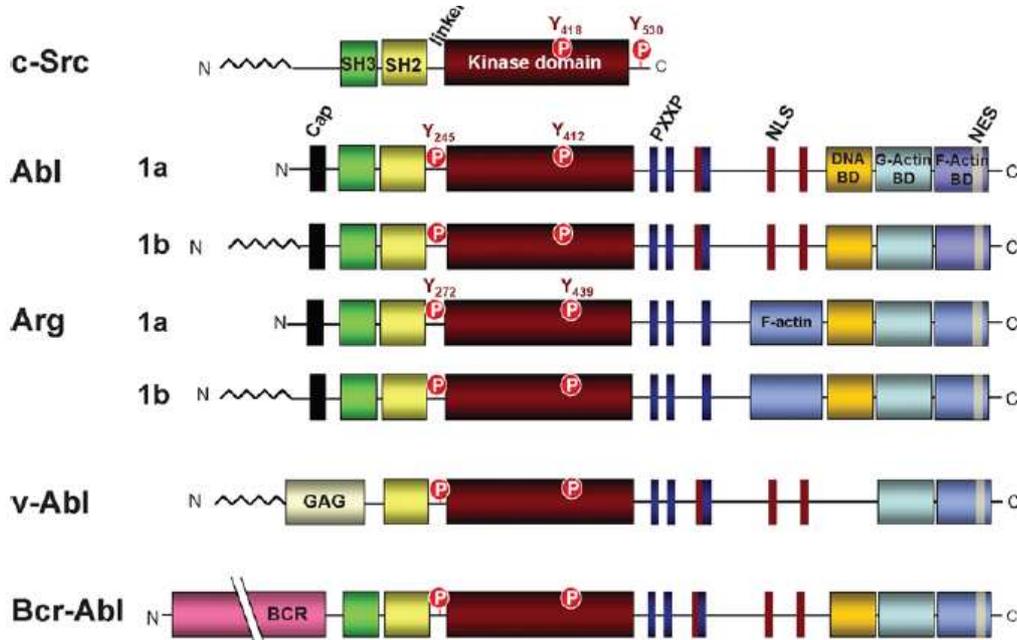


La famiglia Abl consiste di due isoforme Abl (1a e 1b) e due isoforme Arg (1a e 1b). Le isoforme di tipo b contengono un sito di miristoilazione all’N-terminale che manca nelle isoforme a.

c-Abl è una tirosin-chinasi non recettoriale ubiquitariamente espressa nelle cellule e coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro e nella risposta al danno al DNA e allo stress ossidativo.



STRUTTURA: SH1, SH2, SH3. Essa scambia tra citoplasma e nucleo, processo regolato da tre segnali di localizzazione nucleare (NLS) e 1 segnale di esporto nucleare (NES). A valle di essi le protein Abl contengono domini per il legame alle componenti del citoscheletro (F-actina, G-actina e microtubuli) e al DNA.

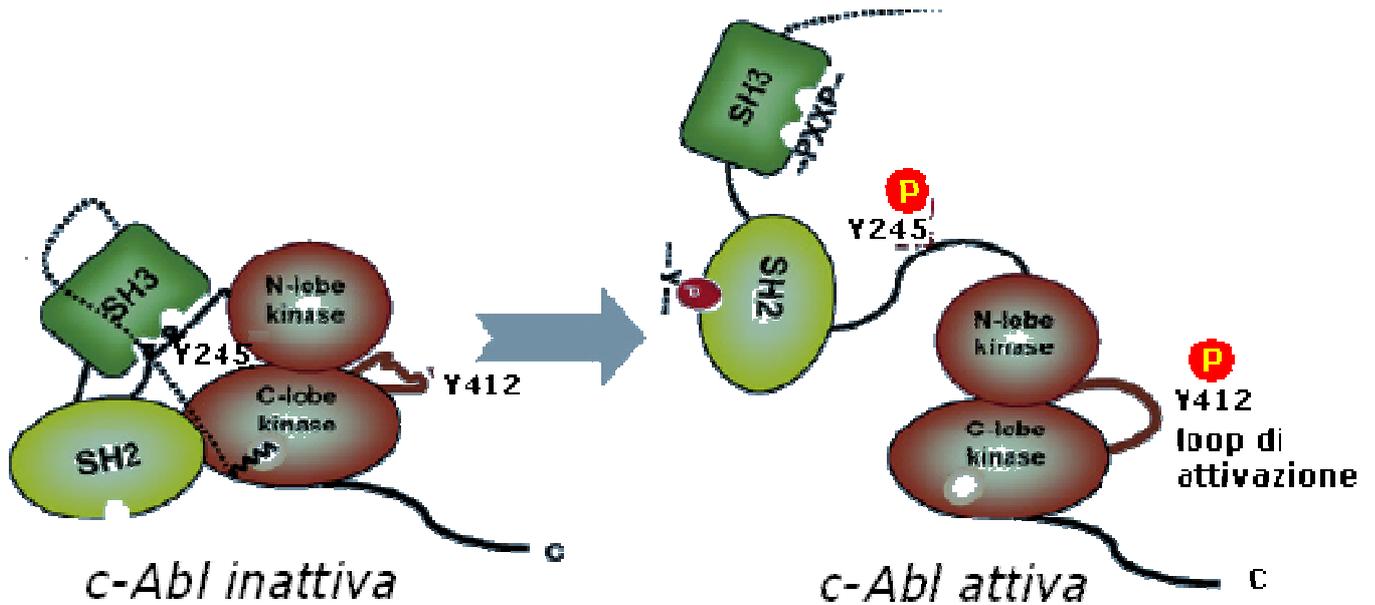


FIGURA 1. c-Abl è regolata da interazioni intramolecolari che mantengono il dominio chinasi in una conformazione chiusa e inattiva. Questa conformazione coinvolge le interazioni tra il dominio SH3 e la sequenza ricca in prolina presente nel dominio SH2-linker. Inoltre la regolazione negativa di c-Abl implica le interazioni che coinvolgono il dominio SH2, il sito di miristoilazione e la regione Cap. Inoltre l'attività di c-Abl dipende dalla sua fosforilazione. L'analisi fosfo-proteomica ha identificato almeno 12 siti di fosforilazione al sito N-terminale di c-Abl coinvolti nella sua attivazione. La fosforilazione in tirosina di c-Abl avviene in trans e viene riferita come "auto fosforilazione". C-Abl è anche fosforilata dalle chinasi SRC e da recettori tirosin-chinasi (PDGFr). La fosforilazione in Tyr245 nel dominio SH2-linker e in Tyr412 nel dominio chinasi correla con con l'attivazione enzimatica. Il gruppo miristoil attaccato alla glicina del N-terminale, la sequenza , SH2 e SH3 stabilizzano c-Abl nella conformazione inattiva.

