

Dottoranda Irene Lepori

Attività scientifica svolta nel 2° anno di Dottorato, Anno Accademico 2017-2018

Introduzione

Il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) è un tumore fortemente resistente alla chemioterapia. La Mesotelina (MSLN) è una glicoproteina di membrana overespressa nel MPM ed utilizzata come marker tumorale.

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di strategie innovative per la terapia del MPM: aptamero a DNA diretto contro la MSLN, modifica chimica del vaccino anti-MPM a base di *Listeria monocytogenes* (Lm) per il trasporto di farmaci a livello del tumore.

Lo sviluppo dell'aptamero sfrutta la tecnica del Cell-SELEX utilizzando come selezione positiva la linea cellulare di mesotelioma Mero14 e come selezione negativa la stessa linea cellulare previo MSLN-gene Knock Out mediante il sistema CRISPR/Cas9.

Il vaccino anti-MPM a base di Lm ha mostrato importanti risultati nei trials clinici. Questo lavoro si prefigge di coniugare farmaci antitumorali sulla parete del batterio sfruttando reazioni di Click-Chemistry bioortogonal, tra gruppi azidici e alchinici opportunamente inseriti nel batterio e nel farmaco.

Metodi

MSLN Gene-KO: introduzione vettori lentivirali per sgRNA e Cas9 in Mero14, induzione Cas9 con doxiciclina, verifica avvenuto KO mediante WB e analisi *in silico* (TIDE). Isolamento cloni KO-MSLN in p100 e p96 well.

Caratterizzazione linea cellulare KO-MSLN: Curva di crescita, Ciclo cellulare, Formazione colonie, Migrazione 2D, Migrazione 3D, Invasione.

Aptamero anti-MSLN: separazione del dsDNA - PCR asimmetrica, digestione con Esonucleasi λ , ottimizzazione selezione su cellule. Monitoraggio SELEX: RT-PCR, RFLP.

Coniugazione Lm-farmaco: Modificazione parete cellulare con D-Alanina (DA) modificata: Azido-DA, Alk-DA (Alchino-DA), NADA, Alk-DADA. Valutazione vitalità e proliferazione cellulare. "Click-reactions" bioortogonali: CuAAC/BTTP con Az- o Alk-DA e rispettivo fluoroforo, DBCO con Az-DA. Zucchieri modificati: UDPalkNAM, reazione con relativo Az-Fluoroforo.

Risultati

Linea cellulare Mero14 KO per la MSLN.

SELEX – Ciclo2.

CuAAC/BTTP: efficace coniugazione Lm con fluoroforo, mantenimento vitalità cellulare.

Seminari e Congressi:

14 - 15 /11/2016

Soft skills, i corsi trasversali nei dottorati di ricerca: **Start up and Technology transfer**
Auditorium Santa Chiara, Siena;

18 /11/2016

Soft skills, i corsi trasversali nei dottorati di ricerca: **Project design e gestione dei progetti di ricerca**
Auditorium Santa Chiara, Siena

18/5/2017

Listeria monocytogenes as a new drug and delivery platform for metastatic melanoma
Marianna Vitiello, PhD
Post Doc, CNR Pisa

20 - 21/6/2017

Soft skill, corsi trasversali nei dottorati di ricerca: **Scientific Writing And Presentation**
John L. Telford
Auditorium Santa Chiara Lab

13/7/2017

Suscettibilità genetica al cancro pancreatico
Prof. Daniele Campa,
Dipartimento di Biologia/Genetica Università di Pisa

29/7/2017

Towards a perceptive understanding of size in cellular biology
Monica Zoppé
Ricercatrice CNR Pisa

12/9/2017

Microbial Conversion of Lignocellulose in the Anthropocene
Kristen DeAngelis, Ph.D.
Assistant Professor, UMass Microbiology

26/9/2017

Probing Protein and mRNA Surveillance Mechanisms at the Ribosome.
Wali Karzai, Ph.D.
Associate Professor of Biochemistry, Stony Brook University, New York (USA)

10/10/2017

Genetically Encoding Enabling Chemistry to Read and Write Biology
Professor Abhishek Chatterjee
Boston College, Department of Chemistry

Soggiorni in laboratori esteri

Prof. Sloan Siegrist laboratory, Department of Microbiology, University Of Massachusetts, Amherst (USA)
Periodo: 6 Settembre 2017 – in corso

!

Amherst, 12/10/2017