

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO in Patologia ed Ematologia Clinica, Sperimentale e
Computazionale - Ciclo XXV**

DIPARTIMENTO DI BIO-MEDICINA CLINICA E MOLECOLARE

**Meccanismi strutturali che regolano l'efficacia
degli Inibitori delle Tirosin-Chinasi
sull'attività catalitica di BCR-ABL**

CHIARA ROMANO

Tesi di Dottorato

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Alfredo Ferro

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Livia Manzella

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

SOMMARIO

<u>INTRODUZIONE.....</u>	<u>3</u>
<u>Leucemia.....</u>	<u>3</u>
<u>La Leucemia Mieloide Cronica.....</u>	<u>4</u>
<u>ABL e il suo dominio tirosin-chinasico.....</u>	<u>8</u>
<u>Trattamento farmacologico e sviluppo di resistenze in pazienti di LMC.....</u>	<u>11</u>
<u>Interazioni fra TKIs e dominio catalitico di BCR-ABL.....</u>	<u>14</u>
<u>SCOPO ED IPOTESI DEL LAVORO.....</u>	<u>17</u>
<u>MATERIALI E METODI.....</u>	<u>18</u>
<u>Mutagenesi.....</u>	<u>18</u>
<u>Colture cellulari.....</u>	<u>23</u>
<u>Trasfezioni transienti e trasduzioni lentivirali.....</u>	<u>24</u>
<u>Saggi di proliferazione cellulare e trattamento farmacologico.....</u>	<u>25</u>
<u>Immunoblotting.....</u>	<u>26</u>
<u>Preparazione delle strutture e simulazioni di dinamica molecolare.....</u>	<u>27</u>
<u>Allineamento multiplo delle tirosin-chinasi umane.....</u>	<u>29</u>
<u>RISULTATI.....</u>	<u>30</u>
<u>La mutazione puntiforme I360T conferisce attività catalitica e capacità trasformante a BCR-ABL, ma non ad ABL.....</u>	<u>30</u>
<u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</u>	<u>50</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>55</u>

INTRODUZIONE

Leucemia.

La parola “Leucemia” deriva dal greco *leukos* (bianco) e *aima* (sangue), e letteralmente significa sangue bianco. Il termine indica una serie di neoplasie derivanti dalla proliferazione incontrollata ed anomala di una singola cellula staminale del sistema ematopoietico.

I progenitori delle cellule del sangue risiedono a livello del midollo osseo ed hanno origine da una cellula staminale ematopoietica. Essi possono essere classificati in due sottotipi, i progenitori della linea mieloide ed i progenitori della linea linfoide. Dal progenitore mieloide hanno origine gli eritrociti, i megacariociti (da cui si generano le piastrine) ed i mieloblasti, che a loro volta possono differenziare in granulociti e monociti. Dal progenitore linfoide si generano, invece, i linfociti B ed i linfociti T (Figura 1).

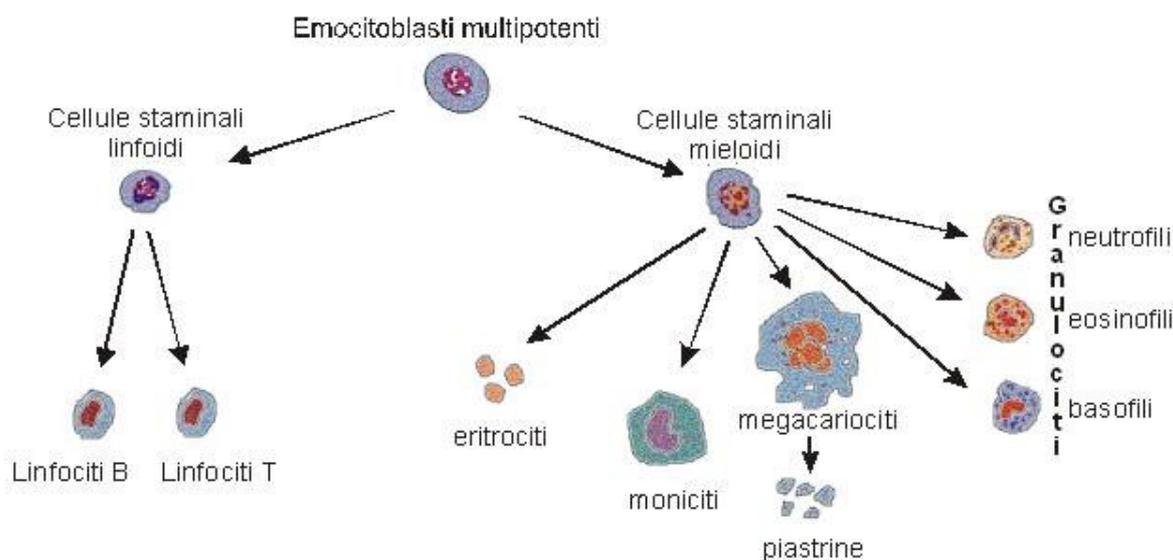


Figura 1: Emopoiesi e differenziamento delle cellule del sangue.

In base al tipo di cellula coinvolta nella trasformazione neoplastica, le leucemie possono essere distinte in due gruppi: leucemie mieloidi, derivanti da un progenitore della linea mieloide, e leucemie linfoide, derivanti da un progenitore della linea linfoide.

Sulla base del decorso della malattia, le leucemie possono essere ulteriormente suddivise in leucemie acute o croniche. Si parla di leucemia (mieloide o linfoide) acuta quando la cellula trasformante da cui si origina la patologia è ancora poco differenziata o immatura, possiede una elevata capacità proliferativa e quindi anche il decorso clinico della malattia è più rapido ed aggressivo. Nel caso della leucemia cronica, invece, la cellula tumorale è ben differenziata e possiede maggiori caratteristiche simili alla sua controparte normale, quindi anche il decorso clinico è più lento ma può diventare, col tempo, più aggressivo ed invasivo.

La Leucemia Mieloide Cronica.

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una neoplasia del sangue derivante dalla trasformazione neoplastica di cellule progenitrici della linea mieloide, ed in particolare della linea cellulare che porta alla formazione dei granulociti. Dal punto di vista ematologico, questa patologia è caratterizzata da un aumento del numero dei granulociti nel sangue periferico, nel midollo, nella milza e in altri organi o tessuti. Nel sangue compaiono inoltre cellule immature della serie mieloide, note come blasti.

Il decorso della LMC procede, generalmente, attraverso tre fasi distinte: una fase cronica, con cui solitamente ha inizio la patologia, una breve fase accelerata, ed una fase acuta o blastica finale.

1) La fase cronica, che può durare da 3 a 6 anni, è caratterizzata da un aumento del numero dei granulociti nel sangue periferico. Questa prima fase della patologia può essere asintomatica, oppure i pazienti possono presentare disturbi lievi quali febbre, astenia e dolori addominali dovuti a splenomegalia.

2) La fase accelerata subentra in seguito ad un aumento del numero dei blasti nel sangue periferico (maggiore del 15%), ed è caratterizzata da un netto peggioramento dei parametri clinici ed ematologici del paziente.

3) Nella fase blastica (o crisi blastica) il numero dei blasti in circolo supera il 30%, e la malattia non è più distinguibile da una leucemia acuta. In questa fase la probabilità di sopravvivenza del paziente è, purtroppo, molto bassa.

La LMC è correlata ad una precisa alterazione genetica, ovvero la traslocazione reciproca fra il cromosoma 9 ed il cromosoma 22, t(9,22), che porta alla formazione del cromosoma Philadelphia (Figura 2). A livello citogenetico questa traslocazione porta alla fusione, sul cromosoma Philadelphia, di due geni: il gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 22, ed il gene *ABL* (*Abelson*), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 9 (Figura 2). L'oncogene di

fusione che ne deriva codifica per l'oncoproteina chimerica BCR-ABL, marcatore molecolare della patologia.

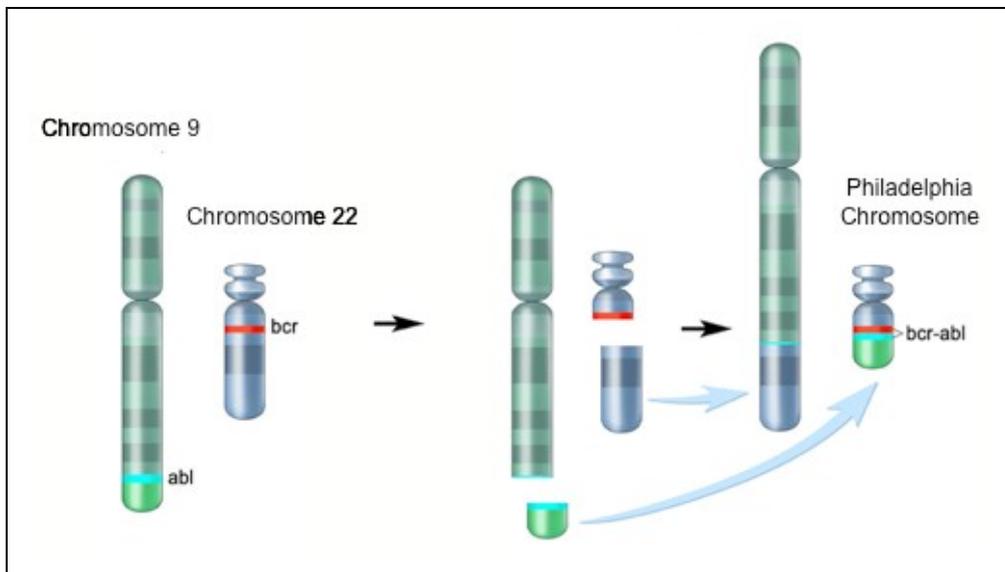


Figura 2: Traslocazione cromosomica t(9,22) nella leucemia mieloide cronica. La traslocazione fra il braccio lungo del cromosoma 9 e quello del cromosoma 22 porta alla fusione dei geni *BCR* ed *ABL* e alla formazione del cromosoma Philadelphia.

Il punto di rottura sul gene *ABL*, costituito da 12 esoni, avviene sempre a monte del secondo esone (a2). La rottura sul gene *BCR*, costituito da 23 esoni, può invece verificarsi in diversi punti. Nel 90% dei casi di LMC, il punto di rottura è localizzato a monte degli esoni 13 (e13) o 14 (e14), generando due possibili varianti del trascritto di *BCR-ABL*, e13-a2 ed e14-a2, entrambe codificanti per una proteina con peso molecolare di 210 kDalton (kDa) (Figura 3). Nel caso in cui la rottura avviene a valle dell'esone 1 (e1), si genera la variante e1-a2, che codifica per un'oncoproteina di 190 kDa caratteristica di circa il 10% dei casi di Leucemia Linfoblastica Acuta. Se la rottura avviene, invece, sull'esone 19 (e19), si forma la variante e19-a2, codificante per una

proteina di 230 kDa che è stata associata alla LMC a granulociti Neutrofili (LMC-N) (Figura 3).

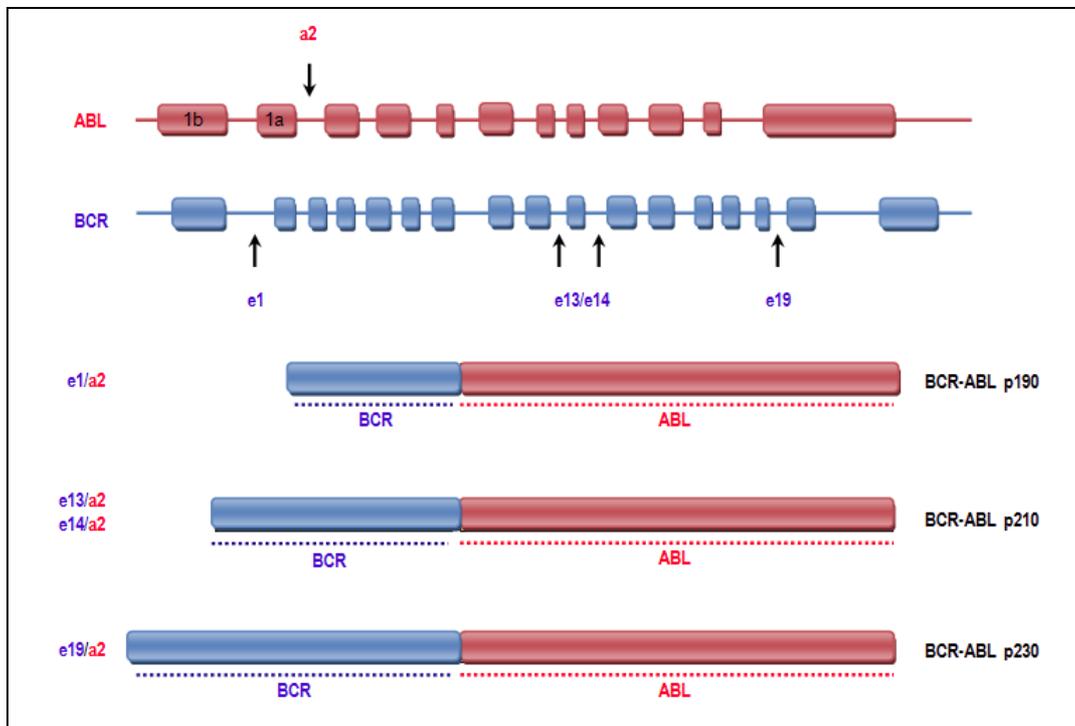


Figura 3: Rappresentazione delle varianti del trascritto di BCR-ABL. Ciascuna variante di BCR-ABL deriva dalla rottura in punti diversi del gene *BCR* durante la traslocazione cromosomica t(9,22).

L'oncogene di fusione *BCR-ABL* codifica per una proteina chimerica con attività tirosin-chinasica costitutiva. Questa attività catalitica deriva dalla proteina ABL, una tirosin-chinasi non recettoriale di 145 kDa coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, nella risposta agli stress genotossici e nell'apoptosi. In seguito alla fusione con BCR, i meccanismi di controllo interno dell'attività chinasi di ABL vengono bloccati, portando all'accumulo di BCR-ABL nel citoplasma delle cellule tumorali, dove svolge il suo ruolo leucemogenico. All'interno della cellula, BCR-ABL induce, infatti, l'attivazione di vie di trasduzione del segnale che portano alla riduzione dell'apoptosi,

all'aumento della proliferazione cellulare e all'alterazione delle interazioni fra cellula e matrice extracellulare, inducendo un incremento della motilità delle cellule tumorali e favorendone la trasformazione neoplastica (Figura 4).

