



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE XXVII CICLO

Dott. Luigi Fattore

Il Dott. Luigi Fattore, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma ed azienda ospedaliera S. Andrea, sotto la direzione della Dott.ssa Rita Mancini, e presso i laboratori dell'Ohio State University at Columbus, Ohio, USA, sotto la supervisione del Prof. Croce.

Il melanoma maligno è la più grave forma di cancro della pelle e la cui incidenza è aumentata nel mondo negli ultimi 60 anni. Prima del 2011 solo 3 farmaci erano stati approvati dalla FDA per la cura del melanoma metastatico: la fotemustina, la dacarbazina e elevate dosi di IL2. Negli ultimi anni, tuttavia, lo scenario è completamente cambiato grazie allo sviluppo di terapie sistemiche innovative come immunoterapie con l'ipilimumab e soprattutto grazie all'utilizzo di nuovi farmaci diretti contro pathways frequentemente alterati nel melanoma. Questi ultimi farmaci colpiscono il pathway delle MAPK, poichè più del 50% dei casi di melanoma presenta mutazioni del gene codificante per la proteina BRAF a livello della V600. Il primo di questi inibitori di BRAF è stato il vemurafenib, che ha dimostrato in trial clinici di fase III un aumento della sopravvivenza dei pazienti trattati rispetto a quelli trattati con dacarbazina; più recentemente, sono stati sviluppati altri inibitori dello stesso tipo, come il dabrafenib, che ha dimostrato la sua efficacia in trial clinici di fase II. Nonostante i risultati promettenti la sopravvivenza dei pazienti resta, tuttavia, molto bassa a causa dello sviluppo di resistenza alla terapia. Studi recenti hanno dimostrato che questi meccanismi di resistenza sono di due tipi fondamentali: dipendenti o indipendenti dal pathway delle MAPK. Nel primo caso vi è riattivazione del pathway delle MAPK attraverso, ad esempio, mutazioni de novo di RAS o altri meccanismi; nel secondo caso c'è, invece, attivazione di altri pathway, come, principalmente, quello di PI3K/AKT tramite attivazione di Recettori Tirocin Chinasi (RTKs). Negli ultimi decenni i membri della famiglia del recettore dell' EGF sono emersi come bersagli promettenti nel trattamento di diverse forme di cancro, a causa del loro coinvolgimento fondamentale nell'attivazione del pathway di proliferazione e sopravvivenza indotti dalla via PI3K/AKT. Il recettore ErbB3, in particolare, è stato individuato come uno degli elementi chiave della malignità, essendo, infatti, il più potente attivatore della via di sopravvivenza PI3K/AKT. ErbB3 è, inoltre, coinvolto nello sviluppo della resistenza da parte delle cellule tumorali alle terapie anti-EGFR e anti-ErbB2 convenzionali. Recentemente, è stato osservato come il signalling di ErbB3 indotto dal suo ligando naturale, l'eregulina (HRG), sia in grado di inibire il differenziamento dei melanociti, promuovendo la proliferazione delle cellule di melanoma. Questa

osservazione identifica ErbB3 come nuovo bersaglio per il trattamento del melanoma maligno.

