

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

Generazione di cellule *ADCK1 knock-out* attraverso la tecnica CRISPR/Cas9

Relatore: Prof. Fassan Matteo

Correlatore: Prof. Desbats Maria Andrea

Laureanda: Zampieri Sara

Matricola 1227679

Anno Accademico 2021 – 2022

SOMMARIO

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1 CRISPR-Cas.....	2
1.2 I SISTEMI CRISPR-Cas NEI BATTERI	2
1.3 SISTEMA CRISPR-Cas9 NEI BATTERI.....	3
1.4 SISTEMA CRISPR-Cas9 COME TECNICA DI EDITING GENETICO	4
1.4.1 Guide RNA	5
1.4.2 L'endonucleasi Cas9	5
1.4.3 Formazione del complesso sgRNA-Cas9	5
1.4.4 Riconoscimento del DNA target.....	5
1.4.5 Rottura del doppio filamento da parte della Cas9 e riparazione	6
1.5 GENERAZIONE DI AMPIE DELEZIONI GENOMICHE ATTRAVERSO LA TECNICA CRISPR-Cas9.....	7
1.6 I MITOCONDRI.....	8
1.6.1 Il mitocondrio e le sue funzioni	8
1.6.2 La fosforilazione ossidativa	8
1.6.3 Il CoQ.....	9
1.6.4 ADCK1	10
2. SCOPO DELLA TESI	12
3. MATERIALI E METODI	13
3.1 Colture cellulari.....	13
3.2 Conteggio delle cellule con la camera di Burker	13
3.3 Curva di mortalità cellulare con Puromicina	13
3.4 Criteri per il disegno delle gRNAs.....	14
3.4.1 Descrizione dei vettori di espressione.....	15
3.4.2 Inoculo batteri	16
3.4.3 Purificazione dei plasmidi (Miniprep)	17
3.5 Trasfezione transiente	17
3.6 Colonie cellulari derivanti da una singola cellula	18
3.7 Preparazione del pellet cellulare	18
3.8 Estrazione rapida di DNA	19
3.9 Screening delle colonie per la presenza di delezioni	19
3.10 Sequenziamento Sanger	21
3.10.1 Purificazione PCR.....	21
3.10.2 Big Dye	22
3.10.3 <i>Injection</i> e sequenziamento	22
3.11 SDS-PAGE e Western blot	23

3.11.1 Estrazione delle proteine totali.....	23
3.11.2 Quantificazione delle proteine con BCA	23
3.11.4 Corsa su Gel SDS-Page.....	24
3.11.6 Incubazione con Anticorpi	25
3.11.7 Visualizzazione della membrana all'iBright™ 1500 (Thermo Fisher).....	25
4. RISULTATI.....	26
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	39
6. BIBLIOGRAFIA.....	41

ABSTRACT

Introduzione

Il sistema CRISPR-Cas9 è una tecnica di editing genetico che si basa sull'utilizzo di una guida a singolo filamento di RNA (*single-guide RNA*, *sgRNA*) specifica, che guida l'endonucleasi Cas9 verso una regione di DNA target affinché questa generi una rottura a doppio filamento (*DSB*) sito specifica. Il Coenzima Q (CoQ) è una molecola lipidica che funziona come trasportatore di elettroni dai complessi I e II al complesso III della catena respiratoria mitocondriale. La famiglia di proteine ADCK (*aarF domain containing kinase*), e in particolare ADCK2, ADCK3 e ADCK4, sono coinvolte nella biosintesi del CoQ, un processo non del tutto definito nell'uomo, mentre le funzioni di ADCK1 e ADCK5 non sono mai state studiate.

Scopo dello studio

Lo scopo della tesi è quello di generare cellule umane *knock-out* per il gene *ADCK1* attraverso una variante del sistema CRISPR-Cas9 per generare ampie delezioni genomiche.

Materiali e metodi

Cellule HEK 293 sono state trasfettate contemporaneamente con due plasmidi, ognuno codificante per l'endonucleasi Cas9 e una *gRNA*. In un primo esperimento sono state utilizzate due *gRNAs* che riconoscevano due siti target negli esoni 5 e 10 del gene *ADCK1*, mentre nel secondo esperimento sono state sfruttate due *gRNAs* che riconoscevano due siti target negli esoni 5 e 7 dello stesso gene. Dopo la trasfezione, le cellule sono state selezionate e sono stati isolati dei cloni, il cui DNA è stato analizzato mediante PCR per testare la presenza della delezione; quest'ultima è stata verificata poi con il sequenziamento SANGER. Infine, per confermare ulteriormente l'assenza del prodotto proteico di *ADCK1*, è stato eseguito un Western blot.

Risultati

Seguendo questa strategia, sono stati ottenuti tre diversi cloni di cellule HEK 293 *knock-out* per *ADCK1*, le quali presentano delle delezioni *out-of frame*, su entrambi gli alleli, che generano una proteina tronca. Il Western blot ha confermato l'assenza del prodotto proteico.

Conclusioni

L'efficienza della tecnica CRISPR-Cas9 per la generazione di ampie delezioni genomiche è relativamente ridotta e inversamente proporzionale alla all'ampiezza della delezione. Saranno necessari, in futuro, ulteriori caratterizzazioni delle cellule, per definire, con certezza, l'effetto della delezione e, di conseguenza, il ruolo del gene *ADCK1* nelle funzioni cellulari.

1. INTRODUZIONE

1.1 CRISPR-Cas

Il sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - Cas (*CRISPR associated endonuclease*) è una tecnica di editing genetico scoperta da J. A. Doudna ed E. Charpentier, che ha valso alle due ricercatrici il premio Nobel per la chimica nel 2020.

Questa tecnica è utilizzata per il *knock-in* e *knock-out* di geni, la generazione di ampie delezioni genomiche, lo screening di geni utilizzando librerie di guide a singolo filamento di RNA (*gRNAs*) e l'ingegneria genetica di numerosi organismi modello. ⁽¹⁾ Inoltre si stanno sviluppando diverse applicazioni cliniche per la terapia genica di vari disturbi, tra cui malattie genetiche del sangue, malattie genetiche dei polmoni, cancro, distrofia muscolare di Duchenne, malattia di Huntington e cecità.⁽²⁾

1.2 I SISTEMI CRISPR-Cas NEI BATTERI

Esistono diversi tipi di sistemi CRISPR, I-VI, i quali sono a loro volta raggruppati in due classi, in base alla sequenza e alla struttura delle proteine Cas che essi utilizzano.⁽³⁾

La classe 1 include i CRISPR di tipo I, III e IV, che utilizzano complessi multiproteici per distruggere acidi nucleici estranei; la classe 2 include, invece, i CRISPR di tipo II, V, VI, i quali utilizzano singole proteine.⁽⁴⁾

Ogni tipologia di CRISPR utilizza diverse proteine Cas, le quali funzionano in modo tra loro differente.

In particolare:

- Nel CRISPR di tipo I è presente il complesso CRISPR-associato per la difesa antivirale chiamato *Cascade* (composto da più subunità effettrici e da un *crRNA (CRISPR RNA)*), il quale lega il DNA bersaglio e forma una struttura *R-loop*; successivamente, la proteina Cas3 viene reclutata in modo specifico e taglia il DNA bersaglio.
- Nel CRISPR di tipo II è presente la proteina Cas9, che è una DNA endonucleasi guidata da un RNA, che induce un taglio nel doppio filamento di DNA. Essa contiene due domini nucleasici, il dominio HNH e il dominio RuvC, che operano tagli rispettivamente del filamento di DNA *target* e di quello *non target*.
- Nel CRISPR di tipo V è presente la proteina Cas 12, che possiede un singolo dominio simile a RuvC, il quale taglia sia i filamenti *target* che quelli *non target* e genera estremità sfalsate a valle dei siti PAM (*Protospacer Adjacent Motif*).

- Nel CRISPR di tipo VI è presente la proteina Cas 13, una ribonucleasi guidata dall'RNA, che è in grado di elaborare i suoi *pre-crRNA* in *crRNA* maturi e che, per tagliare un sito di RNA target, necessita solamente di tali *crRNA*.⁽⁴⁾

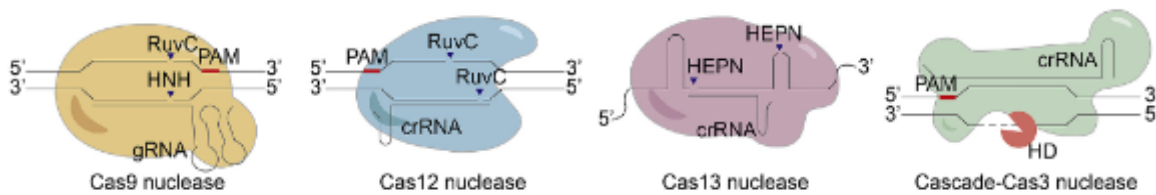


Figura 1. Rappresentazione delle nucleasi Cas9, Cas12, Cas13 e del complesso Cascade-Cas3.⁽⁴⁾

1.3 SISTEMA CRISPR-Cas9 NEI BATTERI

Il sistema CRISPR-Cas è presente in natura e costituisce un particolare meccanismo di difesa usato dai Batteri e dagli Archeobatteri nei confronti di infezioni da parte di batteriofagi o quando avviene il trasferimento di plasmidi.