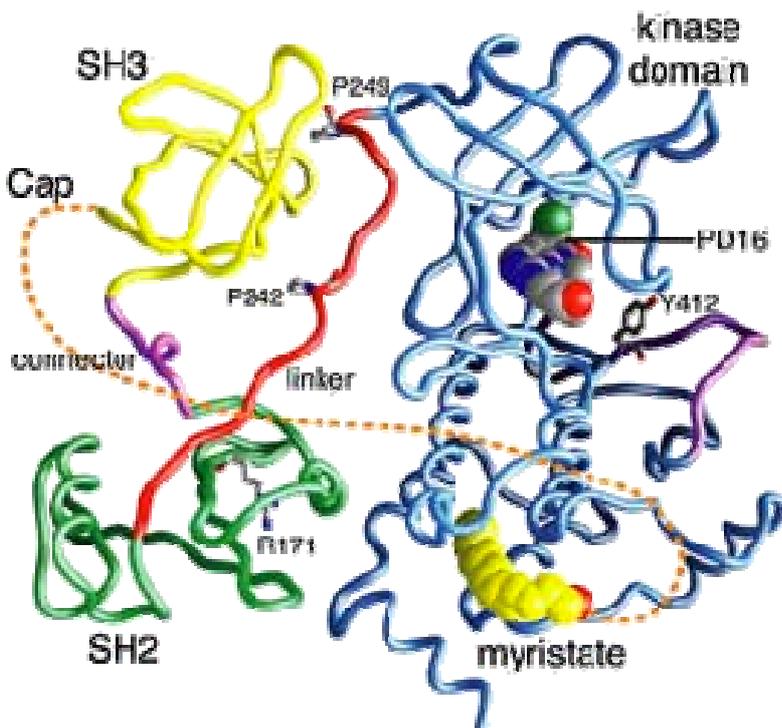
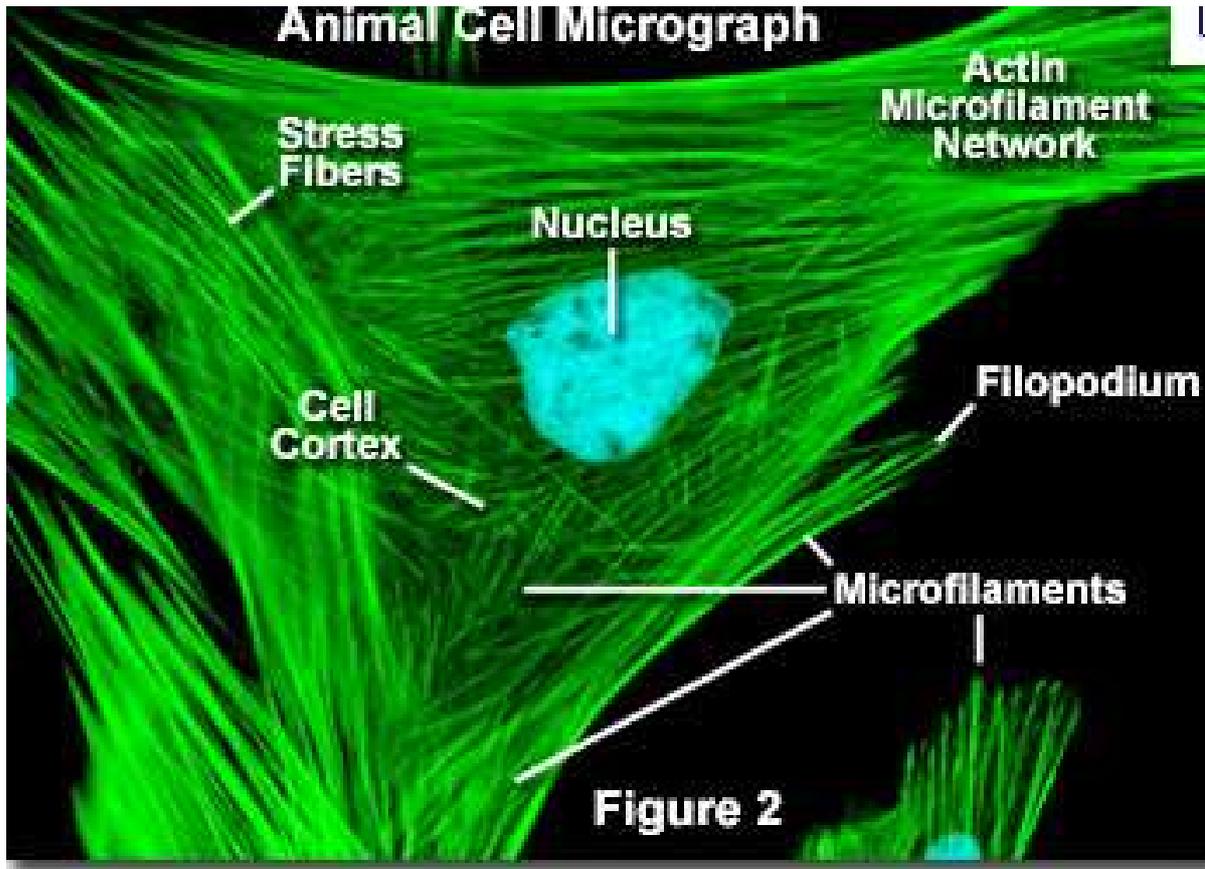


FIGURA 2. Le Abl interactor proteins ABI1 e ABI2 legano il i motivi PxxP al dominio C di c-Abl e ne influenzano negativamente l'attivazione attraverso meccanismi non ancora ben precisati.



c-Abl lega la actina filamentosa attraverso un dominio (F-actin-binding domain) al terminale C e regola le strutture di F-actina nel citoscheletro, promuovendo il ruffling della membrana, la formazione di filipodi, l'estensione dei neuriti e la migrazione cellulare. L'attività catalitica di c-Abl è necessaria per il suo effetto sulle fibre di F-actina. La sua attività chinasi è aumentata da segnali che stimolano il riarrangiamento della F-actina, inclusi le proteine della matrice extracellulare (fibronectina) e i recettori dei fattori di crescita (PDGF). C-Abl localizza a varie strutture di F-actina, inclusi gli pseudopodi, i lamellipodi, i filopodi e i siti di adesione focale promuovendo la formazione delle adesioni intercellulari (strutture complesse che collegano i recettori delle caderine all'actina e anche ingaggiano segnali attivati dall'adesione). La formazione delle giunzioni aderenti è regolata dalla famiglia Rho delle GTPasi, Rho e Rac. C-Abl è necessaria per la massima attivazione di Rac. Essa è mediata dalla attivazione di una SRC chinasi, CRK, la cui fosforilazione da parte di c-Abl attiva Rac e porta ad un aumentato reclutamento di Rac ai nascenti contatti cellula-cellula. In conclusione, c-Abl riduce il grado di migrazione delle cellule, promuovendo la formazione e la persistenza delle strutture di F-actina e filipodi.

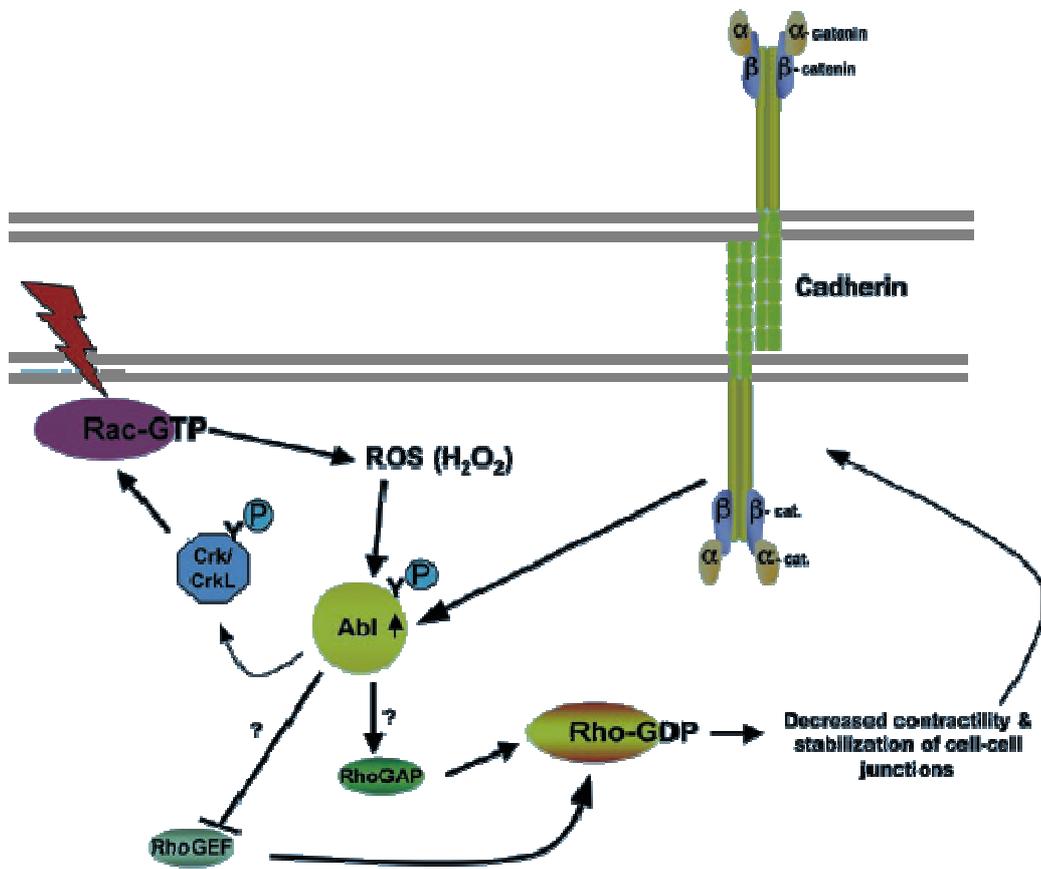
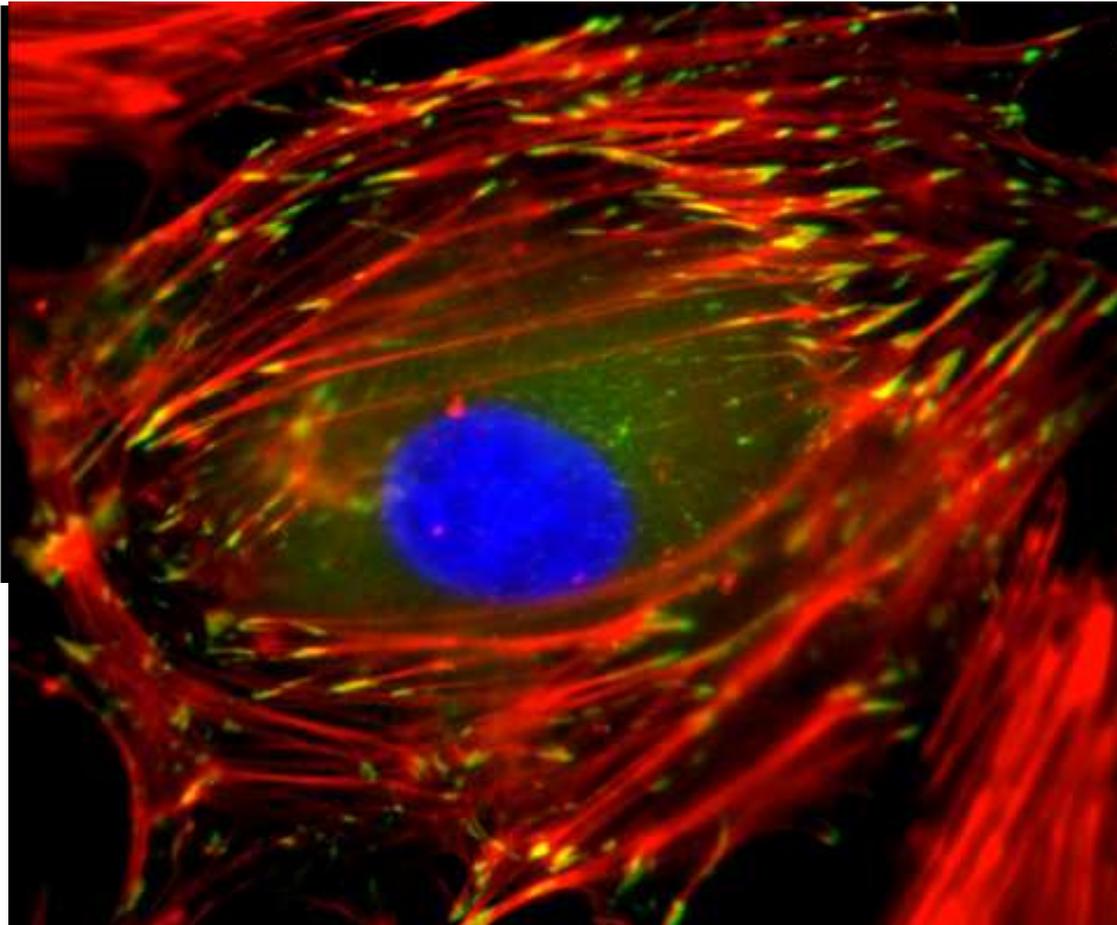