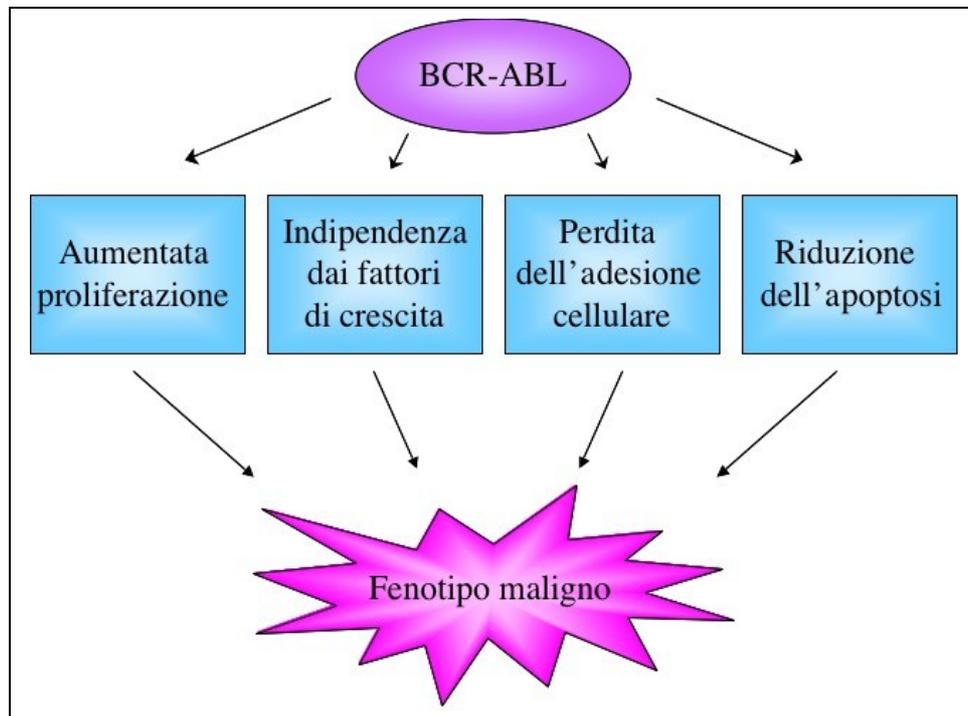


Figura 4: Vie di segnalazione cellulare influenzate dall'oncoproteina BCR-ABL.

ABL e il suo dominio tirosin-chinasico.

L'oncoproteina BCR-ABL eredita il dominio tirosin-chinasico (TK) da ABL. Questa proteina presenta diversi domini (Figura 5) e può essere schematicamente suddivisa in quattro regioni:

- 1) una piccola regione N-terminale, chiamata Cap, che modula l'attività chinasica della proteina e che viene persa in seguito alla fusione con BCR;

- 2) un *Core Domain* composto dai domini SH2, SH3 e dal dominio tirosin-chinasico (TK);
- 3) una "*Natively Unfolded Region*", un lungo segmento che non presenta strutture secondarie o terziarie, contenente un dominio di legame del DNA (*DNA Binding Domain* - DBD);
- 4) una regione C-terminale, contenente un dominio di legame dell'actina (*Actin Binding Domain* - ABD).

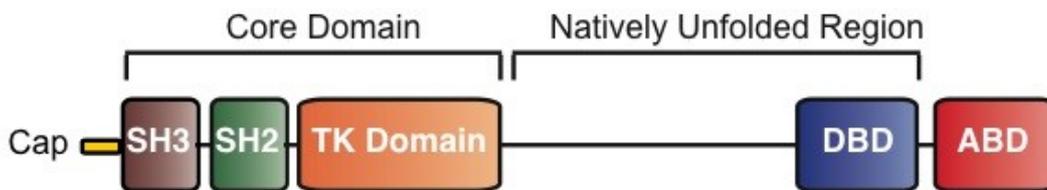


Figura 5: Domini funzionali della proteina ABL. SH = *src homology*; TK = *tyrosin kinase*; DBD = *DNA binding domain*; ABD = *actin binding domain*.

Il dominio TK di ABL svolge la funzione catalitica di trasferimento di gruppi fosfato da una molecola di ATP (adenosintrifosfato) ad un residuo di tirosina (Y), situato in specifiche sequenze di riconoscimento delle proteine bersaglio. Tramite questo meccanismo di fosforilazione, ABL regola l'espressione o l'attivazione di queste proteine substrato.

Il dominio TK viene strutturalmente suddiviso in due regioni globulari, il lobo amino-terminale (N-lobe) ed il lobo carbossi-terminale (C-lobe). La tasca di legame dell'ATP si trova esattamente nell'interfaccia tra questi due lobi (Figura 6). Come tutte le proteine chinasi, il dominio catalitico di ABL

possiede due conformazioni: nella conformazione attiva, o “aperta”, il dominio è capace di legare la molecola di ATP necessaria per la catalisi, mentre nella conformazione inattiva, o “chiusa”, non è in grado di legare l'ATP (Figura 6). Durante il passaggio da uno stato ad un altro, alcune strutture secondarie del dominio chinasi subiscono delle variazioni conformazionali rilevanti. Tra queste, quelle che giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione della catalisi sono: l'ansa-p, che interagisce col gruppo fosfato della molecola di ATP; l'ansa di attivazione ed il motivo conservato DFG, ovvero i primi tre residui dell'ansa di attivazione (acido aspartico - D, fenilalanina - F, glicina - G), che modificano drasticamente il loro orientamento, favorendo, o meno, l'ingresso dell'ATP nella sua tasca di legame (Figura 6). L'elica- α C, ovvero l'ultima α -elica dell'N-lobe, non subisce variazioni strutturali durante il passaggio da una conformazione ad un'altra, ma può essere considerata un punto di riferimento per l'orientamento tridimensionale del dominio (Figura 6).

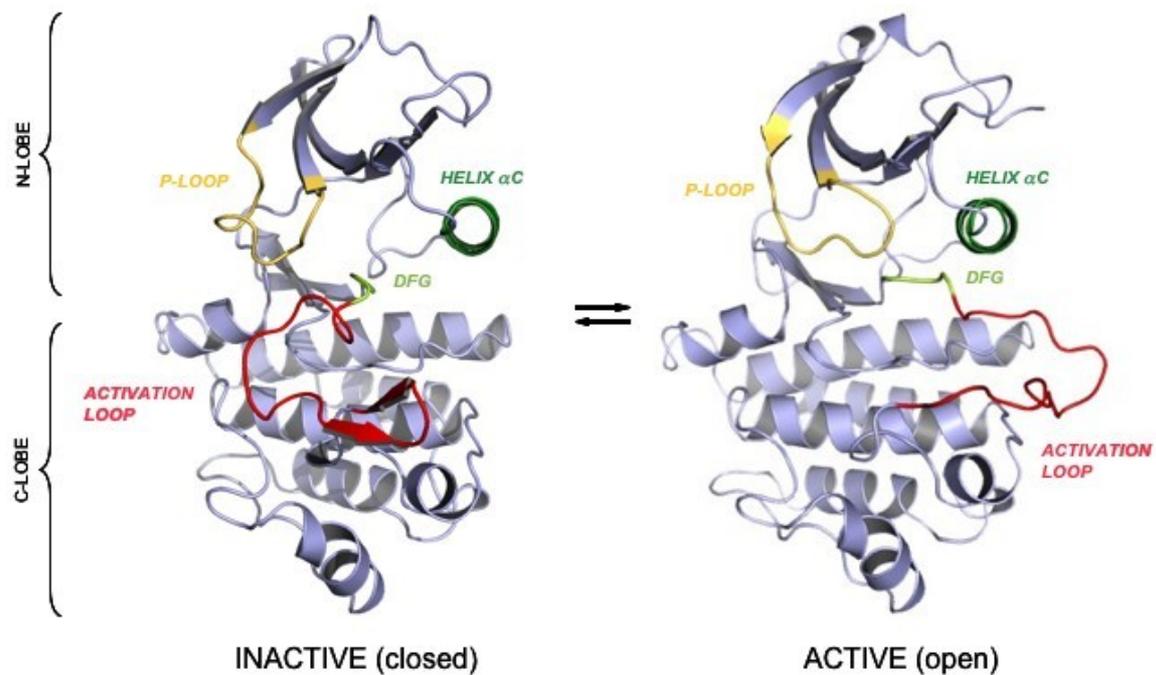


Figura 6: Rappresentazione strutturale delle conformazioni inattiva e attiva del dominio tirosin-chinasico di ABL. Le regioni coinvolte nel passaggio tra le due conformazioni sono colorate: l'ansa-p (giallo), l'ansa di attivazione (rosso), il motivo DFG (verde chiaro) e l'elica- α C (verde scuro).

Trattamento farmacologico e sviluppo di resistenze in pazienti di LMC.

Il primo composto utilizzato per la terapia farmacologia della LMC è stato il Busulfano, un chemioterapico convenzionale che portava ad un miglioramento dei sintomi correlati alla patologia, ma non era in grado di contenerne la progressione. L'eccessiva tossicità di questo farmaco ha portato all'introduzione dell'Idrossiurea (HU) nella terapia della LMC, un agente ad azione antiproliferativa che, pur mostrando una ridotta tossicità, non era in grado di indurre la remissione citogenetica della patologia, ovvero la riduzione delle cellule Philadelphia positive. Un miglioramento nelle prospettive di sopravvivenza dei pazienti si è ottenuto a partire dagli anni '80 con l'introduzione dell'interferone-alfa (IFN- α), una proteina immuno-

modulatrice con attività anti-proliferativa. Tuttavia, IFN- α era in grado di indurre la remissione ematologica della malattia solo nel 20-30% dei pazienti trattati.

L'evidenza che l'attività catalitica costitutiva di BCR-ABL fosse responsabile della patogenesi della LMC, ha portato allo sviluppo delle prime terapie molecolari mirate. Dal 2001, infatti, il farmaco di prima linea per il trattamento dei pazienti di LMC è l'inibitore delle tirosin-chinasi (TKI) Imatinib Mesilato (IM), il primo "farmaco a bersaglio molecolare", in grado di inibire efficacemente il funzionamento del dominio catalitico di BCR-ABL, inducendo l'apoptosi selettiva delle cellule Philadelphia positive. Il meccanismo d'azione dell'IM prevede il suo ingresso all'interno della tasca catalitica del dominio TK di BCR-ABL, al posto dell'ATP, inibendo quindi l'attività catalitica ed oncogenica di BCR-ABL. L'IM è in grado di legare esclusivamente la conformazione inattiva del dominio catalitico, spostando l'equilibrio delle due conformazioni verso quella inattiva, e quindi sprovvista di attività chinasi (Figura 7).

Nonostante la sua significativa efficacia nel trattamento della LMC, circa il 30% dei pazienti trattati con IM non risponde alla terapia, o sviluppa resistenze al trattamento farmacologico. I meccanismi di resistenza possono essere distinti in due gruppi, quelli dipendenti da BCR-ABL, come la generazione di mutazioni puntiformi nel suo dominio TK o la sua

amplificazione genica, e quelli indipendenti da BCR-ABL, ancora non del tutto noti.

La generazione di mutazioni puntiformi nel dominio TK di BCR-ABL rappresenta il meccanismo di resistenza meglio caratterizzato. Esso consiste nella sostituzione di singoli amminoacidi nella sequenza codificante di BCR-ABL. Queste mutazioni preservano l'attività catalitica dell'oncoproteina, ma interferiscono con il legame dell'IM, che non è più in grado di inibire l'attività catalitica di BCR-ABL.

Per cercare di superare questi fenomeni di resistenza o di intolleranza ad IM, negli ultimi anni sono stati sintetizzati inibitori di seconda generazione (2G), tra i quali il Dasatinib (DAS), che possiedono un'efficacia maggiore dell'IM e sono in grado di inibire la quasi totalità dei mutanti di BCR-ABL resistenti ad IM. A differenza dell'IM, il DAS lega la conformazione attiva del dominio catalitico di BCR-ABL (Figura 7).

Anche se gli inibitori di 2G sono più potenti dell'IM nell'inibizione dell'attività catalitica di BCR-ABL, alcune mutazioni puntiformi sono ancora causa di resistenza al trattamento farmacologico. Tra queste, la sostituzione della treonina in posizione 315 con una isoleucina (T315I) genera un mutante di BCR-ABL che non risponde al trattamento con TKIs di prima e seconda generazione, ed è associato ad una prognosi sfavorevole. Al fine di inibire BCR-ABL^{T315I}, nel 2009, è stato sintetizzato un inibitore di terza generazione (3G), il Ponatinib (PON), in grado di legare il dominio catalitico di BCR-ABL nonostante la presenza della mutazione T315I. PON si trova ancora nella

fase III della sperimentazione clinica, ma i dati preliminari disponibili confermano la sua efficacia nel trattamento di BCR-ABL^{T315I}. Come l'IM, anche il PON lega la conformazione inattiva del dominio catalitico di BCR-ABL (Figura 7).

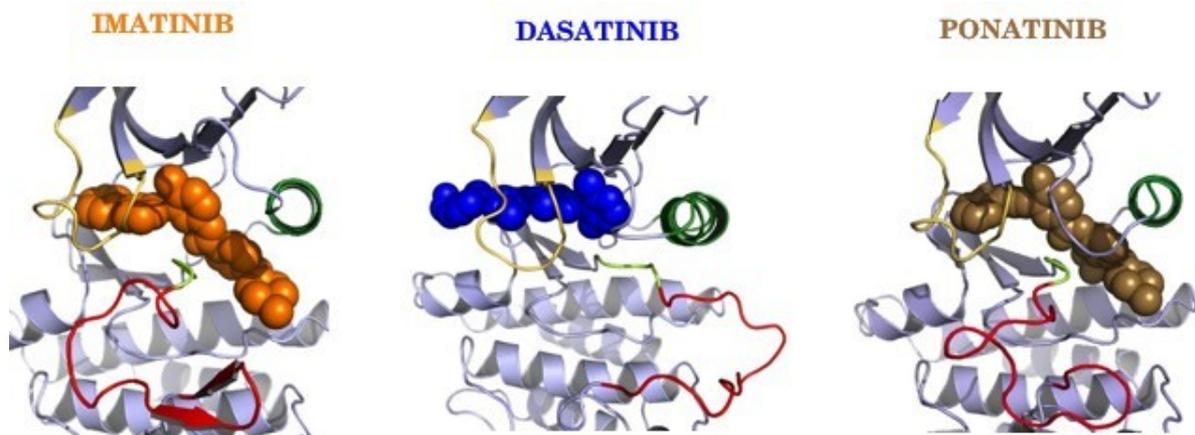


Figura 7: Rappresentazione strutturale di TKIs di prima, seconda e terza generazione, all'interno del dominio catalitico di BCR-ABL. Imatinib in arancione; Dasatinib in blu; Ponatinib in marrone.

Interazioni fra TKIs e dominio catalitico di BCR-ABL.

Studi cristallografici del complesso tra il dominio TK di BCR-ABL e diversi TKIs hanno evidenziato cinque residui amminoacidici responsabili delle interazioni con gli inibitori mediante la formazione di legami a idrogeno stabili. Questi amminoacidi sono: l'acido glutammico in posizione 286 (E286), la treonina in posizione 315 (T315), la metionina in posizione 318 (M318), l'isoleucina in posizione 360 (I360) e l'acido aspartico in posizione 381 (D381) (Figura 8). In particolare: l'IM forma legami a idrogeno con ciascuno di questi residui; il DAS mantiene le interazioni solo con la T315 e la M318; il PON

interagisce con E286, M318, I360 e D381, e non forma legami a idrogeno con la T315 (Figura 8).

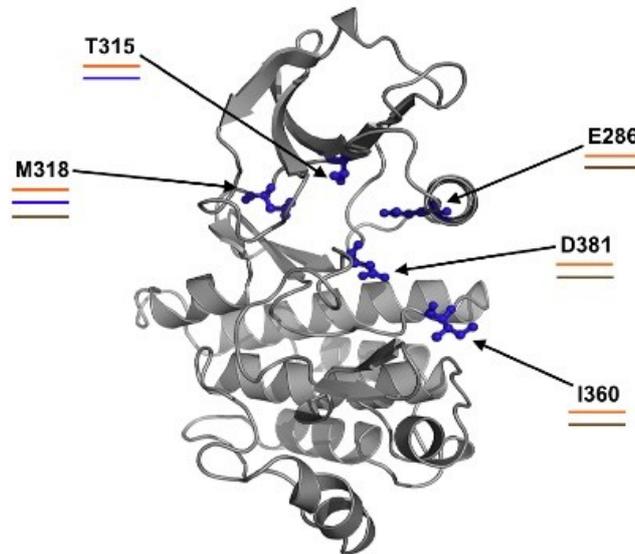


Figura 8: Localizzazione dei cinque residui coinvolti nei legami a idrogeno con TKIs. Le linee colorate che sottolineano ciascun residuo indicano se quell'amminoacido genera legami a idrogeno con l'inibitore del colore corrispondente. (IM = arancione, DAS = blu, PON = marrone).

Nei pazienti affetti da LMC, sono circa sessanta gli amminoacidi del dominio TK di BCR-ABL che subiscono mutazioni che conferiscono resistenza agli inibitori delle tirosin-chinasi (Figura 9).

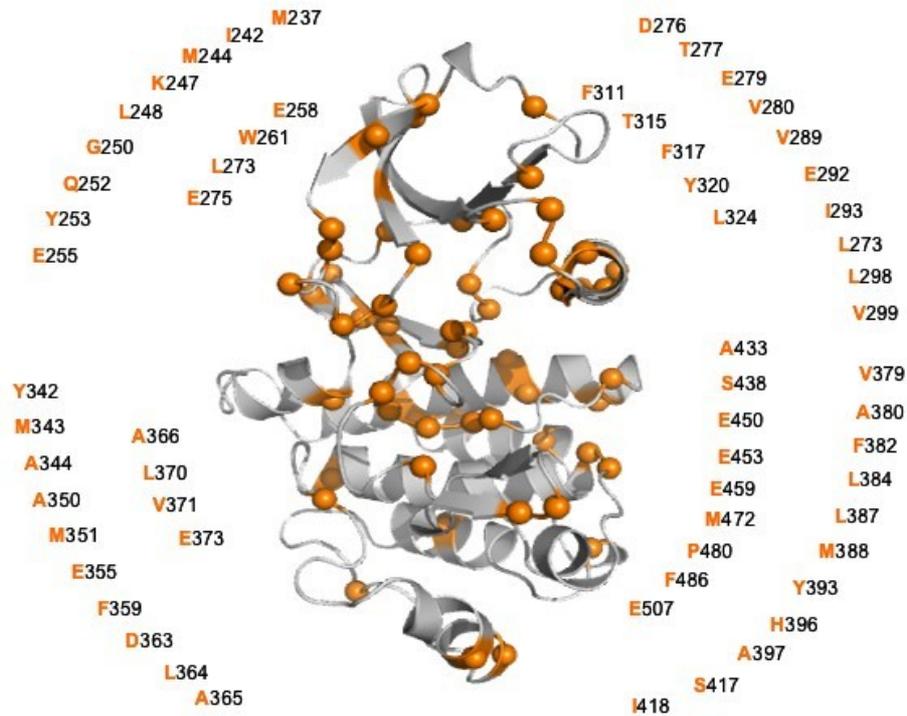


Figura 9: Residui del dominio catalitico di BCR-ABL soggetti a mutazioni puntiformi. I residui evidenziati mediante sfere arancioni, ed elencati intorno alla struttura del dominio TK di BCR-ABL, se soggetti a mutazione puntiforme causano resistenza ai TKIs.

È interessante notare che, ad eccezione della sostituzione T315I, nessuna mutazione nota in letteratura coinvolge gli altri quattro residui amminoacidici (E286, M318, I360 e D381) che formano legami a idrogeno con i TKIs. Queste osservazioni ci hanno fatto ipotizzare che questi quattro residui siano critici per l'attività catalitica dell'oncoproteina BCR-ABL.

SCOPO ED IPOTESI DEL LAVORO

In questo progetto abbiamo combinato approcci sperimentali e computazionali per spiegare l'assenza di mutazioni puntiformi note a livello di quattro residui (E286, M318, I360 e D381) del dominio TK di BCR-ABL che formano legami idrogeno con i TKIs.

Abbiamo, quindi, valutato l'effetto di mutazioni "*conservative*" e "*non conservative*" a livello di questi quattro amminoacidi sull'attività oncogenica di BCR-ABL. Per spiegare l'assenza di mutazioni note a livello di questi residui, abbiamo ipotizzato che:

- 1) una mutazione "*conservativa*" generi una oncoproteina che mantiene l'attività catalitica, ma anche la capacità di legare i TKIs. I cloni leucemici che esprimono questi mutanti sarebbero quindi eliminati dal trattamento farmacologico;
- 2) una mutazione "*non conservativa*" alteri la struttura del dominio catalitico, compromettendo l'attività chinasi dell'oncoproteina. L'assenza di attività catalitica esita quindi in una selezione negativa del clone mutato.

In entrambi i casi, queste mutazioni generano dei cloni leucemici che non riusciranno a selezionarsi e proliferare, spiegando l'assenza di sostituzioni amminoacidiche note a livello di E286, M318, I360 e D381, in pazienti di LMC resistenti ai TKIs.

MATERIALI E METODI

Mutagenesi.

Per la generazione delle mutazioni puntiformi nella sequenza *wild type* di *BCR-ABL*, clonata all'interno del vettore plasmidico di espressione pcDNA3.1 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), è stato utilizzato un kit commerciale, il QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), che utilizza la tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per inserire variazioni di singoli nucleotidi all'interno di una sequenza di DNA. Per ciascuna mutazione è stata disegnata una coppia di oligonucleotidi (Tabella 1) con uno o due nucleotidi modificati per mutagenizzare il codone d'interesse rispetto alla sequenza *wild type*. I prodotti di PCR sono stati quindi sottoposti a digestione enzimatica con l'endonucleasi DpnI che digerisce in maniera specifica sequenze metilate di DNA, ovvero il DNA parentale non mutato. Il rimanente DNA mutato amplificato è stato trasformato in cellule batteriche competenti di *E. Coli* (DH5 α), ed i batteri sono stati seminati su piastre di Luria-Bertani (LB) agar contenenti 100 μ g/ml di Ampicillina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dal momento che il vettore pcDNA3.1 contiene il gene per la resistenza a questo antibiotico. Le singole colonie cresciute sono state prelevate ed inoculate in 3 ml di terreno LB contenente 100 μ g/ml di Ampicillina. Dopo circa 16 ore, dalle colture batteriche è stato estratto il DNA mediante il kit GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich) ed è stato verificato l'effettivo

inserimento delle mutazioni puntiformi mediante sequenziamento diretto dei costrutti (BMR Genomics, Padova, Italia).

T315I fwd	AGCCCCCGTTCTATATCATC(<u>AIT</u>)GAGTTCATGACC
T315I rev	GGTCATGAACTC(<u>AAT</u>)GATGATATAGAACGGGGGCT
E286K fwd	GGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAA(<u>AAA</u>)GCTGCAGTCA
E286K rev	TGACTGCAGC(<u>TTI</u>)TTTCAAGAACTCTCCACCTCC
E286R fwd	CATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAA(<u>CGA</u>)GCTGCAGTCATG
E286R rev	CATGACTGCAGC(<u>TCG</u>)TTTCAAGAACTCTCCACCTCCATG
M318T fwd	TATCATCACTGAGTTC(<u>ACG</u>)ACCTACGGGAACCTCC
M318T rev	GGAGGTTCCCGTAGGT(<u>CGT</u>)GAACTCAGTGATGATA
M318K fwd	TATCATCACTGAGTTC(<u>AAG</u>)ACCTACGGGAACCTCC
M318K rev	GGAGGTTCCCGTAGGT(<u>CIT</u>)GAACTCAGTGATGATA
I360T fwd	GAGTACCTGGAGAAGAAAACTTC(<u>ACC</u>)CACAGAGATCTT
I360T rev	AAGATCTCTGTG(<u>GGT</u>)GAAGTTTTTCTTCTCCAGGTA
I360R fwd	CCTGGAGAAGAAAACTTC(<u>CGC</u>)CACAGAGATCTTGCTGCC
I360R rev	GGCAGCAAGATCTCTGTG(<u>GCG</u>)GAAGTTTTTCTTCTCCAGG
D381K fwd	CACTTGGTGAAGGTAGCT(<u>AAA</u>)TTTGGCCTGAGCAGGTTG
D381K rev	CAACCTGCTCAGGCCAAA(<u>ITI</u>)AGCTACCTTCACCAAGTG
D381R fwd	CACTTGGTGAAGGTAGCT(<u>CGT</u>)TTTGGCCTGAGCAGGTT
D381R rev	AACCTGCTCAGGCCAAA(<u>ACG</u>)AGCTACCTTCACCAAGTG

Tabella 1: Oligonucleotidi *forward* e *reverse* utilizzati per generare mutazioni puntiformi nella sequenza di *BCR-ABL*. Le parentesi includono i codoni codificanti per ciascun amminoacido mutato. I nucleotidi modificati per generare la mutazione puntiforme sono sottolineati. Fwd: *forward*; rev: *reverse*.

Costrutti lentivirali.

Per clonare le sequenze mutate di *BCR-ABL* nel vettore lentivirale pLEX (Open Biosystems, Lafayette, CO, USA), ciascun costrutto è stato amplificato mediante PCR utilizzando due oligonucleotidi: i) un *forward* (fwd) contenente il sito di restrizione specifico per *SpeI* (corsivo), la sequenza codificante per l'epitopo FLAG (sottolineata) e le prime basi di *BCR* (G *ACTAGT* GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GCG ACG ATA AG ATG GTG GAC CGG TGG C); ii) un oligonucleotide *reverse* (rev) contenente il sito di restrizione per *MluI* (corsivo) e le ultime basi di *ABL* (CG *ACGCGT* CTA CCT CTG CAC TAT GTC ACT). I siti di restrizione per le endonucleasi *SpeI* e *MluI* sono entrambi presenti nel Sito Multiplo di Clonaggio (MCS) del pLEX. I prodotti di PCR ed il vettore pLEX sono stati quindi sottoposti a digestione enzimatica utilizzando gli enzimi di restrizione *SpeI* e *MluI* ed è stata poi effettuata la reazione di ligazione fra il vettore e ciascun inserto digerito, mediante l'utilizzo dell'enzima T4 DNA ligasi (Life Technologies). Il prodotto di ligazione è stato trasformato in cellule competenti DH5 α , e le colonie cresciute sono state selezionate mediante digestione enzimatica con *SpeI* e *MluI* per controllare l'eventuale presenza di ricombinazioni del DNA (Figura 10).

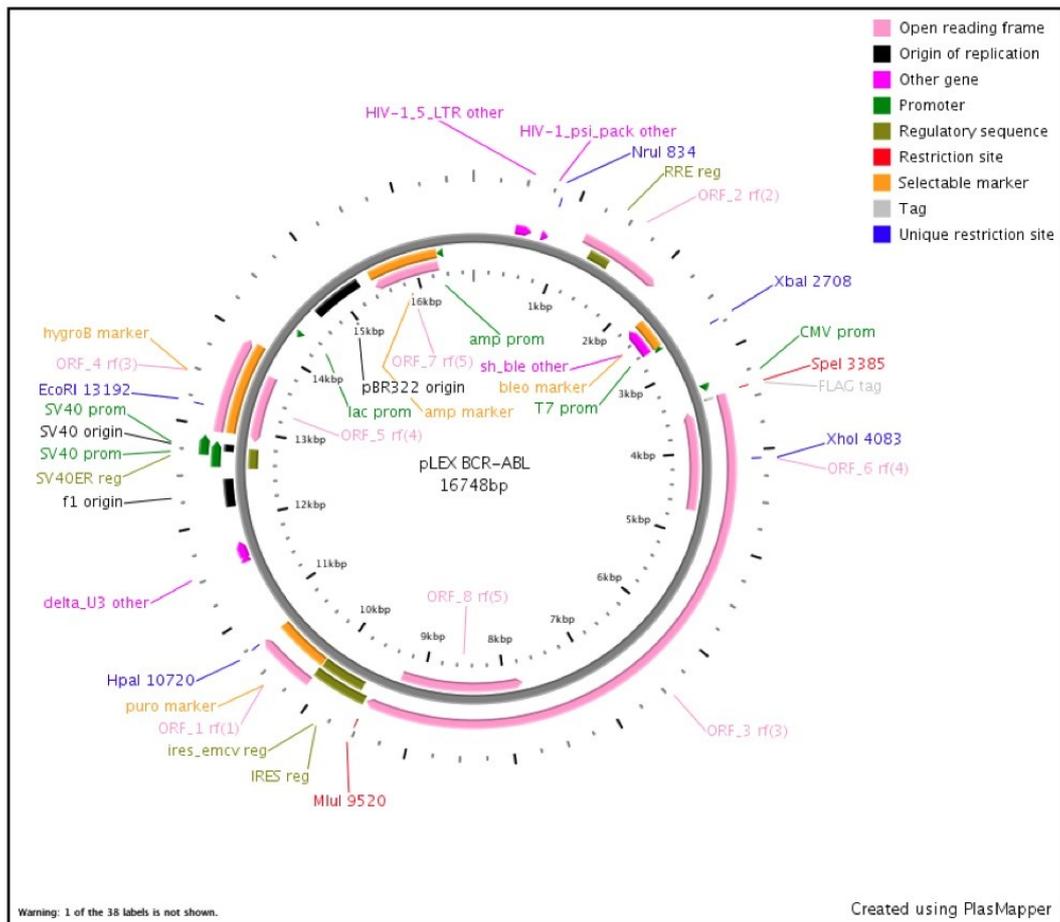


Figura 10: Mappa del vettore lentivirale pLEX in cui sono stati clonati i costrutti mutati di *BCR-ABL*.

