

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 bioortogonali, tra gruppi azidici e alchinnici opportunamente inseriti nel batterio e nel farmaco.

Metodi

MSLN Gene-KO: introduzione vettori lentivirali per sgRNA e Cas9 in Mero14, induzione Cas9 con doxyciclina, 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/BTP 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/BTP: 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