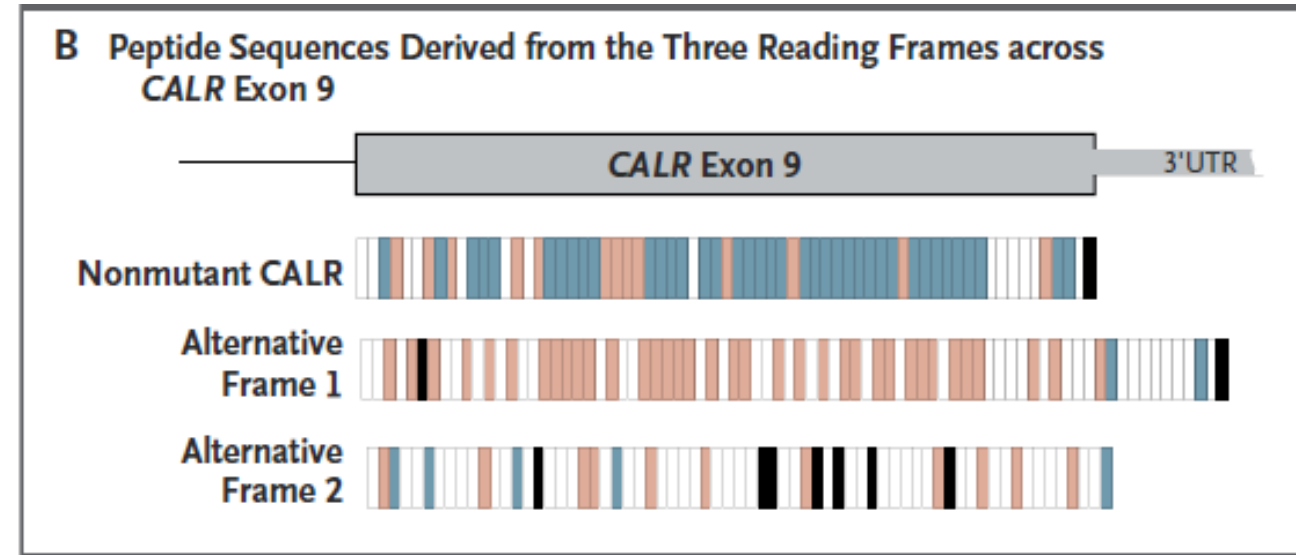


Conclusioni

Il normale dominio CALR C-terminale è altamente acido (Figura B) e contiene più siti di legame del calcio insieme a una sequenza di recupero (KDEL) tipica delle proteine residenti nel reticolo endoplasmatico. Al contrario, il nuovo dominio C-terminale previsto del mutante CALR, *manca di più siti di legame del calcio e non ha sequenza KDEL*.

I nostri dati indicano che il mutante CALR probabilmente **ha acquisito nuove funzionalità all'interno o all'esterno del reticolo endoplasmatico**.

Il rilevamento delle mutazioni CALR nel sangue periferico potrebbe essere potenzialmente utilizzato come strumento diagnostico nello stesso modo in cui i test per le mutazioni JAK2 hanno semplificato e migliorato l'accuratezza della diagnosi dei pazienti con neoplasie mieloproliferative in tutto il mondo.



Il pannello B è una rappresentazione schematica dei tre peptidi alternativi sequenze derivate dai tre frame di lettura attraverso esone 9 di CALR. Ogni barra rappresenta un aminoacido: le barre blu indicano aminoacidi carichi negativamente, rosse barre di aminoacidi carichi positivamente e barre nere si fermano codoni

Queste alterazioni provocano la perdita della maggior parte del dominio acido C-terminale e del segnale KDEL

Bibliografia

1. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2

J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D.G. Kent, A. Aziz, A.L. Godfrey, et al. This article was published on December 10, 2013, at NEJM.org. N Engl J Med 2013;369:2391-405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542 *Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society.*

2. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms

Thorsten Klampfl, Ph.D., Heinz Gisslinger, M.D., Ashot S. Harutyunyan, M.D., Ph.D., Harini Nivarthi, Ph.D., Elisa Rumi, M.D., Jelena D. Milosevic, M.Sc., Nicole C.C. Them, M.Sc., Tiina Berg, B.Sc., Bettina Gisslinger, M.Sc., Daniela Pietra, Ph.D., Doris Chen, Ph.D., Gregory I. Vladimer, Ph.D., et al. This article was published on December 10, 2013, at NEJM.org. N Engl J Med 2013;369:2379-90. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347 *Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society.*

3. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis

Leukemia (2014) 1129 – 1174 & 2014 Macmillan Publishers Limited

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Neeta Schiavoni