FIGURE 3-6. Paradossalmente alti livelli di attività chinasica di c-Abl sono stati riportati nel tumore metastatico della mammella, indicando che l'asse c-Abl-CRK-Rac può avere un duplice ruolo.

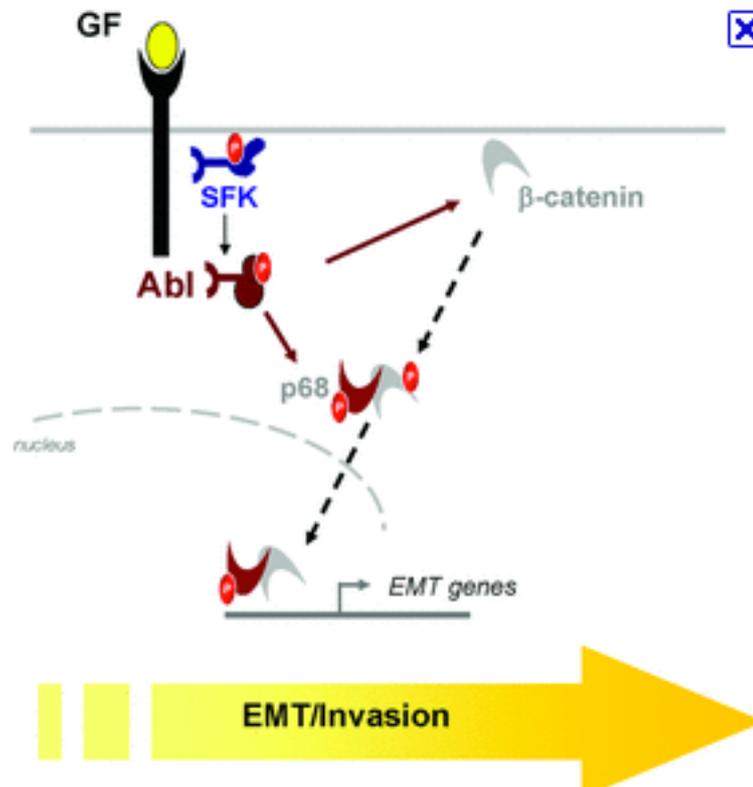


FIGURA 7.

In condizioni normali c-Abl è inattivo e sequestrato nel citoplasma dal legame alle proteine 14-3-3. In risposta al danno al DNA c-Abl viene liberato dal legame con 14-3-3 da JNK, che fosforila 14-3-3 al sito di legame con c-Abl, permettendo il suo importato nucleare. Nel nucleo c-Abl è attivato da ATM attraverso la fosforilazione in Ser465.

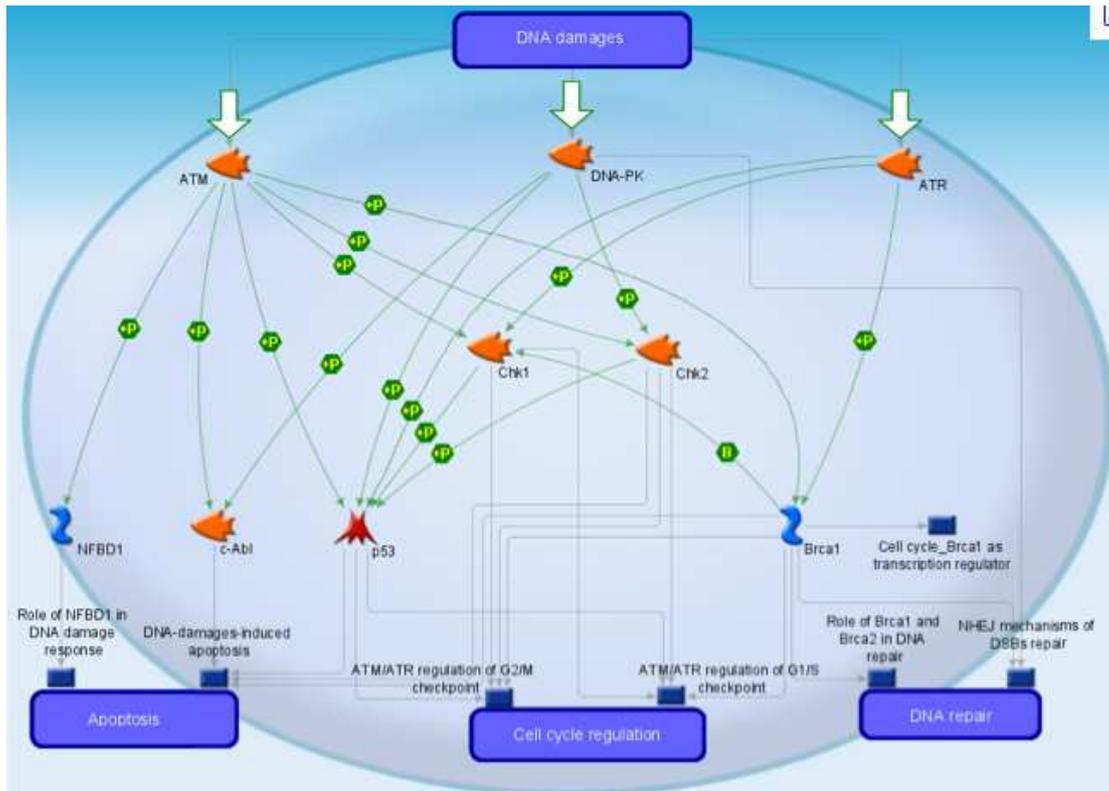
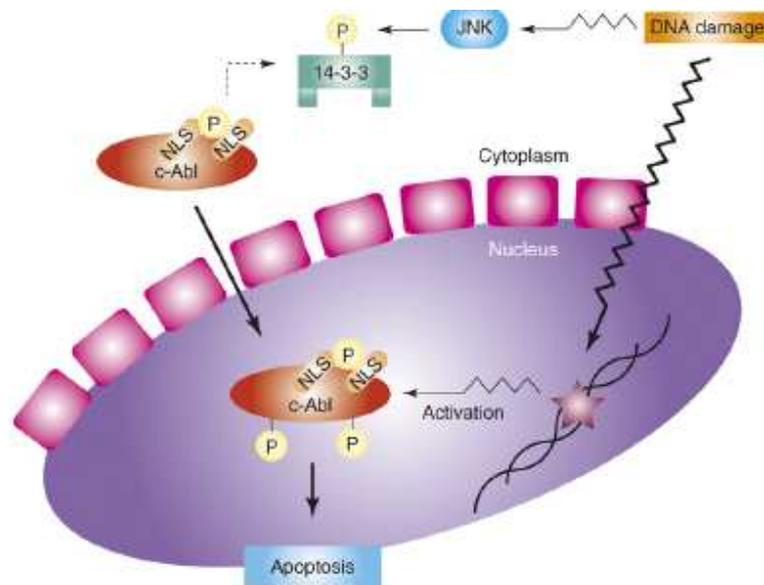


FIGURA 8,9.

Una volta attivato c-Abl influenza l'attività di p53 in modo indiretto, causando la fosforilazione di MDM2 in Tir394 e riducendo la degradazione ubiquitino-dipendente di p53.