Per generare i costrutti mutati di *ABL*, è stata utilizzata la corrispondente isoforma mutata di *BCR-ABL* clonata all'interno del vettore plasmidico pcDNA3.1. In ciascun costrutto la sequenza di *BCR* è stata sostituita con le prime basi della sequenza di *ABL* che vengono perse durante la traslocazione cromosomica t(9,22). Essendo *ABL* una proteina ubiquitaria, per amplificare le sue prime 450 paia di basi (bp) è stato estratto l'RNA totale da una linea cellulare umana di leucemia mieloide acuta (HL-60). L'RNA è stato quindi retrotrascritto in cDNA e sottoposto ad una reazione di PCR utilizzando i seguenti oligonucleotidi: i) fwd (CTA GCTAGC GGATCC ATG TAC

CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG TTG GAG ATC TGC CTG AAG C)

contenente le sequenze di riconoscimento degli enzimi di restrizione NheI e BamHI (corsivo), la sequenza codificante per l'epitopo HA (sottolineata) e le prime basi di ABL; ii) rev (CTC AGC AGA TAC TCA GCG GCA T) disegnato fra le posizione 461 e 482 della variante 1a di *ABL*. Il prodotto di PCR è stato quindi clonato al posto della sequenza di BCR nei plasmidi mutagenizzati pcDNA3.1-BCR-ABL mediante l'utilizzo degli enzimi di restrizione NheI (sul *primer fwd* e nell'MCS del pcDNA3.1) e KpnI (in posizione 385 della sequenza di *ABL1a*).

Una volta ottenute le sequenze mutate di *ABL* all'interno del vettore d'espressione pcDNA3.1, ciascun costrutto è stato clonato nel vettore lentivirale pLEX. In questo caso sono stati utilizzati i siti di restrizione per gli enzimi BamHI e NotI, presenti sia nel MCS del pLEX che agli estremi delle sequenze di ABL nel pcDNA3.1 (Figura 11).

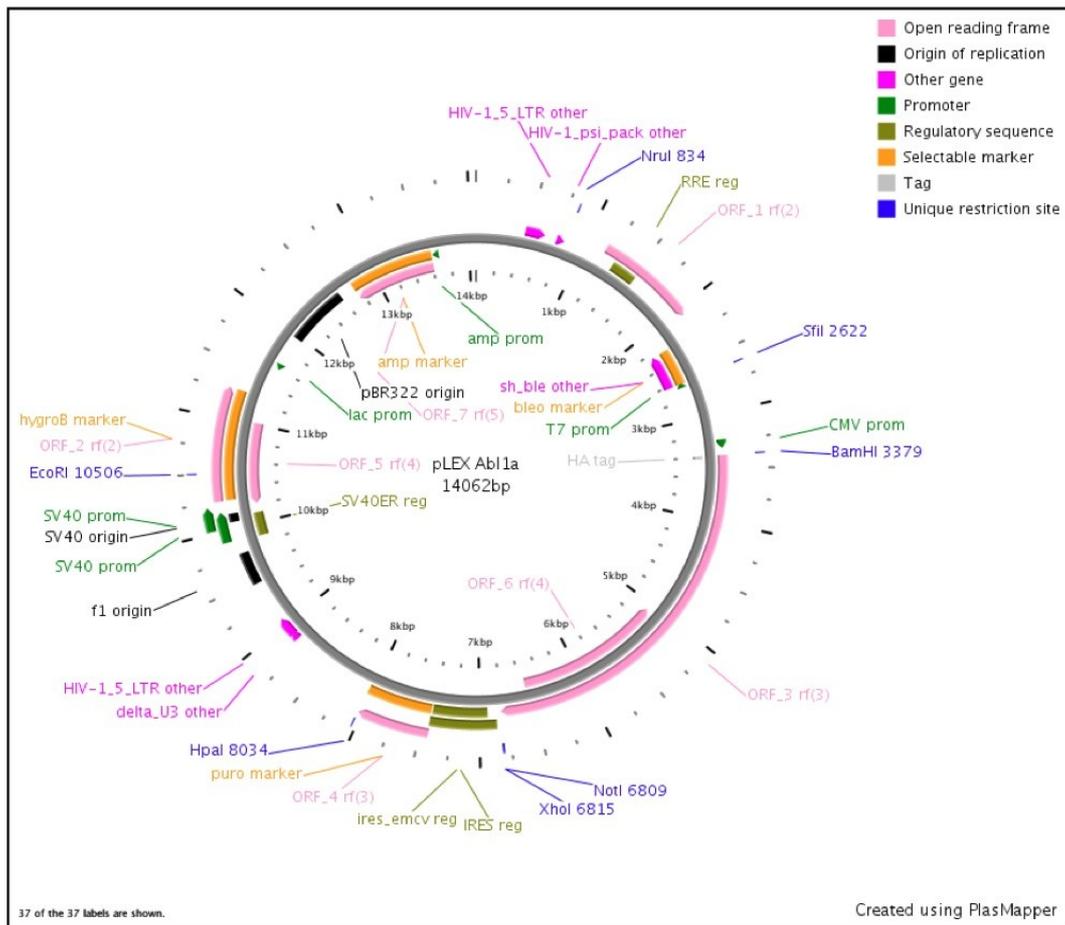


Figura 11: Mappa del vettore lentivirale pLEX in cui sono stati clonati i costrutti mutati di *ABL*.

Colture cellulari.

Le linee cellulari utilizzate in questo progetto sono le HEK293T (Human Embryonic Kidney) (Open Biosystems) e la linea cellulare murina pro-B interleuchina-3 (IL-3) dipendente Ba/F3 (DSMZ, Braunschweig, Germania). Le HEK293T, sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose contenente sodio piruvato (Sigma-Aldrich) addizionato di 4mM di L-glutamina (Sigma-Aldrich), 50 Unità/ml di Penicillina, 50 µg/ml di Streptomicina (Sigma-Aldrich) e 10% di FBS Tet-Free (*Fetal Bovine Serum Tetraciline Free*) (Lonza, Basel, Svizzera). Le Ba/F3 sono state coltivate in

RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich) addizionato con 4mM L-glutammina, 50 Unità/ml di Penicillina, 50 µg/ml di Streptomicina, 10% di FBS (Lonza) e 10% di mezzo condizionato contenente IL-3, derivante dalla coltura delle WEHI-3B, una linea cellulare di leucemia mielomonocitica murina (DSMZ). Le WEHI-3B sono state mantenute in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma-Aldrich), contenente 2 mM di L-glutammina, 50 Unità/ml di Penicillina, 50 µg/ml di Streptomicina, 10% di FBS e 25 µM di 2-βmercaptoetanololo (Sigma-Aldrich). Tutte le cellule sono state cresciute a 37°C, in un incubatore al 5% di CO₂.

Trasfezioni transienti e trasduzioni lentivirali.

Per la trasfezione transiente dei costrutti di *BCR-ABL* e di *ABL* nelle HEK293T è stato utilizzato il metodo del calcio fosfato. 20 µg di DNA di ciascun plasmide sono stati mescolati ad una soluzione di CaCl₂ 250 mM. A questa miscela è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione tampone HBS (*Hepes buffered saline*) 2X (Hepes 50 mM, NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 1.26 mM), in modo da ottenere un precipitato di calcio fosfato che ha la capacità di legare le molecole di DNA. La soluzione finale è stata quindi addizionata, goccia a goccia, al terreno di coltura delle HEK293T, e le cellule sono state mantenute in coltura per 48 ore.

Per la trasduzione stabile delle Ba/F3, è stata utilizzata la tecnica dell'infezione mediante lentivirus che prevede la preparazione di surnatante virale e la successiva trasduzione delle Ba/F3. Per la preparazione del

surnatante virale, sia il vettore vuoto di controllo pLEX, che i vettori contenenti i costrutti di *BCR-ABL* e di *ABL*, sono stati co-trasfettati insieme ad una mix di cinque plasmidi (Trans-Lentiviral packaging mix, Open Biosystems) nelle HEK293T, mediante il metodo del calcio fosfato. I plasmidi di packaging codificano per le proteine necessarie per l'assemblaggio di particelle lentivirali che racchiuderanno e veicoleranno i costrutti d'interesse (*transfer vector*). A 48 ore dalla trasfezione, il surnatante cellulare contenente le particelle virali è stato raccolto ed utilizzato per trasdurre le Ba/F3. Queste cellule sono state centrifugate per 90 minuti, a 32°C, a 1200 x g in presenza di 1ml di surnatante virale e 8 µg/ml di Polibrene (Sigma-Aldrich). La stessa operazione è stata eseguita a 24 ore di distanza. Poiché il vettore pLEX contiene il gene per la resistenza alla puromicina, le cellule trasdotte sono state infine selezionate mediante trattamento con 3 µg/ml di Puromicina (Sigma-Aldrich) per 72 ore.

Saggi di proliferazione cellulare e trattamento farmacologico.

I saggi di vitalità cellulare sulle cellule Ba/F3 sono stati effettuati utilizzando un kit commerciale (ATPlite 1step, Luminescence ATP Detection Assay System) (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) che misura i livelli di ATP all'interno della cellula. In particolare, la luminescenza emessa durante il saggio è direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP nelle cellule, quindi è un indicatore della proliferazione cellulare.

1 x 10⁴ Ba/F3 trasdotte con il vettore vuoto di controllo ed i vari costrutti di *BCR-ABL* e di *ABL* sono state piastrate, in triplicato, in un multiwell da 96, in assenza del fattore di crescita IL-3. La proliferazione cellulare è stata valutata a 24, 48 e 72 ore.

Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti su Ba/F3 trasdotte con *BCR-ABL*^{WT}, *BCR-ABL*^{T315I} e *BCR-ABL*^{I360T}, dopo trattamento con inibitori delle tirosin-chinasi. Le cellule sono state trattate per 48 ore con IM 1 µM (Novartis, Basel, Svizzera), DAS 0.7 nM (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) e PON 0.5 nM (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) per *BCR-ABL*^{WT} e *BCR-ABL*^{I360T}, e 10 nM per *BCR-ABL*^{T315I}. La proliferazione cellulare è stata valutata a 24, 48 e 72 ore.

Immunoblotting.

Le diverse linee cellulari sono state raccolte, risospese in tampone isotonic [NaCl 100 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.5, PMSF 2 mM, cocktail di inibitori delle proteasi (Roche, Mannheim, Germania)] e lisate mediante sonicazione per l'estrazione delle proteine.

I lisati proteici totali, ottenuti dopo centrifugazione per 20 minuti, a 4°C, a 14000 rpm, sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), caricando 60 µg di lisato proteico in ciascun pozzetto. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Svezia). Le membrane sono state bloccate (*blocking*) con una soluzione al 5% di latte in polvere o al 10%

di BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma-Aldrich) in TBS-T (Tris 1 M pH 7.4, NaCl 3 M) allo 0.2% di Tween 20, a seconda del tipo di anticorpo primario utilizzato.

Gli anticorpi primari impiegati sono stati: anti-FLAG monoclonale (Sigma-Aldrich), anti-HA monoclonale (Covance, Princeton, NJ, USA), anti-fosfotirosina monoclonale (pTyr) (clone 4G10, Santa Cruz Biotechnology) ed anti-Actina monoclonale (Sigma-Aldrich). Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugati con HRP (Horseradish Peroxidase) (Amersham Biosciences) e le proteine sono state visualizzate mediante incubazione con substrato chemiluminescente (LiteAblot, Euroclone, Pero, Italia) e successiva esposizione su lastre (CL-XPosure Film, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Preparazione delle strutture e simulazioni di dinamica molecolare.

Sono state effettuate simulazioni di dinamica molecolare (DM) dei domini TK di BCR-ABL^{WT}, BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T}, sia per le strutture libere che per quelle legate ad IM, DAS e PON.

Le strutture del dominio TK *wild type* legate ai tre farmaci sono state scaricate da Protein Data Bank : conformazione inattiva legata ad IM (codice: PDB: 2HYY), conformazione attiva legata a DAS (codice: PDB: 2GQG) e conformazione inattiva legata a PON (codice: PDB: 3OXZ). Le strutture contenenti le mutazioni puntiformi T315I ed I360T derivano da un procedimento chiamato "*in silico mutagenesis*" effettuato utilizzando il

programma MODELLER v9.8. Infine, le rispettive strutture non legate agli inibitori sono state ottenute mediante semplice rimozione degli inibitori stessi. Tutte le strutture presentano una risoluzione elevata ($< 2 \text{ \AA}$) e piccole regioni mancanti sono state ricostruite utilizzando MODELLER v9.8.

Il programma di simulazione GROMACS 4.0 è stato utilizzato per preparare l'ambiente di simulazione, per eseguire la dinamica molecolare e per analizzare le traiettorie risultanti. Le simulazioni sono state eseguite utilizzando il campo di forza "ffamber99sb" di AMBER per la proteina, il modello molecolare TIP3P per l'acqua ed il campo di forza generico AMBER (GAFF) con cariche AM1-BCC per gli inibitori.

Le equazioni di moto sono state integrate utilizzando il metodo "*leap-frog*" con *time-step* di 2-fs. Tutti i legami covalenti delle proteine sono stati trattati con il metodo LINCS, mentre il metodo SETTLE è stato utilizzato per le molecole d'acqua. Tutte le interazioni elettrostatiche sono state calcolate con il metodo Ewald. Lo stato di protonazione per i residui sensibili al pH, è stato trattato come segue: Arg and Lys sono stati caricati positivamente, Asp and Glu caricati negativamente ed His mantenuta neutra. La carica netta di ogni sistema è stata, quindi, neutralizzata mediante aggiunta di un opportuno numero di ioni carichi: Cl^- o Na^+ . Tutti i sistemi sono stati minimizzati energeticamente e la temperatura di ogni sistema aumentata gradualmente fino a 300 Kelvin (K). Le strutture così preparate, sono state infine sottoposte a simulazioni della durata di 50 nanosecondi (ns). Sono state eseguite analisi del comportamento delle strutture secondarie con DSSP. I moti correlati sono

stati calcolati partendo da una matrice di correlazione e rappresentati graficamente sulle strutture mediante linee. Tutte le immagini strutturali sono state generate con VMD 1.8.5 e PyMOL 1.2.