Nel corso del periodo di Dottorato il Dott. Fattore ha utilizzato per gli esperimenti tre anticorpi monoclonali diretti contro il recettore ErbB3, prodotti nel laboratorio del Prof. Ciliberto, ottenuti immunizzando topi con DNA plasmidico codificante per la forma mutata del recettore. Questi mAbs, A2, A3 e A4, legano il recettore con una elevatissima affinità. In particolare due di questi mAbs, A3 e A4, sono in grado di inibire la crescita di cellule tumorali “in vitro” e “in vivo”. I risultati sono stati ottenuti su due linee di melanoma umano, le MST-L e le Mel 501, che esprimono elevati livelli del recettore ErbB3 a livello della membrana cellulare. E' stato dimostrato che A3 e A4, ma non A2, sono in grado di inibire la fosforilazione di ErbB3 e di AKT HRG-indotta e che l'inibizione del signalling risulta nella capacità di inibire o meno la migrazione e la proliferazione di cellule di melanoma. Questi risultati dimostrano, inoltre, che A3 e A4, rispetto ad A2, sono in grado di indurre endocitosi del recettore e di indirizzarlo verso il compartimento degradativo lisosomiale e a questo corrisponde un'effettiva degradazione di ErbB3. Infine, è stato dimostrato che A3 e A4, ma non A2, impediscono anche il recycling del recettore sulla membrana cellulare. Successivamente, il Dott. Fattore si è occupato dello studio dell'eventuale coinvolgimento del recettore ErbB3 nella resistenza agli inibitori di RAF/MEK nel melanoma, e se la combinazione dei suddetti mAbs con questi farmaci potesse essere più efficace dei singoli trattamenti nell'inibizione della proliferazione di cellule di melanoma. A tale scopo, sono state utilizzate tre linee cellulari di melanoma, le LOX IMVI, le MST-L e le WM266 che presentano diversi tipi di mutazioni di BRAF a livello della V600. I risultati, ottenuti tramite analisi al FACS, dimostrano che queste linee cellulari presentano livelli di espressione di ErbB1, di ErbB2 e di ErbB4 molto variabili, mentre iper-esprimono ErbB3. Per dimostrare che ErbB3 è coinvolto in meccanismi di risposta precoce al trattamento con l'inibitore di BRAF mutato vemurafenib, sono stati effettuati esperimenti di RTKs per valutare i livelli di fosforilazione di 49 recettori tirosin chinasi. I dati ottenuti dimostrano che, tra i recettori considerati, ErbB3 è l'unico recettore che viene iper-fosforilato in seguito al trattamento con il vemurafenib; è importante sottolineare, inoltre, che tale fenomeno avviene in tutte e tre le linee cellulari usate, e ciò suggerisce che esso può essere un meccanismo generale di risposta all'inibizione di BRAF da parte delle cellule di melanoma. Successivamente, per confermare la questa osservazione, sono stati effettuati esperimenti di Western Blot nelle tre linee di melanoma trattate o meno con il vemurafenib a dosi e tempi diversi. I risultati ottenuti dimostrano che il recettore ErbB3, e di conseguenza AKT, sono attivati in maniera tempo e dose dipendente. In seguito è stata valutata la capacità dei mAbs diretti contro ErbB3, A2, A3 e A4 di inibire o meno l'attivazione del recettore in seguito al trattamento con il vemurafenib. I risultati, ottenuti tramite analisi di Western Blot, dimostrano che A3 e A4, ma non A2, sono in grado di inibire l'attivazione di ErbB3 e di AKT indotti dal vemurafenib. Inoltre, per valutare se a questa inibizione del signalling è correlato un effetto fisiologico, sono stati condotti saggi clonogenici, in cui una dose fissa dei suddetti anticorpi monoclonali è stata combinata con dosi decrescenti di vemurafenib. I risultati dimostrano che A3 e A4, ma non A2, sono in grado di potenziare l'azione dei vemurafenib nell'inibizione della crescita di cellule di melanoma. Per valutare se l'attivazione di ErbB3 e AKT è presente anche dopo inibizione di MEK, le cellule LOX IMVI sono state trattate con il trametinib, un inibitore di MEK. I dati ottenuti, tramite Western Blot, dimostrano che anche l'inibizione di MEK attiva ErbB3 e AKT, e tale attivazione è inibita dall'anticorpo monoclonale A4. Tramite saggi clonogenici è stato, inoltre, dimostrato che la combinazione A4/ trametinib inibisce la proliferazione di cellule di melanoma meglio dei singoli trattamenti. Infine, è stato dimostrato che la combinazione di dosi molto basse di vemurafenib, trametinib con A4 induce una più forte inibizione della crescita di cellule LOX IMVI rispetto ai singoli trattamenti. Quindi, è stato studiato quale potesse essere il meccanismo di attivazione di ErbB3 indotto da vemurafenib, puntando sul possibile coinvolgimento di un loop autocrino di produzione e rilascio di neuregulina da parte delle cellule di melanoma. A tale scopo, per prima cosa sono stati effettuati esperimenti di Western Blot e Real Time PCR su cellule LOX IMVI trattate con questo farmaco; i risultati ottenuti dimostrano che i livelli di neuregulina sono incrementati a livello sia di RNA messaggero che di proteina in seguito al trattamento con vemurafenib. Per dimostrare la presenza di un loop autocrino, le cellule LOX