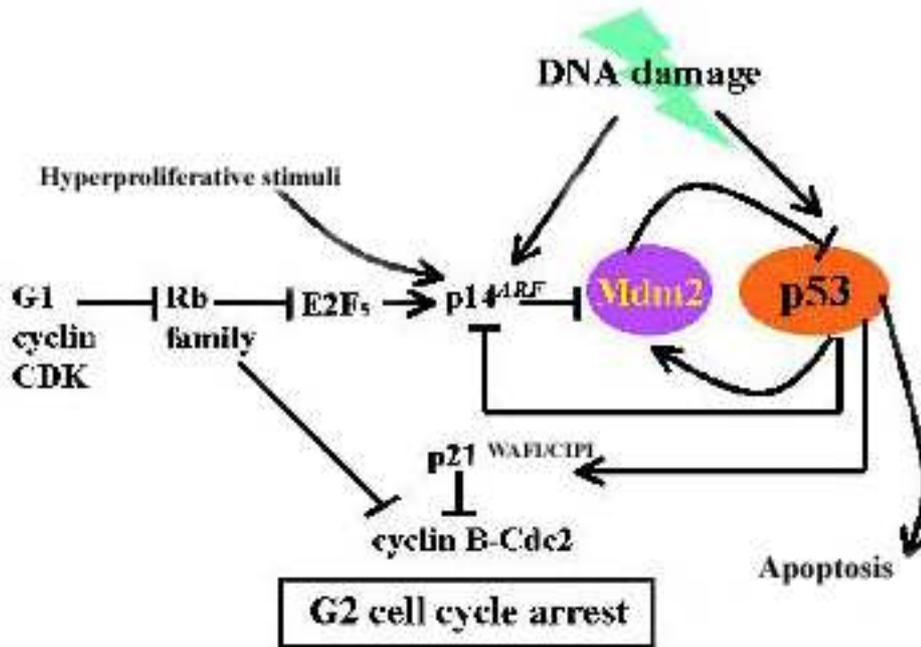


FIGURA 10. La sua interazione con il paralogo di p53, p73, è invece diretta. In risposta al danno genotossico c-Abl fosforila p73 in Tir99 promuovendo il suo accumulo e l'induzione di geni proapoptotici attivandone la trascrizione da promotori contenenti elementi p53-responsivi.

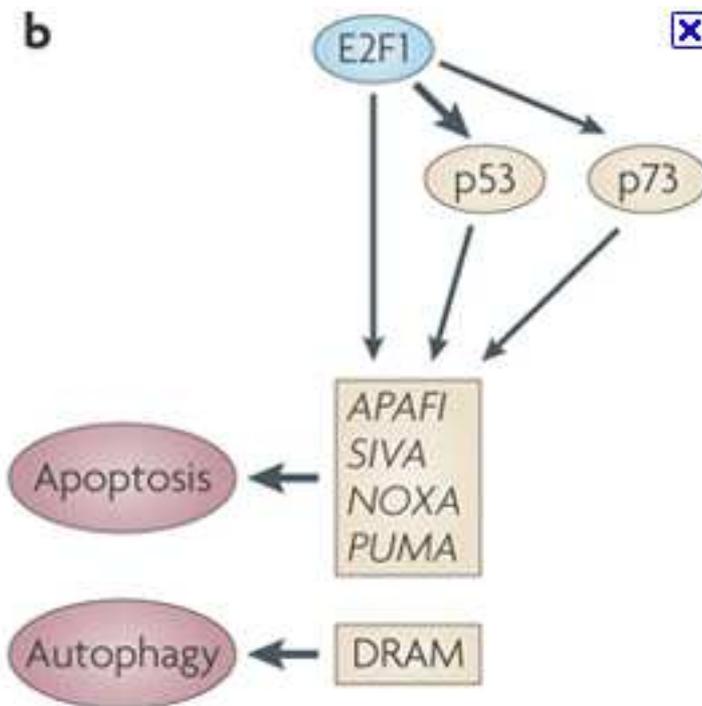


FIGURA 11. L’acetilazione di p73 promossa da p300 e dipendente dalla fosforilazione da parte di c-Abl induce l’associazione con la propil isomerasi Pin1 che regola la trascrizione di numerosi geni.

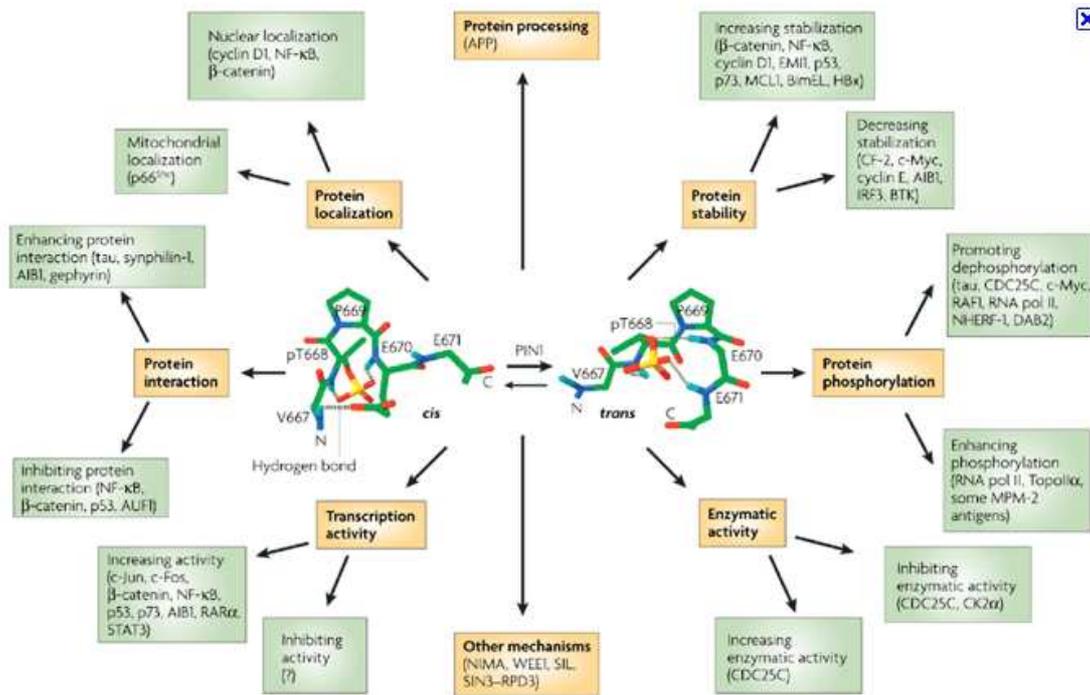


FIGURA 12. Un altro importante attore del circuito c-Abl-p73 è Yap1 (Yes-associated protein), un coattivatore trascrizionale e uno stabilizzatore di p73 (l’interazione tra le due proteine salvaguarda p73 dalla degradazione ubiquitino-dipendente). La fosforilazione di Yap1 in Tir357da parte di c-Abl ne promuove la stabilizzazione, il legame ad p73 a più alta affinità il reclutamento al promotore di BAX.

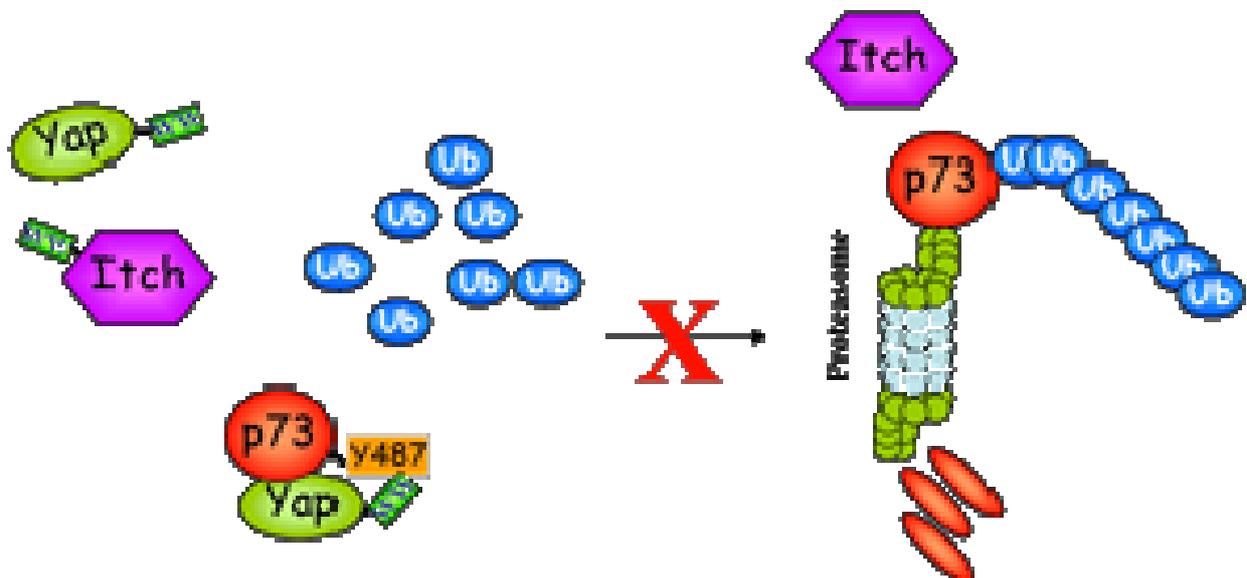


FIGURE 13,14. C_abl promuove infine lo stress del reticolo endoplasmico e comunica il segnale al mitocondrio.