Allineamento multiplo delle tirosin-chinasi umane.

L'intero kinoma umano comprende 518 sequenze. Un sub-set di 94 sequenze relative al dominio catalitico delle 94 proteine tirosin-chinasi sono state scaricate dal web-site <http://kinase.com> ed allineate usando il programma T-Coffee. L'immagine dell'allineamento multiplo contenente ABL e 7 sequenze rappresentative di proteine potenzialmente coinvolte in tumori solidi ed ematologici è stata generata con Esript 2.2.

RISULTATI

La mutazione puntiforme I360T conferisce attività catalitica e capacità trasformante a BCR-ABL, ma non ad ABL.

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato di valutare se i quattro residui (E286, M318, I360 e D381) di BCR-ABL che generano legami a idrogeno con alcuni inibitori delle tirosin-chinasi contribuiscono a modulare l'attività catalitica dell'oncoproteina. Sulla base di predizioni computazionali, abbiamo quindi generato otto costrutti di *BCR-ABL* esprimenti mutazioni "conservative" e "non conservative" sui residui E286, M318, I360 e D381 (Tabella 2). Abbiamo anche generato un costrutto di *BCR-ABL* con la mutazione T315I, come controllo positivo, dal momento che gli effetti di questa sostituzione sull'attività oncogenica di BCR-ABL sono già noti.

AMMINOACIDO	POSIZIONE IN ABL	MUTAZIONE CONSERVATIVA	MUTAZIONE NON CONSERVATIVA
Acido Glutammico (E)	286	Lisina (K)	Arginina (R)
Metionina (M)	318	Treonina (T)	Lisina (K)
Isoleucina (I)	360	Treonina (T)	Arginina (R)
Acido Aspartico (D)	381	Lisina (K)	Arginina (R)
Treonina (T)	315	Isoleucina (I)	

Tabella 2: Mutazioni conservative e non conservative inserite nel dominio catalitico di BCR-ABL. Vocali e consonanti fra parentesi indicano il codice a singola lettera di ciascun residuo amminoacidico.

Abbiamo quindi valutato l'espressione e l'attività catalitica dei costrutti di *BCR-ABL* mediante trasfezione transiente nelle HEK293T. I risultati hanno mostrato che, sebbene tutti i costrutti siano espressi, solo la mutazione conservativa I360T mantiene l'attività catalitica di *BCR-ABL* anche se a livelli inferiori rispetto a *BCR-ABL*^{WT} e *BCR-ABL*^{T315I} (Figura 12). L'attività tirosin-chinasica di tutti gli altri mutanti è invece paragonabile a quella delle Ba/F3 di controllo trasdotte col vettore vuoto (Figura 12).

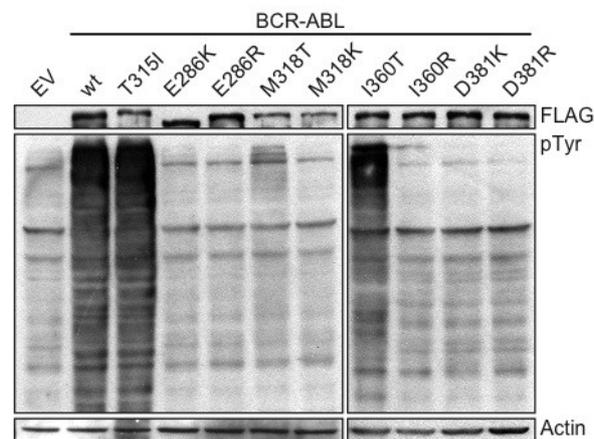


Figura 12: La sostituzione I360T genera un mutante di *BCR-ABL* con attività catalitica nelle HEK293T. I lisati cellulari di HEK293T trasfettate con i costrutti di *BCR-ABL* sopra indicati, sono stati incubati con anticorpi anti-FLAG (pannello superiore), anti-fosfotirosina (pTyr) (pannello intermedio) ed anti-actina (pannello inferiore). E.V.: Vettore vuoto; wt: *wild type*.

Abbiamo quindi voluto verificare se i dati ottenuti in trasfezione transiente fossero riproducibili dopo trasduzione stabile nelle cellule Ba/F3. I risultati ottenuti hanno confermato che solo *BCR-ABL*^{I360T} mantiene l'attività catalitica propria della proteina *wild type*, anche nelle Ba/F3 (Figura 13 A).

Abbiamo quindi valutato la capacità trasformante di ciascun mutante di BCR-ABL nelle cellule Ba/F3. Dal momento che questa linea cellulare è IL-3 dipendente, una volta privata di questo fattore di crescita la sua sopravvivenza dipende esclusivamente dalla capacità trasformante del mutante che esprime. Abbiamo quindi coltivato le Ba/F3 trasdotte con i costrutti di BCR-ABL in assenza di IL-3 per tre giorni, ed abbiamo valutato la proliferazione cellulare mediante il saggio ATPlite. Anche in questo caso, solo le Ba/F3 esprimenti BCR-ABL^{I360T} sono state capaci di sopravvivere e proliferare in assenza del fattore di crescita IL-3, sebbene con un tempo di replicazione inferiore rispetto alle Ba/F3 trasdotte con BCR-ABL^{WT} e BCR-ABL^{T315I} (Figura 13 B).

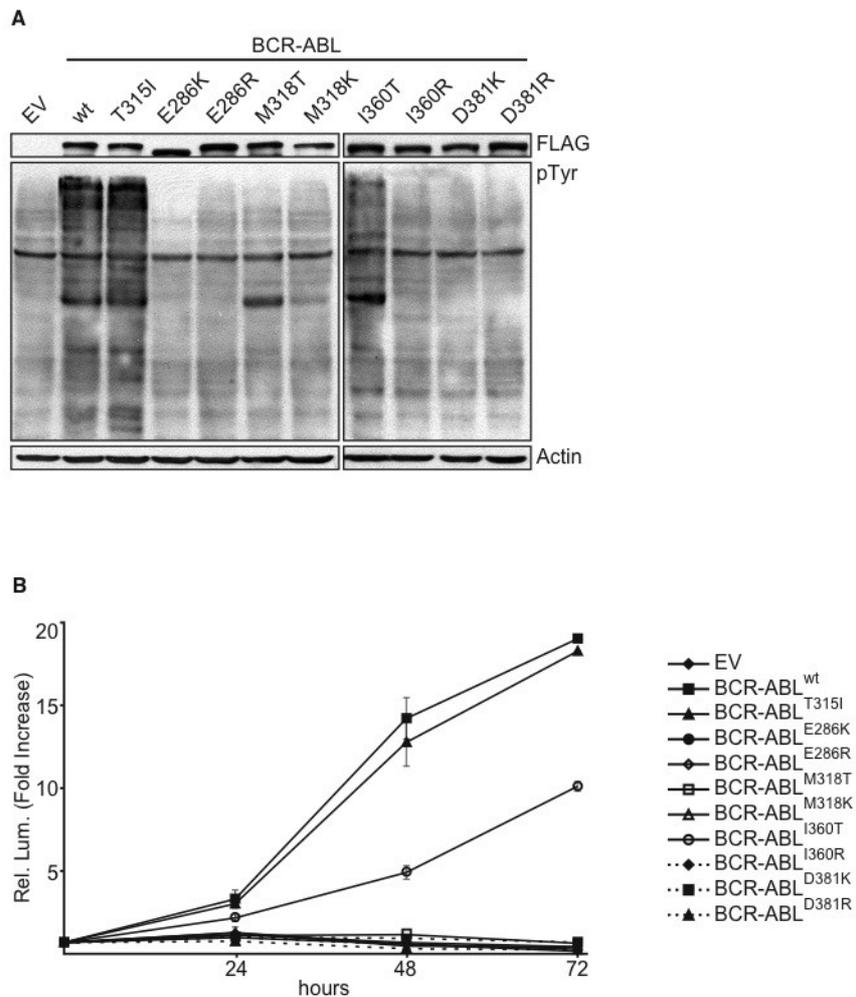


Figura 13: La sostituzione I360T genera un mutante di BCR-ABL con attività catalitica e capacità trasformante nelle cellule Ba/F3. **A:** I lisati cellulari di Ba/3 trasdotte con i costrutti di BCR-ABL indicati, sono stati incubati con anticorpi anti-FLAG (pannello superiore), anti-fosfotirosina (pannello intermedio) ed anti-actina (pannello inferiore). **B:** Le stesse cellule sono state coltivate in assenza di IL-3 per 24, 48 e 72 ore per effettuare un saggio di proliferazione cellulare. I risultati rappresentano la media di tre esperimenti separati, espressi come volte di incremento della luminescenza relativa (Rel. Lum.) rispetto alle cellule piastrate al tempo zero (pari a 1).

Possiamo quindi concludere che i residui E286, M318, I360 e D381 sono critici per l'attività oncogenica di BCR-ABL e che solo la mutazione conservativa I360T riesce a preservare l'attività catalitica e la capacità trasformante dell'oncoproteina.

In seguito ai risultati ottenuti, ci siamo quindi chiesti quale fosse l'effetto delle stesse mutazioni conservative e non conservative sulla proteina ABL. Abbiamo quindi generato dei costrutti di ABL, con le stesse mutazioni riportate in tabella 2, e li abbiamo trasfettati nelle HEK293T o trasdotti nelle cellule Ba/F3 (Figura 14).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che nelle HEK293T nessun mutante di ABL possiede attività catalitica costitutiva, ad eccezione di ABL^{WT} e di ABL^{T315I} (Figura 14 A). Inoltre, quando gli stessi costrutti sono stati trasdotti nelle Ba/F3, solo ABL^{T315I} ha mostrato attività catalitica (Figura 14 B) e capacità di trasformare le cellule in assenza di IL-3 (Figura 14 C). Possiamo quindi concludere che solo la mutazione T315I è in grado di conferire attività chinastica costitutiva alla proteina ABL.

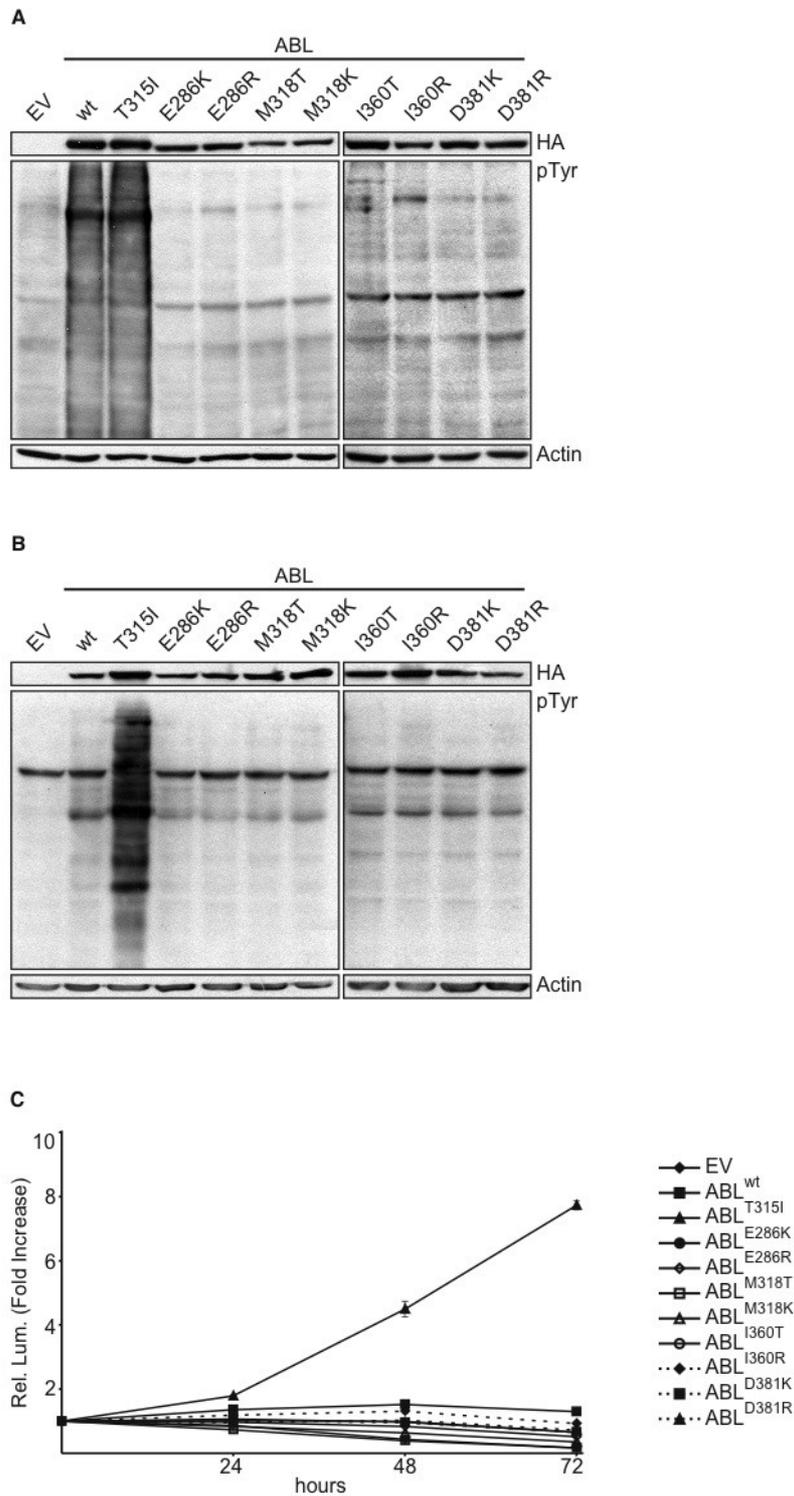


Figura 14: Nessun mutante di ABL possiede attività catalitica e/o capacità di trasformare le cellule Ba/F3. I lisati cellulari di HEK293T (A) e di Ba/F3 (B) rispettivamente trasfettate e trasdotte con i costrutti indicati di ABL, contenenti l'epitopo HA, sono stati incubati con anticorpi anti-HA (pannello superiore), anti-fosfotirosina (pannello intermedio) ed anti-actina (pannello inferiore). C: Le stesse cellule usate nel pannello B sono state coltivate in assenza di IL-3 per 24, 48 e 72 ore, per valutarne la capacità proliferativa.

Simulazioni di Dinamica Molecolare dei domini catalitici di BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} rivelano differenze nelle matrici di correlazione e nella dinamica dell'elica- α C.