IMVI, precedentemente stimulate con vemurafenib, sono state trattate con un anticorpo anti-neuregulina; i risultati ottenuti tramite Western Blot hanno dimostrato che la presenza di questo anticorpo è in grado di inibire l'attivazione di pErbB3. Per confermare questa osservazione è stato utilizzato il terreno condizionato proveniente da cellule LOX IMVI trattate con vemurafenib per stimolare cellule di melanoma starvate; i risultati dimostrano che questo terreno è in grado di attivare pErbB3 e che tale attivazione è bloccata quando il terreno condizionato viene pre-incubato con l'anticorpo anti-neuregulina. Inoltre, il Dott. Fattore si è occupato di valutare se le combinazioni dei suddetti anticorpi monoclonali con il vemurafenib e il trametinib fossero più efficaci nell'inibizione della crescita di cellule di melanoma anche "in vivo". A tale scopo, la linea di melanoma M14 è stata iniettata sottocute in topi nudi CD1. Appena i tumori hanno raggiunto le dimensioni di 100mm³, i topi sono stati suddivisi in maniera casuale in 6 gruppi, ognuno composto da 5 animali. Successivamente, essi sono stati trattati con il veicolo, con gli anticorpi A3 e A4, con il vemurafenib e trametinib da soli o in combinazione e infine con tutte e quattro le molecole insieme. I risultati dimostrano che A3 e A4 sono in grado di inibire la crescita tumorale delle cellule di melanoma anche "in vivo" in maniera analoga ai farmaci trametinib e vemurafenib da soli. In aggiunta, è stato osservato che gli animali trattati con la quadrupla combinazione presentano una ricrescita tumorale dopo interruzione della terapia molto meno marcata. Questa importante valutazione ha portato a supporre che il recettore ErbB3 è un elemento chiave non solo nella risposta immediata alle terapie target nel melanoma, ma anche nell'insorgenza della resistenza a lungo termine dopo terapia.

Durante l'ultimo periodo di Dottorato, il Dott. Fattore ha studiato il ruolo di miRNA nell'insorgenza di fenomeni di resistenza alle terapie target nel melanoma.

PUBBLICAZIONI 2011-2014

Belleudi F, Marra E, Mazzetta F, **Fattore L**, Giovagnoli MR, Mancini R, Aurisicchio L, Torrisci MR, Ciliberto G. Monoclonal antibody-induced ErbB3 receptor internalization and degradation inhibits growth and migration of human melanoma cells. *Cell Cycle* 2012 Apr 1; 11(7): 1455-67.

Montano G, Cesaro E, **Fattore L**, Vidovic K, Palladino C, Crescitelli R, Izzo P, Turco MC, Costanzo P. Role of WT1-ZNF224 interaction in the expression of apoptosis-regulating genes. *Hum Mol Genet.* 2013 May 1; 22 (9): 1771-82.

Ricci A, De Vitis C, Noto A, **Fattore L**, Mariotta S, Cherubini E, Roscilli G, Liguori G, Scognamiglio G, Rocco G, Botti G, Giarnieri E, Giovagnoli MR, De Toma G, Ciliberto G, Mancini R. TrkB is responsible for EMT transition in malignant pleural effusions derived cultures from adenocarcinoma of the lung. *Cell Cycle.* 2013 Jun 1; 12 (11): 1696-703.

Fattore L, Marra E, Pisanu ME, Noto A, de Vitis C, Belleudi F, Aurisicchio L, Mancini R, Torrisci MR, Ascierio PA, Ciliberto G. Activation of an early feedback survival loop involving phospho-ErbB3 is a general response of melanoma cells to RAF/MEK inhibition and is abrogated by anti-ErbB3 antibodies. *J Transl Med.* 2013 Jul 27; 11: 180.

Noto A, De Vitis C, Roscilli G, **Fattore L**, Malpicci D, Marra E, Luberto L, D'Andrilli A, Coluccia P, Giovagnoli MR, Normanno N, Ruco L, Aurisicchio L, Mancini R, Ciliberto G. Combination therapy with anti-ErbB3 monoclonal antibodies and EGFR TKIs potently inhibits Non-small Cell Lung Cancer. *Oncotarget.* 2013 Aug; 4 (8): 1253-65.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa del Dott. **Luigi Fattore** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

ERBB3 RECEPTOR IN MELANOMA: A KEY PLAYER IN THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO THERAPY

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi