

## Borsa di ricerca: “Genome editing di TP53 e RB1 in iPSC per generare un modello cellulare di leiomioma sarcoma”

### Oggetto dell'attività di ricerca

Il **leiomioma sarcoma** (LMS) è un tumore raro di origine mesenchimale, che rappresenta però uno degli istotipi più frequenti fra i sarcomi dei tessuti molli. Origina da precursori delle cellule muscolari lisce, e mostra un comportamento clinico aggressivo e scarsamente responsivo agli approcci terapeutici attuali.

L'obiettivo del progetto consiste nello sviluppo di un modello cellulare isogenico di leiomioma sarcoma, in grado di riprodurre sia il contesto genetico molecolare che il *lineage* differenziativo, al fine di identificare nuove terapie indirizzate alle vie di segnalazione attive nella neoplasia. A tal fine il progetto si propone di utilizzare cellule staminali pluripotenti indotte (**iPSC**) da donatore e modificarle geneticamente mediante la tecnologia **Crispr/Cas9** a livello degli oncosoppressori **TP53** e **RB1**, i due geni ricorrentemente mutati nel 75% dei leiomioma sarcomi umani, differenziare il modello verso il muscolo liscio e analizzare il risultante fenotipo cellulare e molecolare.

Il/la candidato/a selezionato/a per la borsa di studio si occuperà di attività di ricerca nell'ambito dell'ottenimento del modello, del differenziamento muscolare e degli studi funzionali. In particolare, le principali attività includeranno:

1. Coltura cellulare e differenziamento delle iPSC: Il/la borsista si occuperà della coltura e induzione del differenziamento delle iPSC wild type e modificate geneticamente, sia in 2D che in 3D.
2. Crispr/Cas9 genome editing: Il/la borsista utilizzerà la nucleofezione di complessi Cas9-sgRNA diretti con RB1 per introdurre il knockout di RB1 in cellule iPSC wild type e mutate/delete in TP53. Si occuperà inoltre del clonaggio in single cell del pool di cellule editate e del loro congelamento.
3. Caratterizzazione molecolare dei cloni editati: Il/la borsista si occuperà dell'estrazione del DNA dai cloni isolati e del controllo dell'avvenuto knockout di RB1 mediante Sanger sequencing.
4. Caratterizzazione funzionale del modello: Il/la borsista si occuperà dell'analisi della crescita cellulare ai vari stadi del differenziamento (pluripotente, mesoderma, muscolo liscio precoce e tardivo) nei cloni wild type, mutati/deleti in TP53, deleti in RB1 o con doppia alterazione TP53/RB1 e del differenziamento mediante real time PCR, RNA sequencing, citofluorimetria e immunofluorescenza.
5. Collaborazione con il gruppo di ricerca: Il/la borsista lavorerà a stretto contatto con ricercatori, biologi, medici e specialisti del settore oncologico, contribuendo alla progettazione di esperimenti e all'interpretazione dei risultati ottenuti.