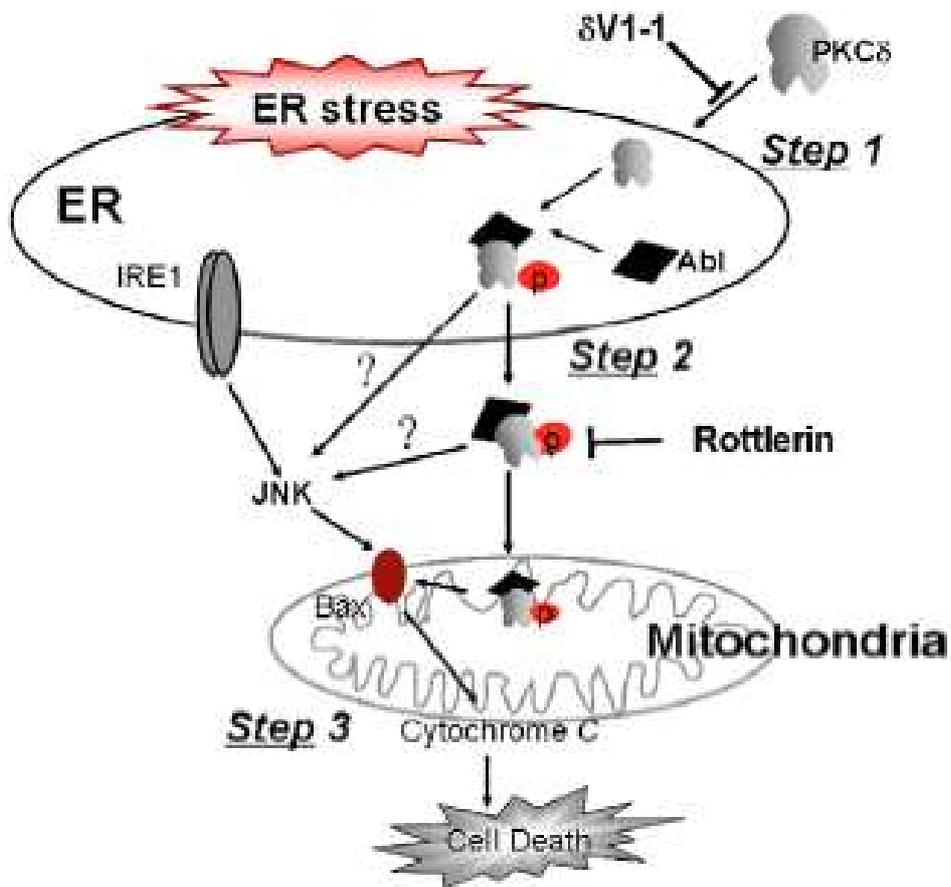
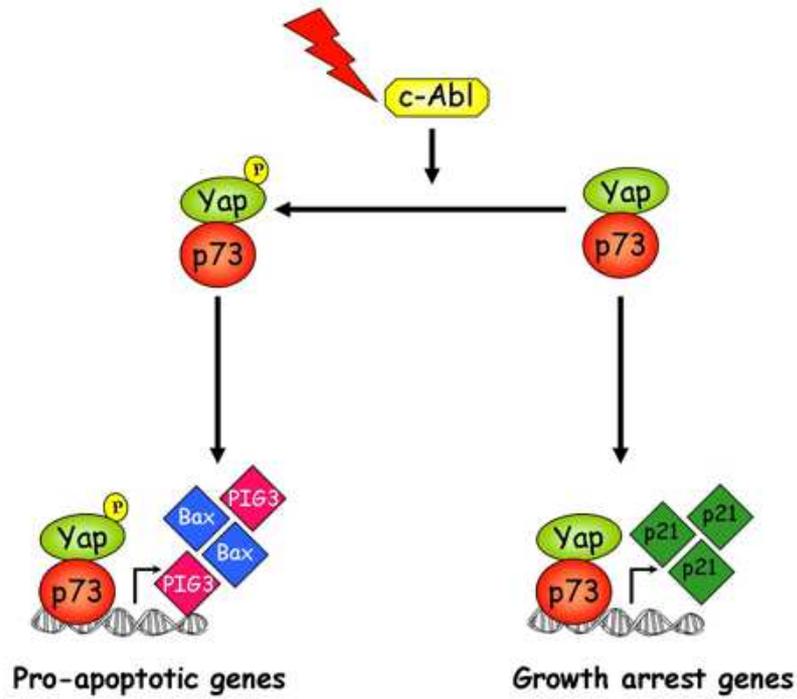
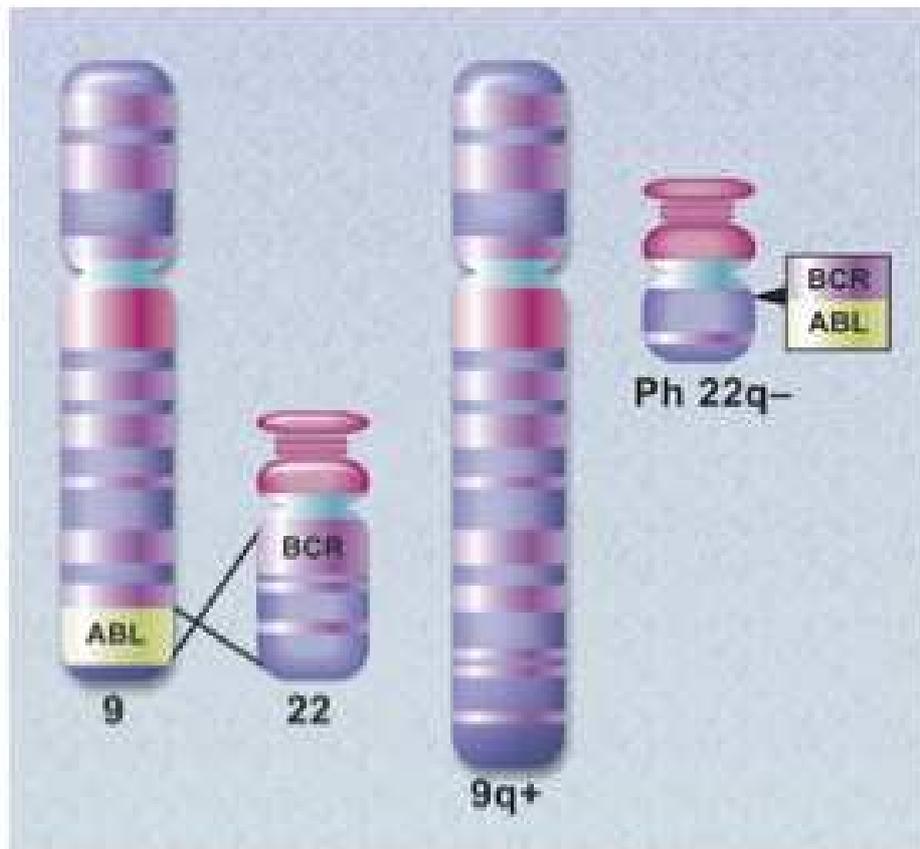


FIGURE 15,16.

LMC è una malattia piuttosto rara (1,2/100.000/anno), prevalente nell'età adulta o anziana e caratterizzata da un lungo decorso. La fase cronica della malattia è caratterizzata da un eccesso di cellule mieloidi che differenziano e funzionano normalmente. Storicamente in un tempo medio di 5 o 6 anni essa evolve in una leucemia acuta mieloide o linfoide, detta crisi blastica, caratterizzata dall'evoluzione clonale ad un fenotipo francamente trasformato. Con le terapie attualmente disponibili la sopravvivenza media può tuttavia estendersi a più di 10 anni e alcuni pazienti potrebbero non andare mai incontro a progressione né morire di leucemia. Alcune ragioni ne fanno un paradigma nella ricerca e nella terapia del cancro. In prima istanza la malattia è causata da un'unica lesione genetica: il gene di fusione Bcr-Abl originato dalla traslocazione reciproca delle braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22 che giustappone il proto-oncogene c-Abl sul cromosoma 9 alla regione Bcr sul cromosoma 22



(FIGURA 17). E' del 1990 la dimostrazione che la sola espressione di Bcr-Abl è in grado di riprodurre la malattia in modelli animali, dunque stabilendo che Bcr-Abl è un oncogene leucemogeno. La capacità trasformante di Bcr-Abl è dovuta alla costitutiva attività tirosin-chinasica del suo prodotto, variabile in termini di peso molecolare (210 o 185 kDa) in funzione del sito di rottura sul gene Bcr

(FIGURA 18). In conseguenza della sua esclusiva localizzazione citoplasmatica i prodotti di Bcr-Abl interagiscono con una pletera di substrati coinvolti nella trasduzione del segnale.