Abbiamo deciso di analizzare il dominio TK di BCR-ABL^{WT} e dei mutanti T315I ed I360T mediante Dinamica Molecolare (DM). Con questo approccio computazionale viene simulata la dinamica di singoli domini proteici, ottenendo informazioni dettagliate sulla loro stabilità, sulla struttura e sulla dinamica.

Abbiamo effettuato 50 ns (nanosecondi) di simulazione per ciascun dominio e, al termine delle simulazioni, abbiamo valutato le matrici di correlazione, ovvero le interazioni tra due residui del dominio, e la stabilità delle strutture secondarie.

Rispetto al dominio *wild type* (Figura 15 A), nel dominio TK di BCR-ABL^{T315I} abbiamo osservato un forte incremento delle matrici di correlazione sia nel lobo carbossi-terminale che nel lobo amino-terminale (Figure 15 B). Questi risultati indicano un aumento della flessibilità e della motilità di queste regioni in presenza della mutazione T315I. La sostituzione I360T genera invece un incremento delle matrici di correlazione nella base della tasca di legame dell'ATP, e un decremento nel lobo amino-terminale del dominio, subito sopra l'elica- α C (Figura 15 C).

Valutando la dinamica delle strutture secondarie, abbiamo osservato un parziale svolgimento dell'elica- α C in BCR-ABL^{T315I} durante la simulazione (Figura 15 B). La stessa elica mantiene la sua struttura in BCR-ABL^{I360T} ma si

sposta verso l'alto dopo 13 ns di simulazione, mantenendo invariata questa posizione fino alla fine della simulazione (Figura 15 C).

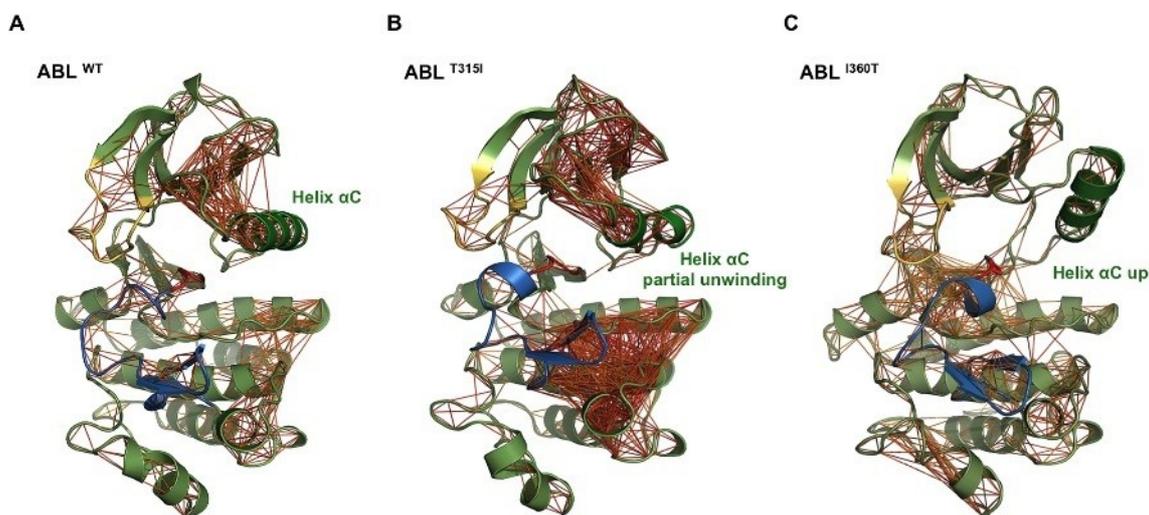


Figura 15: Differenze nelle matrici di correlazione e nella dinamica dell'elica- α C fra i domini catalitici di BCR-ABL^{WT}, BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T}. Le matrici di correlazione sono state calcolate durante i 50 ns di simulazione di dinamica molecolare dei domini TK di BCR-ABL^{WT} (A), BCR-ABL^{T315I} (B) e BCR-ABL^{I360T} (C).

Questi risultati contribuiscono a spiegare le diverse caratteristiche biologiche di BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} rispetto a BCR-ABL^{WT}.

I TKIs disponibili inibiscono il potenziale oncogenico di BCR-ABL^{I360T}.

Dal momento che la mutazione puntiforme T315I causa cambiamenti conformazionali nel dominio TK di BCR-ABL che portano alla resistenza ad inibitori di 1G e 2G, ci siamo chiesti quale fosse l'effetto della sostituzione I360T sulla capacità di legare diversi TKIs, visti i cambiamenti nella dinamica dell'elica- α C di BCR-ABL^{I360T}.

Abbiamo quindi trattato le cellule Ba/F3 trasdotte con BCR-ABL^{I360T} con IM, DAS e PON, e abbiamo valutato l'attività chinasi di questo mutante dopo 24 ore di trattamento (Figura 16, pannelli di sinistra). I dati ottenuti dimostrano che l'attività catalitica di BCR-ABL^{I360T} è drasticamente ridotta dopo trattamento con tutti gli inibitori, così come avviene per BCR-ABL^{WT} (Figura 16 A, B, C, pannelli di sinistra). Come atteso, BCR-ABL^{T315I} è invece sensibile solo al trattamento con l'inibitore di 3G PON (Figura 16 C, pannello di sinistra). Abbiamo anche valutato la vitalità cellulare delle Ba/F3 trasdotte con BCR-ABL^{I360T}, dopo 24 e 48 ore di inibizione con i TKIs (Figura 16, pannelli di destra), ed abbiamo osservato che il trattamento con tutti gli inibitori è in grado di inibire la proliferazione cellulare di queste cellule, così come delle Ba/F3 trasdotte con la proteina *wild type* (Figura 16 A, B, C, pannelli di destra). Solo il PON è invece efficace nell'inibire la proliferazione di Ba/F3 trasdotte con BCR-ABL^{T315I} (Figura 16 C, pannello di destra).

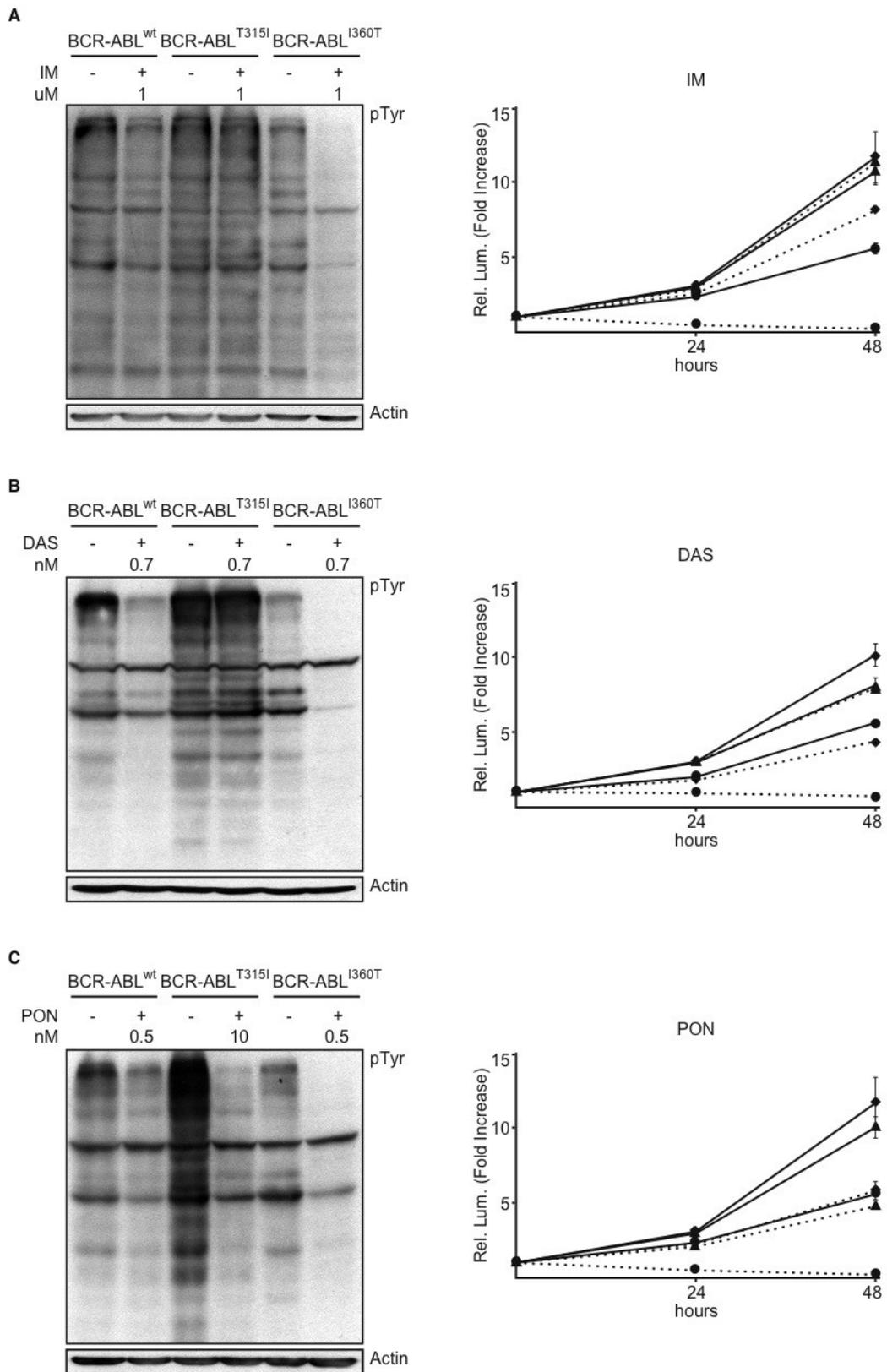


Figura 16: L'attività catalitica di BCR-ABL^{I360T} è soppressa da diversi TKIs. Ba/F3 esprimenti i costrutti di BCR-ABL indicati (WT, T315I e I360T) sono state trattate con IM (**A**), DAS (**B**) e PON (**C**). Dopo 24 ore i lisati cellulari sono stati incubati con anticorpi anti-fosfotirosina ed anti-actina (pannelli di sinistra). La proliferazione cellulare è stata valutata dopo 24 e 48 ore, in assenza (linea continua) o in presenza (linea tratteggiata) dell'inibitore indicato (pannelli di destra). BCR-ABL^{WT} (◆), BCR-ABL^{T315I} (▲) e BCR-ABL^{I360T} (●).

Quindi, nonostante le differenze nella dinamica dell'elica- α C e nelle matrici di correlazione del suo dominio TK, il mutante I360T risulta sensibile al trattamento con tutti gli inibitori. Questi risultati spiegano perché il mutante BCR-ABL^{I360T} non è mai stato riscontrato in pazienti resistenti al trattamento farmacologico. Infatti, questa mutazione conservativa, nonostante generi un'oncoproteina con attività catalitica, risulta comunque responsiva al trattamento con diversi TKIs.

Il legame con IM stabilizza l'elica- α C di BCR-ABL^{I360T}.

Data l'efficacia dell'IM nell'inibire BCR-ABL^{I360T} abbiamo voluto caratterizzare le interazioni fra l'IM e il dominio catalitico di questo mutante.

Risultati precedenti avevano mostrato uno spostamento verso l'alto dell'elica- α C nel dominio TK di BCR-ABL^{I360T} (Figura 15 C). Questo spostamento trascina il residuo E286 fuori dalla tasca di legame dell'ATP, rompendo il ponte salino che questo amminoacido forma con il residuo K271, che stabilizza la posizione orizzontale dell'elica- α C (Figura 17 A e B). Dal momento che questo legame è considerato critico per il legame dell'IM, abbiamo deciso di inserire questo inibitore all'interno della tasca di legame del dominio TK di BCR-ABL^{I360T} con l'elica spostata verso l'alto (Figura 17 C) ed abbiamo effettuato altri 50 ns di simulazione. Già dopo 10 ns l'elica- α C ripristina la sua posizione iniziale, che è quindi mantenuta fino alla fine della simulazione (Figura 17 D).

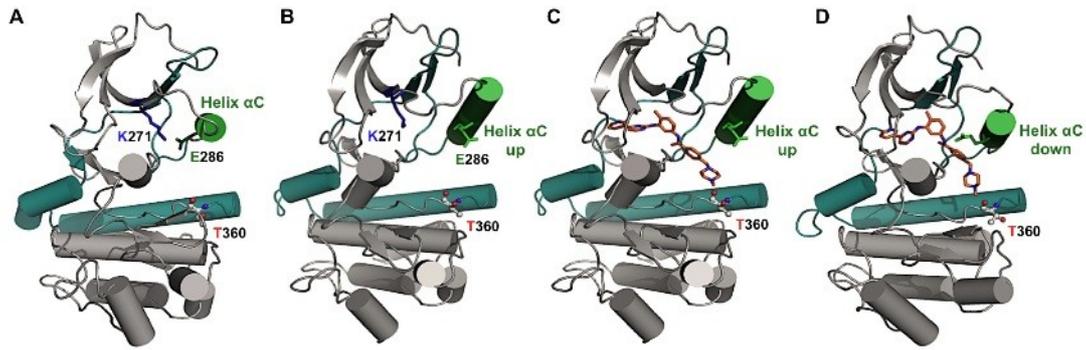


Figura 17: Il legame dell'imatinib stabilizza l'elica- α C di BCR-ABL^{I360T}. Istantanee delle simulazioni di DM del dominio catalitico di BCR-ABL^{I360T} che mostrano la posizione dell'elica- α C (verde) all'inizio (A) e alla fine (B) della simulazione. L'IM è stato quindi inserito all'interno della struttura B (C) e sono stati effettuati altri 50 ns di simulazione (D: struttura finale).

I risultati ottenuti ci permettono di spiegare l'efficacia dell'IM nell'inibizione dell'attività oncogenica di BCR-ABL^{I360T}. Il legame di questo inibitore è, infatti, in grado di favorire lo spostamento dell'elica- α C verso la sua posizione originale, ripristinando una conformazione del dominio catalitico simile a quella di BCR-ABL^{WT}.

Simulazioni di DM di BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} con imatinib, dasatinib e ponatinib contribuiscono a spiegare gli effetti degli inibitori su questi mutanti.

Per stabilire in che modo le mutazioni T315I ed I360T possano influenzare la capacità di legare i TKIs, abbiamo deciso di effettuare simulazioni di DM dei domini catalitici di BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} in complesso con IM, DAS e PON, e li abbiamo paragonati ai risultati ottenuti col dominio *wild type*. Durante l'analisi di queste simulazioni abbiamo valutato le variazioni nel

tempo delle distanze fra ciascun inibitore e i residui con cui forma legami a idrogeno considerando che distanze maggiori di 3.5 Angstrom (Å) indicano legami deboli (Figura 18).