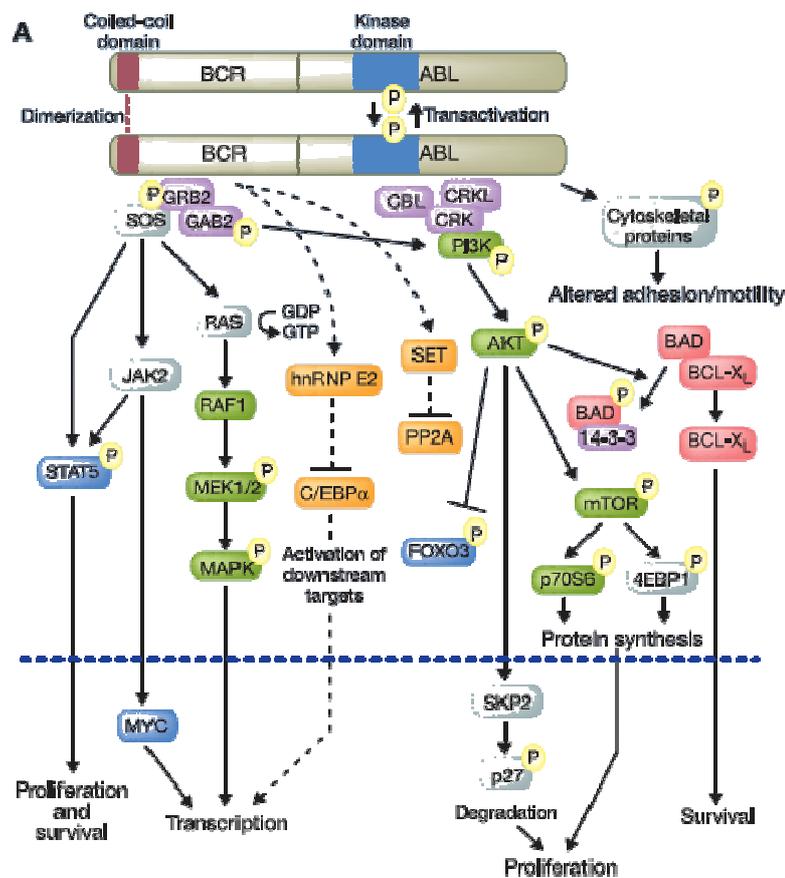
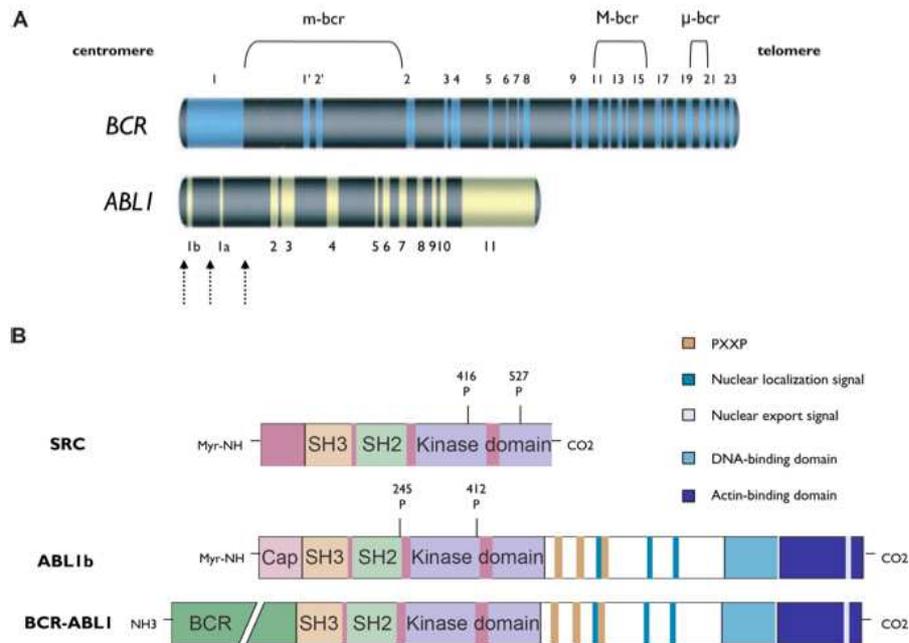
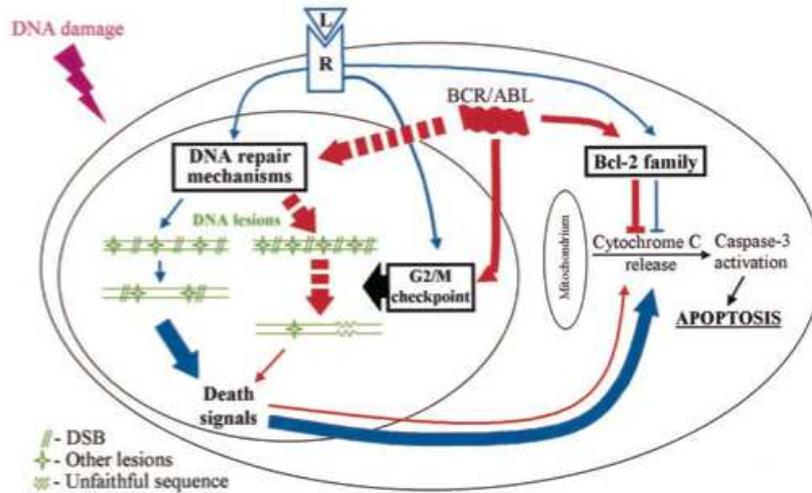


FIGURA 19. Questi segnali determinano la disregolata proliferazione e la prolungata sopravvivenza dei progenitori clonali



(FIGURA 20).

La LMC è classicamente descritta come una malattia bifasica. Esordisce con l'abnorme espansione di una popolazione che mantiene intatte le capacità differenziative (della durara di 3-5 anni) ed evolve alla fase terminale, la crisi blastica, caratterizzata da un fenotipo francamente trasformato.

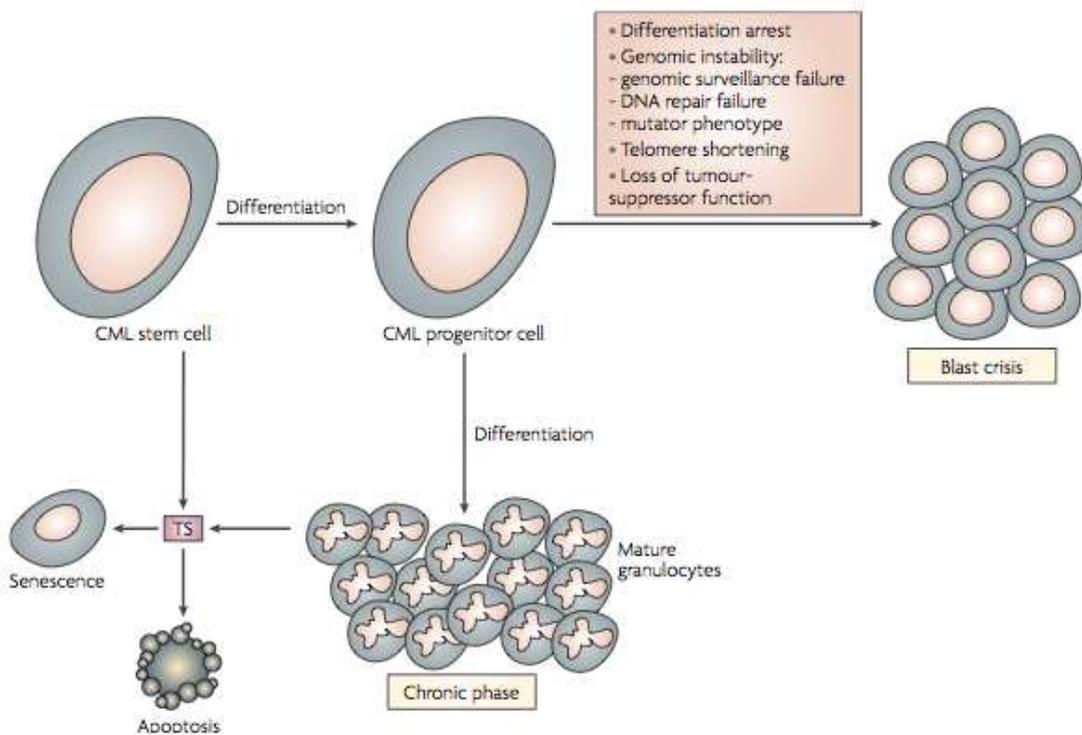


FIGURA 21. La costitutiva attività tirosin-chinasica del prodotto di Abl riarrangiato a Bcr è dunque coinvolta nel “mutator phenotype” che guida la evoluzione della LMC. Invero , la sua espressione è associata a difetti molteplici della DNA riparazione.

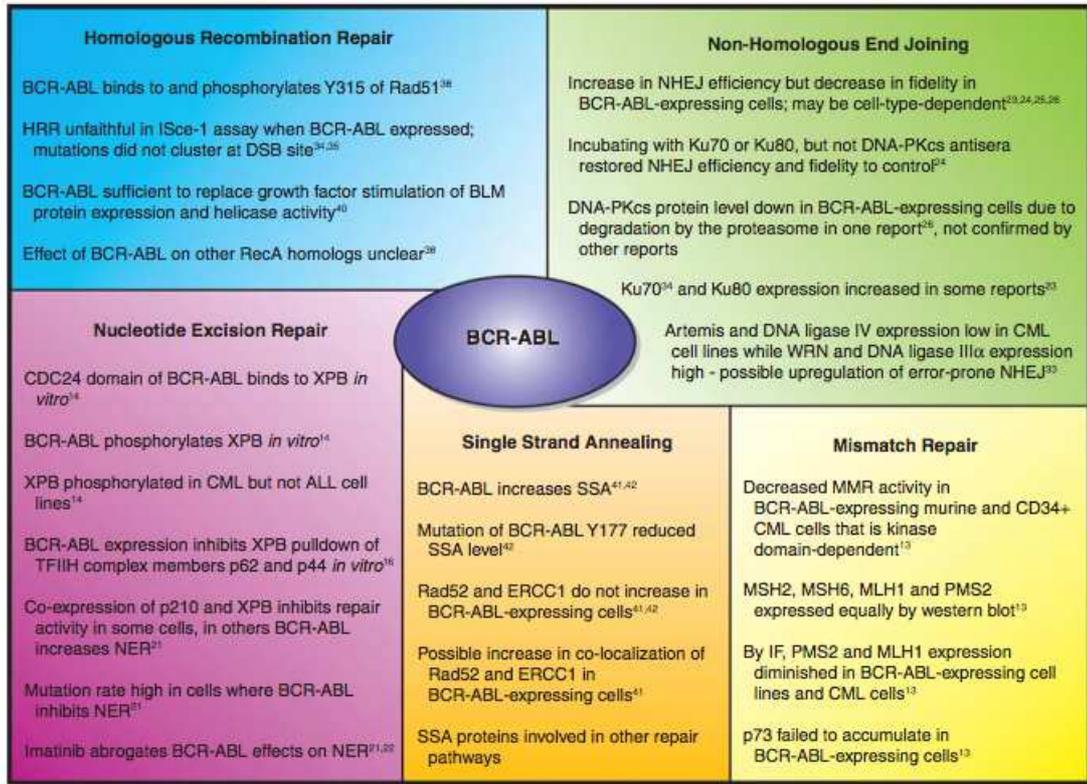


FIGURA 22. In particolare il suo effetto sulla riparazione delle rotture a doppio filamento (DSB) attraverso la ricombinazione non omologa (NHEJ) può essere la sorgente delle lesioni genomiche aggiuntive che scandiscono l’evoluzione della malattia.

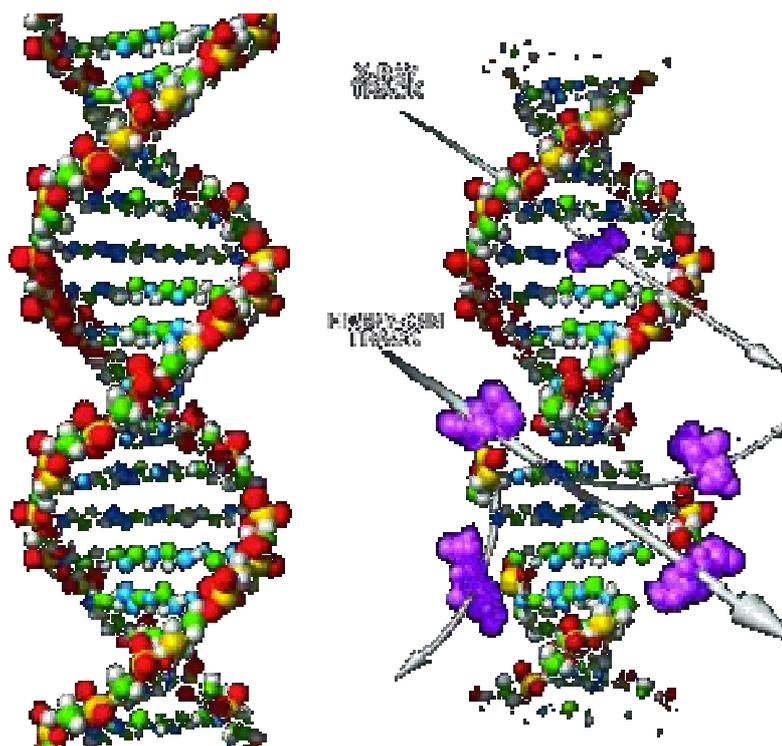
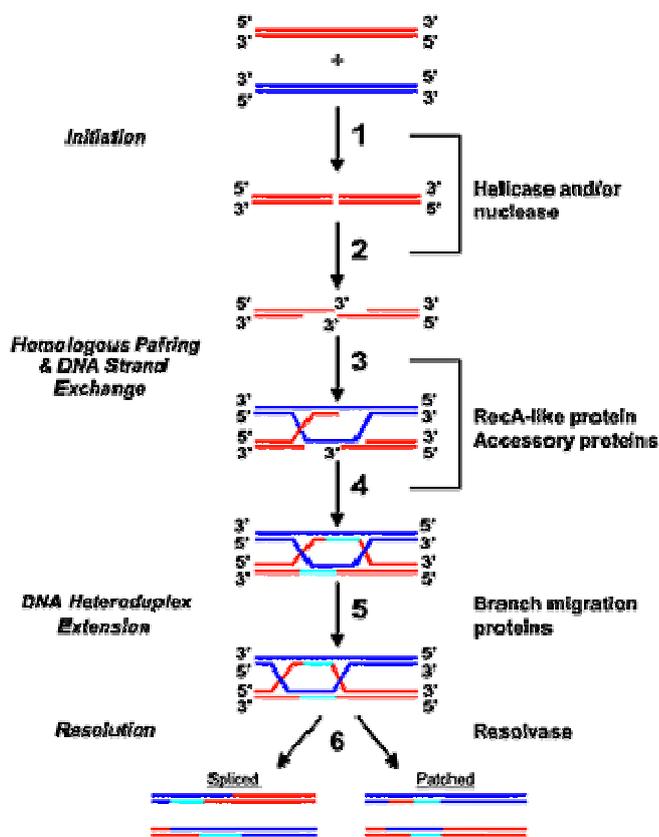
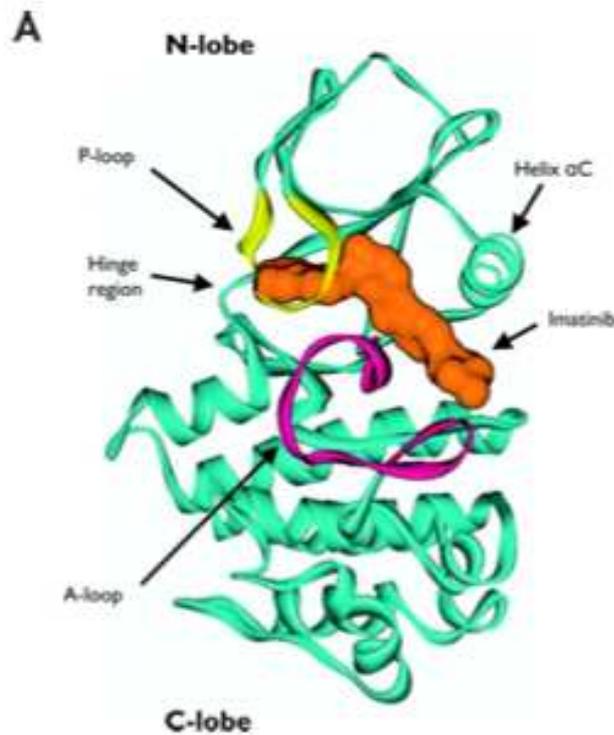
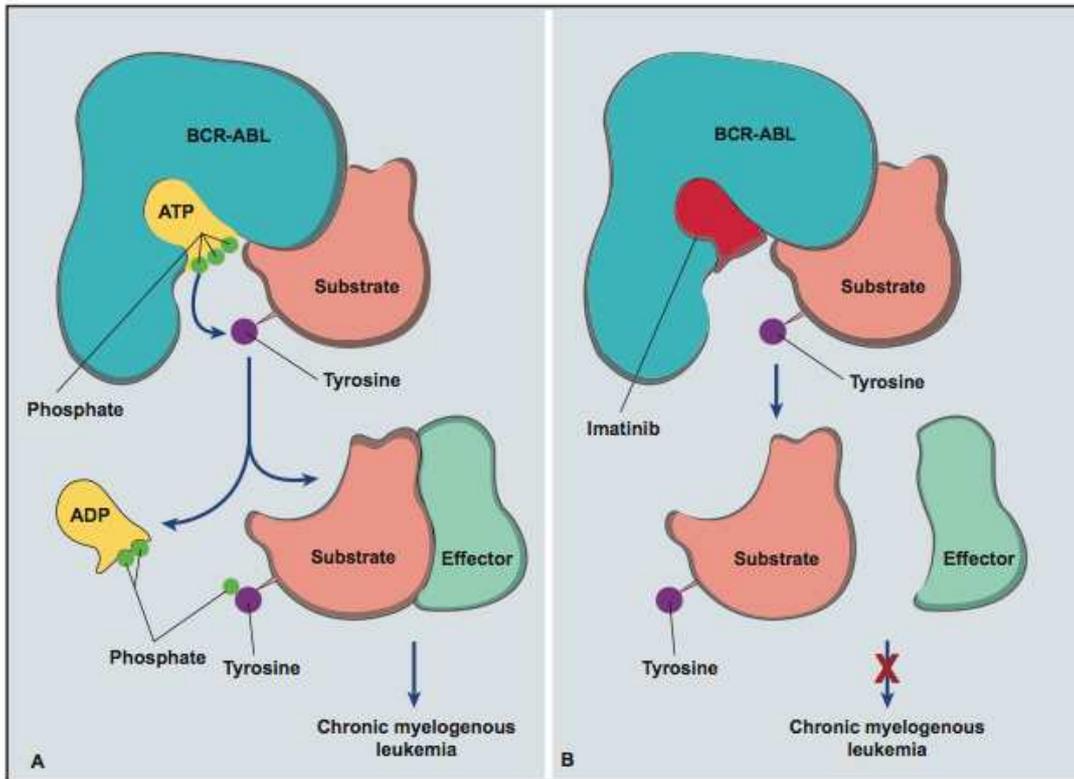