L'IM lega la conformazione inattiva del dominio TK di BCR-ABL, formando legami a idrogeno con i cinque residui E286, T315, M318, I360 e D381. Dall'analisi del complesso fra IM e il dominio TK *wild type* risulta che i cinque legami a idrogeno sono stabili e si mantengono durante i 50 ns di simulazione, con brevi variazioni nella distanza fra IM ed il residuo I360 (linea verde) nel corso della simulazione (Figura 18 A).

Nella simulazione con il mutante T315I, l'IM perde tre legami su cinque con il dominio catalitico: quello con il residuo T315, vista la sostituzione con un'isoleucina; l'interazione con la E286 (linea blu), a causa del parziale svolgimento dell'elica- α C in cui si trova, ed il legame con la I360 (linea verde), visto che la distanza tra IM e questo residuo è superiore a 4 Å durante tutta la simulazione (Figura 18 B).

L'analisi del dominio catalitico di BCR-ABL^{I360T} in complesso con IM ha evidenziato che i legami a idrogeno precedentemente descritti per la proteina *wild type* sono mantenuti anche in questo sistema, ad eccezione dell'interazione con il residuo I360 sostituito da una treonina (Figura 18 C).

Anche in questo caso la distanza tra IM e la E286 aumenta per circa 5 ns (linea blu), a causa dello spostamento dell'elica- α C verso l'alto, descritto in precedenza.

Le stesse analisi sono state effettuate con l'inibitore di 2G DAS, che lega il dominio catalitico di BCR-ABL in conformazione attiva. In questo caso, il DAS forma tre legami a idrogeno con il dominio TK, uno con il residuo T315 e due con il residuo M318. Le nostre analisi hanno mostrato che questi tre legami con il dominio chinamico di BCR-ABL^{WT} sono estremamente stabili durante i 50 ns di simulazione (Figura 18 D).

Nel caso di BCR-ABL^{T315I}, la sostituzione della treonina in posizione 315 con l'isoleucina provoca la perdita di uno dei tre legami, quello che DAS forma con questo residuo mutagenizzato (Figura 18 E). La mutazione del residuo T315, fondamentale per il legame del DAS, contribuisce quindi a spiegare l'inefficacia di questo inibitore nel trattamento di BCR-ABL^{T315I}.

Il DAS non perde alcun legame a idrogeno quando lega il dominio catalitico di BCR-ABL^{I360T} (Figura 18 F). La mutazione conservativa I360T non ha quindi nessun effetto sul legame del DAS con il dominio TK, confermando l'efficacia di questo composto contro BCR-ABL^{I360T}.

Gli studi sinora effettuati sull'inibitore di 3G PON hanno mostrato la sua efficacia nel trattamento di tutte le mutazioni puntiformi del dominio TK di BCR-ABL note in letteratura, compresa la mutazione T315I. PON lega la conformazione inattiva del dominio catalitico di BCR-ABL, stabilendo quattro legami a idrogeno con i residui E286, M318, I360 e D381. Tutti questi legami si mantengono stabili durante la simulazione del complesso fra PON e BCR-

ABL^{WT}, ad eccezione dell'interazione col residuo E286 (linea blu) che risulta variabile durante tutta l'analisi (Figura 18 G).

Poichè PON non forma nessun legame a idrogeno con la T315, la mutazione di questo residuo in isoleucina non genera nessuna variazione nel legame fra il farmaco e il dominio TK di BCR-ABL^{T315I} (Figura 18 H). Queste analisi contribuiscono quindi a spiegare perché il PON è l'unico TKI in grado di inibire in maniera efficace il mutante T315I.

L'analisi del complesso fra PON e BCR-ABL^{I360T} ha rivelato la perdita solo del legame a idrogeno col residuo I360, a causa della sua sostituzione con una treonina (Figura 18 I). In questo caso, però, sembra che la perdita di questa interazione non influisca sul legame del PON col dominio catalitico di questo mutante, vista l'efficacia di questo composto nell'inibire l'attività catalitica di BCR-ABL^{I360T} (Figura 16 C).

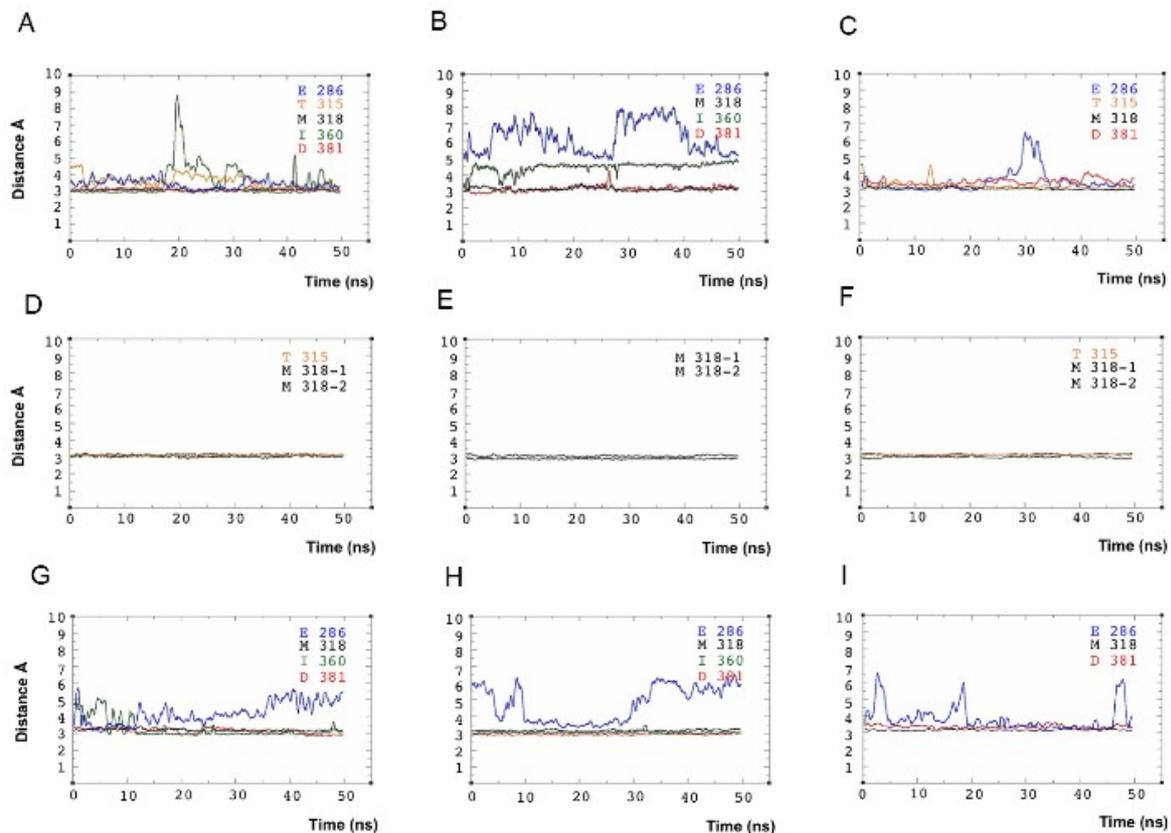


Figura 18: Variazioni nei legami a idrogeno modulano l'efficacia dei TKIs su diversi mutanti di BCR-ABL. Sono state analizzate le variazioni nel tempo delle interazioni tra BCR-ABL^{WT} (A, D, G) BCR-ABL^{T315I} (B, E, H) e BCR-ABL^{I360T} (C, F, I) con gli inibitori indicati (imatinib: A, B, C; dasatinib: D, E, F; ponatinib: G, H, I). I legami a idrogeno sono identificati da colori diversi (E286 blu, T315 arancione, M318 nero, I360 verde e D381 rosso). La distanza massima per identificare un legame a idrogeno molto forte tra inibitori e singoli residui è di 3.5 Angstrom (Å).

In conclusione, l'analisi delle variazioni nel tempo dei legami a idrogeno tra diversi TKIs ed i due mutanti BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} contribuiscono a spiegare l'efficacia o meno di ciascun inibitore su questi mutanti.

I residui di BCR-ABL coinvolti nei legami con i TKIs sono conservati in molteplici tirosin-chinasi umane.

I risultati mostrati sino ad ora hanno evidenziato il ruolo critico dei residui E286, M318 e D381 nel preservare l'attività catalitica e il potenziale

oncogenico di BCR-ABL, e l'influenza del residuo I360. Ci siamo quindi chiesti se questi quattro residui critici, insieme alla T315, fossero conservati anche in altre tirosin chinasi umane.

Abbiamo effettuato un allineamento multiplo dei domini catalitici delle 90 tirosin-chinasi e abbiamo osservato che i cinque residui responsabili delle interazioni con gli inibitori sono conservati in 26 chinasi (Tabella 3). Fra queste abbiamo trovato diverse tirosin-chinasi recettoriali (DDR2, EGFR, EphA2, ErbB2) e non-recettoriali (FGR, LYN, SRC) coinvolte nella patogenesi di diversi tumori solidi o ematologici (Figura 19). Diversamente dagli altri residui, però, l'isoleucina in posizione 360 è sostituita da una valina in circa la metà delle 26 chinasi ma, considerando che questi due amminoacidi possiedono caratteristiche chimico-fisiche simili, la presenza dell'uno o dell'altro non influenza l'attività catalitica del dominio chinasi.

GENE	PROTEINA	FAMIGLIA
ABL	Abelson tyrosine kinase	ABL
BLK	B Lymphocyte Kinase	SRC
BRK	Breast tumor Kinase	SRC
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase	TEC
CSK	C-Src Kinase	CSK
DDR1	Discoidin Domain Receptor 1	DDR
DDR2	Discoidin Domain Receptor 2	DDR
EGFR (ErbB1)	Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR
EphA1	Ephrin type-A receptor 1	EPH
EphA2	Ephrin type-A receptor 2	EPH
EphA3	Ephrin type-A receptor 3	EPH
EphA4	Ephrin type-A receptor 4	EPH
EphA5	Ephrin type-A receptor 5	EPH
EphA8	Ephrin type-A receptor 8	EPH
ErbB2 (HER2)	Human Epidermal growth factor Receptor 2	EGFR
ErbB4 (HER4)	Human Epidermal growth factor Receptor 4	EGFR
FGR	Gardef-Rasheed Feline sarcoma viral oncogene homolog	SRC
FYN	Tyrosine protin kinase Fyn (proto-oncogene)	SRC
HCK	Hematopoietic Cell Kinase	SRC
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase	SRC
LYN	Tyrosine protein kinase Lyn	SRC
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase	SRC
SRM	Tyrosine protein kinase Srm	SRC
TEC	Tyrosine protein kinase Tec	TEC
TXK	Tyrosine protein kinase Txk	TEC
YES	Tyrosine protein kinase Yes	SRC

Tabella 3: I residui E286, T315, M318, I360 e D381 sono conservati in 26 tirosin-chinasi umane.

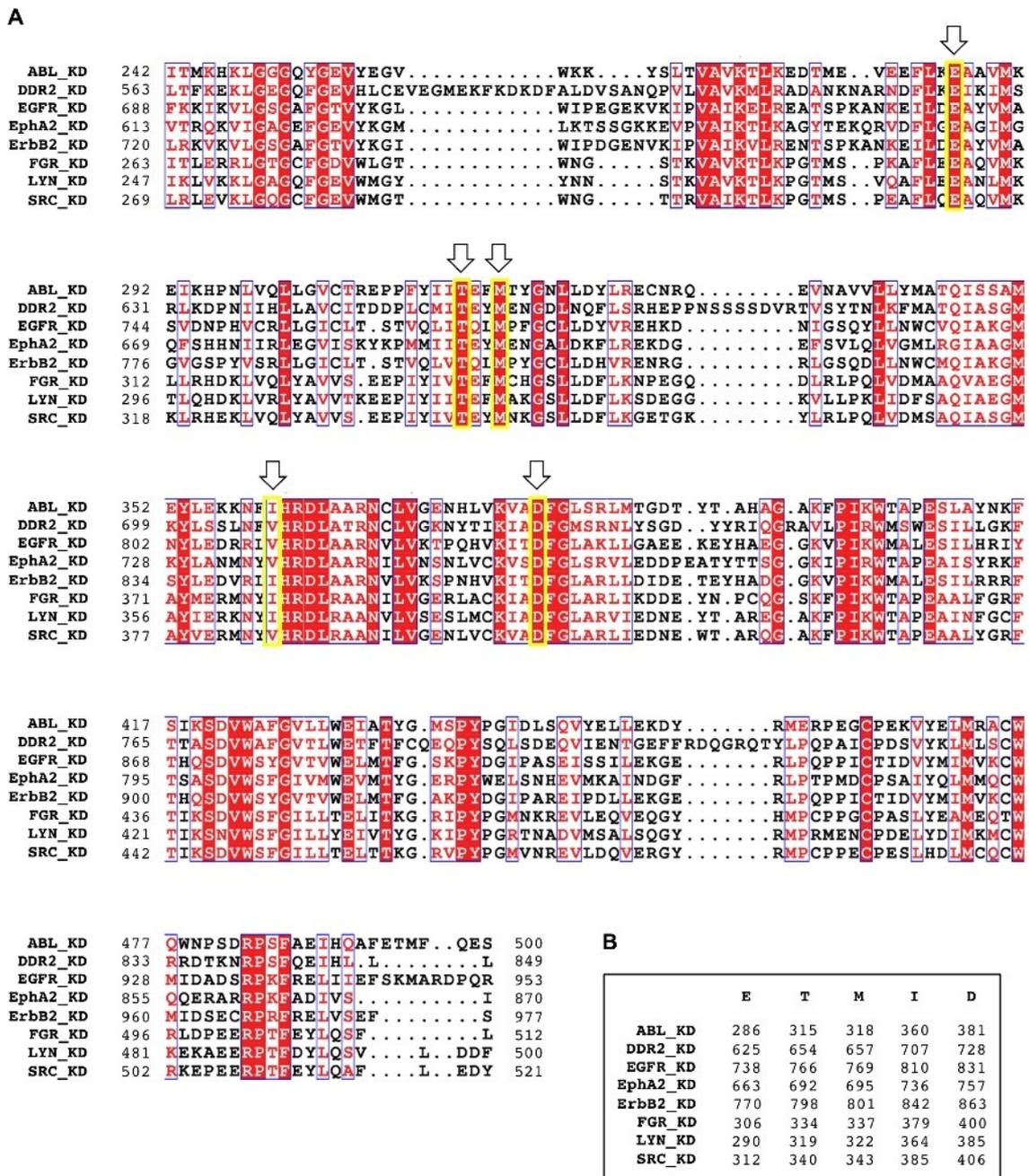


Figura 19: I residui aminoacidici critici per l'attività catalitica di BCR-ABL sono conservati in molteplici tirosin-chinasi umane. Allineamento multiplo dei domini catalitici di diverse famiglie di tirosin-chinasi coinvolte in patologie umane. **A**: I residui evidenziati in rosso sono conservati in tutte le chinasi, mentre i cinque residui identificati per ABL sono evidenziati da una cornice gialla. Gli aminoacidi con caratteristiche chimico-fisiche simili sono scritti in rosso. **B**: Posizione dei cinque residui conservati lungo la sequenza di ciascuna chinasi.