FIGURA 23.

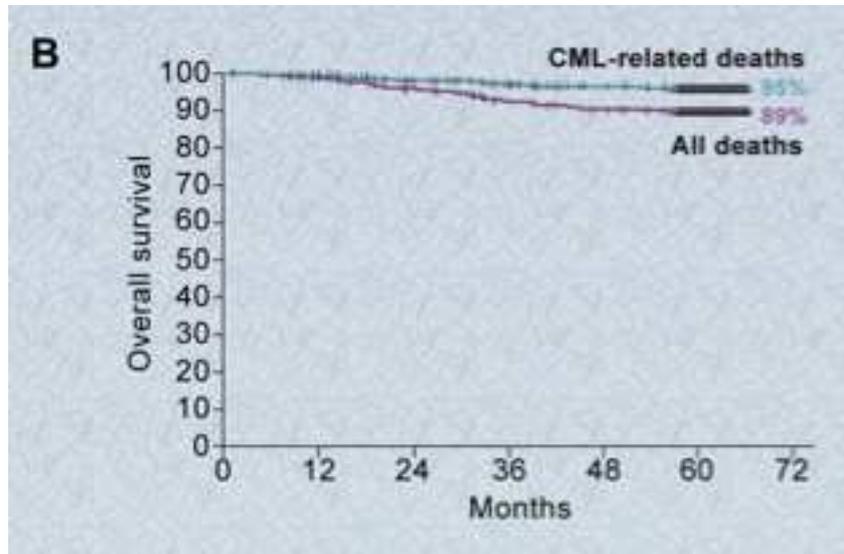


L'identificazione dell'evento molecolare patogeneticamente rilevante della LMC ha indirizzato la ricerca verso composti capaci di inibire specificamente la attività tirosin-chinasica dei prodotti di

Bcr-Abl, dando virtualmente inizio all'era della "targeted therapy" nel cancro. Frutto di una massa enorme di ricerca è una 2-fenil-amino-pirimidina, denominata STI571, Imatinib o Gleevec, capace di bloccare il trasferimento dell'ATP ai residui in tirosina dei prodotti di Bcr-Abl, inibendone l'attività enzimatica



(FIGURE 24,25). La sperimentazione clinica dell'Imatinib iniziata nel 1998 ha rivoluzionato la storia naturale della LMC portando la percentuale di remissioni ematologiche complete a 5 anni al 97% e quella di risposte citogenetiche maggiori o complete al 85%



(FIGURA 26). Tuttavia a dispetto degli eccezionali risultati clinici nel più del 95% dei pazienti mantiene una positività sia pur ridotta per l'espressione di Bcr-Abl in PCR e quelli che discontinuano il trattamento vanno incontro a ricaduta di malattia. Ciò supporta che a dispetto della sua grande efficacia sulla massa del tumore l'Imatinib sia incapace di eliminare le cellule staminali leucemiche e introduce il tema leader della ricerca sulla patogenesi e terapia del cancro.

I difetti del sistema di DNA riparazione associati all'espressione di Bcr-Abl sono stati attribuiti all'impatto della costitutiva attività tirosin-chinasica di Abl riarrangiato sui segnali coinvolti nella DNA riparazione, nell'attivazione dei checkpoints del ciclo cellulare e della inibizione della morte apoptotica. Noi abbiamo dimostrato che dipendono almeno in parte dalla preclusione dell'attività del prodotto dell'allele non coinvolto nel riarrangiamento.

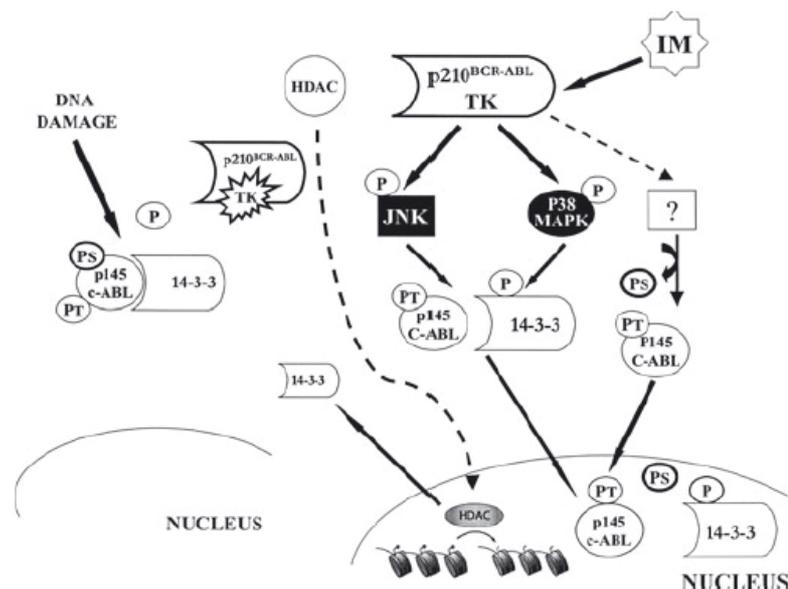


FIGURA 27. Questo pone le proteine scaffolding della famiglia 14-3-3 in una posizione centrale per la ripartizione delle molecole coinvolte nella DNA riparazione, nell'attivazione dei checkpoints del ciclo cellulare e nella morte apoptotica tra in compartimenti subcellulari.

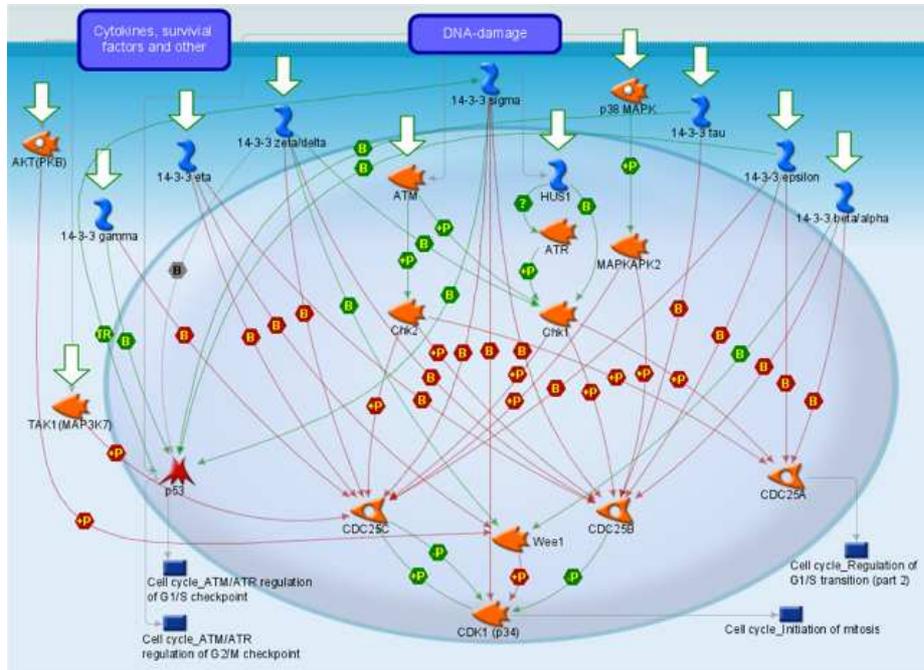


FIGURA 28. Il sito di legame delle proteine 14-3-3 con le loro proteine clienti può dunque essere considerata come target aggiuntivo nella terapia della LMC e in generale dei tumori indotti dalla costitutiva attivazione delle tirosin-chinasi