Dal momento che una qualunque sostituzione puntiforme dei residui E286, M318, I360 e D381 di BCR-ABL causa la perdita del suo potenziale oncogenico o comunque mantiene la risposta al trattamento con i TKIs

(I360T), la progettazione di nuovi inibitori che interagiscono con questi residui conservati in altre tirosin-chinasi potrebbe prevenire lo sviluppo di resistenze dovute alla generazione di mutazioni puntiformi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo progetto di ricerca sono stati identificati quattro amminoacidi (E286, M318, I360 e D381) critici per il mantenimento del potenziale oncogenico di BCR-ABL. Infatti, ad eccezione del residuo I360, mutazioni sia conservative che non conservative a livello di questi residui abolisce completamente l'attività catalitica e la capacità trasformante dell'oncoproteina. Inoltre, la ridotta attività chinasi di BCR-ABL^{I360T} è soppressa da tutti gli inibitori delle tirosin-chinasi attualmente disponibili.

Nessuna delle mutazioni puntiformi generate per BCR-ABL è stata in grado di generare un mutante di ABL costitutivamente attivo, neanche la mutazione I360T.

Questi risultati concordano col fatto che, in letteratura, non sono mai state riportate mutazioni che coinvolgano questi quattro residui in pazienti di LMC che sviluppano resistenze agli inibitori. I nostri dati dimostrano che una mutazione a livello di questi residui porterebbe alla selezione negativa del clone sprovvisto di capacità oncogenica (E286, M318, D381) o alla morte della cellula in seguito al trattamento con qualunque TKI (I360T).

Una ulteriore conferma di questi risultati viene dalle analisi mutazionali dei pazienti resistenti agli inibitori effettuate negli ultimi 7 anni dalla sezione di Diagnostica Molecolare del nostro gruppo di ricerca. Su oltre 100 analisi mutazionali del dominio TK di pazienti resistenti ai TKIs, sono state osservate le seguenti mutazioni puntiformi: E286K (in 1 caso), M318T-V-I (in 3

soggetti), I360T-L-S (in 3 malati differenti). Tutte le mutazioni riscontrate erano espresse in percentuale non superiore al 10% dei cloni analizzati. Nessun paziente ha mai evidenziato mutazioni nel residuo D381. Nessuna delle mutazioni evidenziate è stata riscontrata in una seconda analisi mutazionale eseguita sugli stessi pazienti al momento del fallimento di una successiva linea di terapia, dimostrando che sostituzioni che coinvolgono i residui E286, M318 ed I360 non possono contribuire allo sviluppo di resistenza agli inibitori delle tirosin-chinasi.

Le simulazioni di DM dei domini catalitici di BCR-ABL^{T315I} e BCR-ABL^{I360T} in assenza di inibitori hanno contribuito a spiegare le differenze biologiche e strutturali di questi mutanti rispetto a BCR-ABL^{WT}. La mutazione T315I sembra influenzare la dinamica dei due lobi del dominio catalitico che si muovono in maniera indipendente l'uno dall'altro, influenzando la dinamica della tasca di legame per il farmaco situata nel loro punto di giunzione. Anche il parziale svolgimento dell'elica- α C di BCR-ABL^{T315I}, insieme al noto fenomeno dell'ingombro sterico dovuto alla presenza di un'isoleucina in posizione 315 al posto della treonina, contribuisce a spiegare le difficoltà degli inibitori di 1G e 2G nel legarsi al dominio catalitico di questo mutante. Il mutante I360T mostra una maggiore motilità e flessibilità della tasca di legame dell'ATP. Questo risultato, insieme all'allontanamento dell'elica- α C dal sito catalitico di BCR-ABL^{I360T}, potrebbe quindi spiegarne la ridotta attività catalitica rispetto a BCR-ABL^{WT}.

Con i nostri esperimenti, abbiamo anche dimostrato che la ridotta attività catalitica di BCR-ABL^{I360T} è efficientemente soppressa da inibitori di 1G, 2G e 3G. In particolare abbiamo osservato che IM è in grado di ripristinare la posizione originale dell'elica- α C di BCR-ABL^{I360T}, spiegando il motivo strutturale dell'efficacia del farmaco su questo mutante. L'analisi dei legami a idrogeno fra BCR-ABL^{I360T} ed i tre inibitori ha inoltre dimostrato che le interazioni del residuo I360 con IM e PON non sono fondamentali per mantenere la capacità di legame di questi inibitori. Infatti, la perdita dei legami a idrogeno con la I360, in seguito alla sostituzione con una treonina, non influenza la sensibilità del mutante al trattamento con IM e PON, come dimostrato dagli esperimenti di biologia molecolare e di biochimica. Rispetto a BCR-ABL^{WT}, BCR-ABL^{I360T} mantiene tutti i legami idrogeno con l'inibitore di 2G DAS che risulta anch'esso capace di inibire l'attività catalitica di questo mutante.

La mutazione puntiforme T315I è stata la prima sostituzione amminoacidica identificata in pazienti resistenti al trattamento con IM. La resistenza era stata inizialmente attribuita alla generazione di un ingombro sterico, dovuto alla presenza di un'isoleucina che impedisce il posizionamento dell'inibitore nella tasca del dominio catalitico. Le nostre simulazioni di DM hanno però dimostrato che sia IM che DAS sono in grado di inserirsi all'interno della tasca catalitica di BCR-ABL^{T315I}, aggirando l'ingombro sterico causato dalla

catena laterale dell'isoleucina. È quindi probabile che questo fenomeno comprometta solo in minima parte l'efficienza di legame degli inibitori di 1G e 2G.

Mediante le analisi delle variazioni dei legami a idrogeno di BCR-ABL^{T315I} con IM, DAS e, per la prima volta, PON, abbiamo contribuito a spiegare la diversa efficacia dei tre farmaci su questo mutante. La perdita di tre legami a idrogeno con IM (quelli con i residui I315, E286 e I360) rispetto al dominio *wild type* sembra essere determinante per spiegare il fallimento di questo inibitore nei confronti del mutante T315I. Al contrario, la perdita di una sola interazione idrogeno con DAS (I315) non è sufficiente per chiarire i meccanismi strutturali che sottendono l'inefficacia di questo TKI su BCR-ABL^{T315I}. E' quindi probabile che altri fattori, quali la perdita di interazioni idrofobiche con altri residui del dominio catalitico, contribuiscano ad inibire il legame del mutante T315I con DAS. Infine, l'analisi dei legami a idrogeno fra BCR-ABL^{T315I} e il PON ha mostrato un profilo simile a quello del dominio *wild type*, confermando l'efficacia di questo inibitore nell'inibizione del mutante T315I.

In questo progetto di ricerca sono state svolte, per la prima volta, simulazioni di DM del dominio TK di BCR-ABL con l'inibitore di terza generazione PON. I nostri risultati hanno evidenziato tre parametri che caratterizzano l'interazione tra PON e BCR-ABL^{T315I}: 1) il linker etilico del farmaco gli consente di aggirare l'ingombro sterico all'interno della tasca catalitica di BCR-ABL^{T315I}; 2) diversamente dall'IM, il PON non forma un legame a idrogeno forte col

residuo E286. Quindi, la dislocazione di questo residuo, in seguito alla destabilizzazione dell'elica- α C in cui si trova, non influenza il legame dell'inibitore; 3) il PON mantiene col mutante T315I, gli stessi legami a idrogeno di BCR-ABL^{WT}. Possiamo quindi concludere che il PON sembra modificare la dinamica del mutante T315I "ripristinando" condizioni simili a quelle della proteina *wild type*.

Ad eccezione dell'amminoacido I360, i residui E286, M318 e D381 di BCR-ABL non possono subire sostituzioni amminoacidiche poiché queste esiterebbero nella perdita del potenziale oncogenico della proteina. La progettazione di un inibitore che interagisca in maniera specifica con questi residui potrebbe, quindi, prevenire lo sviluppo di resistenze dovute alla generazione di mutazioni puntiformi. Fortunatamente, per i pazienti di LMC esiste già un inibitore di questo genere, ovvero il PON. L'allineamento multiplo dei domini catalitici delle tirosin-chinasi umane ha però evidenziato che questi quattro residui (in particolare E286, M318 e D381) sono conservati in molteplici chinasi coinvolte nella patogenesi di tumori solidi ed ematologici. Questi risultati possono quindi contribuire alla generazione di inibitori efficaci contro queste chinasi che interagiscano in maniera specifica con questi residui conservati, riuscendo a prevenire la comparsa di meccanismi di resistenza al trattamento farmacologico dovuti alla generazione di mutazioni puntiformi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340:1330-40.
2. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med*. 1977;63:125-30.
3. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;110:2-11.
4. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 1988;319:990-8.
5. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*. 2002;100:1628-33.
6. Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*. 1987;83:445-54.
7. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103:4010-22.
8. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3.
9. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
10. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:164-72.
11. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001;61:2343-55.
12. Saglio G, Pane F, Martinelli G, Guerrasio A. BCR/ABL rearrangement and leukemia phenotype. *Leukemia*. 1999;13 Suppl 1:S96.
13. Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, Canaani E, Gale RP, Drezzen O, et al. A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. *Nature*. 1987;330:386-8.
14. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-56.

15. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:33-44.
16. Hernandez SE, Krishnaswami M, Miller AL, Koleske AJ. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol.* 2004;14:36-44.
17. Yuan ZM, Utsugisawa T, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Kharbanda S, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by c-Abl in the genotoxic stress response. *J Biol Chem.* 1997;272:23485-8.
18. Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 2000;19:5643-50.
19. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med.* 2001;7:228-34.
20. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 2004;18:189-218.
21. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451-64.
22. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:172-83.
23. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5531-41.
24. Laneuville P, Sun G, Timm M, Vekemans M. Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. *Blood.* 1992;80:1788-97.
25. Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell.* 2002;108:247-59.
26. Buffa P, Manzella L, Consoli ML, Messina A, Vigneri P. Modelling of the ABL and ARG proteins predicts two functionally critical regions that are natively unfolded. *Proteins.* 2007;67:1-11.
27. Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell.* 2003;112:859-71.
28. Brasher BB, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem.* 2000;275:35631-7.

29. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-42.
30. Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Floersheimer A, Furet P, Liebetanz J, Rummel G, et al. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007;63:80-93.
31. Djaldetti M, Padeh B, Pinkhas J, De Vries A. Prolonged remission in chronic myeloid leukemia after one course of busulfan. *Blood*. 1966;27:103-9.
32. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994;84:4064-77.
33. Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R, Trujillo JM, Gutterman JU. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann Intern Med*. 1991;114:532-8.
34. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003;138:819-30.
35. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Annu Rev Med*. 2002;53:369-81.
36. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-6.
37. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev*. 2003;55:401-23.
38. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8:1018-29.
39. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16:2190-6.
40. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006;20:1767-73.
41. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase

- inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2:117-25.
42. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102:276-83.
 43. Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther*. 2007;29:2289-308.
 44. Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, Lipton JH, Apperley JF, Druker BJ, et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*. 2007;109:2303-9.
 45. Bradeen HA, Eide CA, O'Hare T, Johnson KJ, Willis SG, Lee FY, et al. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood*. 2006;108:2332-8.
 46. Maekawa T, Ashihara E, Kimura S. The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Int J Clin Oncol*. 2007;12:327-40.
 47. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-80.
 48. Gibbons DL, Prichard S, Kantarjian H, Cortes J, Quintas-Cardama A. The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm. *Cancer*. 2012;118:293-9.
 49. Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Thomas M, Keats J, et al. Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des*. 2011;77:1-11.
 50. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009;16:401-12.
 51. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002;62:4236-43.
 52. Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, et al. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain

- elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006;66:5790-7.
53. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Jr., Brice MD, Rodgers JR, et al. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol.* 1977;112:535-42.
 54. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234:779-815.
 55. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;26:1701-18.
 56. Sorin EJ, Pande VS. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophys J.* 2005;88:2472-93.
 57. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.* 2006;65:712-25.
 58. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem.* 2004;25:1157-74.
 59. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J Comput Chem.* 2002;23:1623-41.
 60. Pandini A, Fornili A, Fraternali F, Kleijnung J. Detection of allosteric signal transmission by information-theoretic analysis of protein dynamics. *FASEB J.* 2012;26:868-81.
 61. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 1983;22:2577-637.
 62. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14:33-8, 27-8.
 63. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000;302:205-17.
 64. Gouet P, Robert X, Courcelle E. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3320-3.
 65. Jura N, Zhang X, Endres NF, Seeliger MA, Schindler T, Kuriyan J. Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Mol Cell.* 2011;42:9-22.

66. Lee TS, Potts SJ, Kantarjian H, Cortes J, Giles F, Albitar M. Molecular basis explanation for imatinib resistance of BCR-ABL due to T315I and P-loop mutations from molecular dynamics simulations. *Cancer*. 2008;112:1744-53.
67. Pricl S, Fermeiglia M, Ferrone M, Tamborini E. T315I-mutated Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia and imatinib: insights from a computational study. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:1167-74.
68. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, et al. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Cancer*. 2002;38 Suppl 5:S19-27.
69. Saad F, Lipton A. SRC kinase inhibition: targeting bone metastases and tumor growth in prostate and breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2010;36:177-84.
70. Kim HS, Han HD, Armaiz-Pena GN, Stone RL, Nam EJ, Lee JW, et al. Functional roles of Src and Fgr in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17:1713-21.
71. Dos Santos C, Demur C, Bardet V, Prade-Houdellier N, Payrastre B, Recher C. A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:2269-79.
72. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4227s-32s.
73. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000;19:6102-14.
74. Wykosky J, Debinski W. The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1795-806.
75. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2011;1:78-89.
76. Zhou T, Parillon L, Li F, Wang Y, Keats J, Lamore S, et al. Crystal structure of the T315I mutant of Abl kinase. *Chem Biol Drug Des*. 2007;70:171-81.