In particolare, nei batteri (come ad esempio *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. thermophilus*) è presente un lungo locus composto da sequenze ripetute (*repeats*) intervallate da brevi sequenze non ripetute (*spacers*) che insieme formano il *CRISPR array*, da alcuni geni Cas, i quali verranno poi tradotti nelle specifiche proteine Cas, e da un *trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA)*, che codifica per un RNA non codificante con un'omologia per la sequenza dei *repeats* (figura 1).⁽⁵⁾

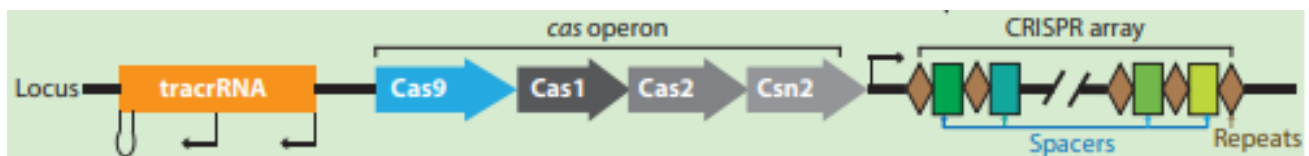


Figura 2. Locus batterico contenente il gene *tracrRNA*, i geni codificanti per l'operone Cas e il *CRISPR array* contenente i *repeats* (rombi marroni) e gli *spacers* (rettangoli colorati).⁽⁵⁾

Con l'infezione del batterio da parte di un batteriofago, il virus introduce il proprio materiale genetico all'interno del citoplasma batterico. Le proteine Cas operano quindi eseguendo due tagli, uno a livello del genoma virale, producendo così un frammento di DNA virale, e l'altro in uno specifico punto del *CRISPR array*, così che il genoma virale possa essere integrato nel genoma batterico e servire da memoria dell'infezione.⁽⁵⁾

Si è osservato infatti che, mantenendo il batterio *S. thermophilus* in coltura con il batteriofago 2972 per un lungo tempo, si ottenevano naturalmente dei BIMs (*bacteriophage-insensitive mutants*), ossia dei batteri resistenti all'infezione da parte di tali batteriofagi. Andando ad analizzare il locus CRISPR di questi BIMs tramite PCR, si è visto che l'amplicone prodotto era di dimensioni maggiori rispetto a quello dei ceppi *wild-type (wt)*. A seguito del sequenziamento di tali ampliconi, si è constatato che i BIMs derivavano dal ceppo *wt*, in quanto gli *spacers* presentavano la stessa sequenza, ma che

all'estremità 5' i ceppi resistenti presentavano 66 nucleotidi in più; di questi 66 nucleotidi, 36 erano identici alla sequenza dei *repeats* presenti nella sequenza, mentre gli altri 30 costituivano un nuovo *spacer*, il quale era perfettamente identico ad una specifica regione del batteriofago 2972. ⁽⁶⁾

Se il batterio viene nuovamente infettato dal batteriofago, tutti gli *spacers* e i *repeats* contenuti nel *CRISPR array* vengono trascritti in un precursore detto *pre-crRNA*. Successivamente, viene trascritto il *tracrRNA*, che si appaia con le sequenze ripetute del *pre-crRNA*; l'RNasi III taglia in specifici punti del *pre-crRNA*, portando così alla sua maturazione in *crRNA*. Una nucleasi va poi a tagliare l'estremità 5' del *crRNA*, così da ridurre la sua lunghezza ad un totale di 20 pb (paia di basi), complementari ad una porzione della sequenza genomica del batteriofago che ha infettato il batterio. A questo punto i *crRNA-tracrRNA* legano l'endonucleasi Cas9 e la dirigono verso il genoma virale, dove andrà ad eseguire un taglio a valle della PAM, andando così ad inattivare il genoma virale e impedire la sua replicazione. ⁽⁵⁾

Questo dimostra come il sistema CRISPR-Cas sia utilizzato dai batteri come meccanismo di difesa.

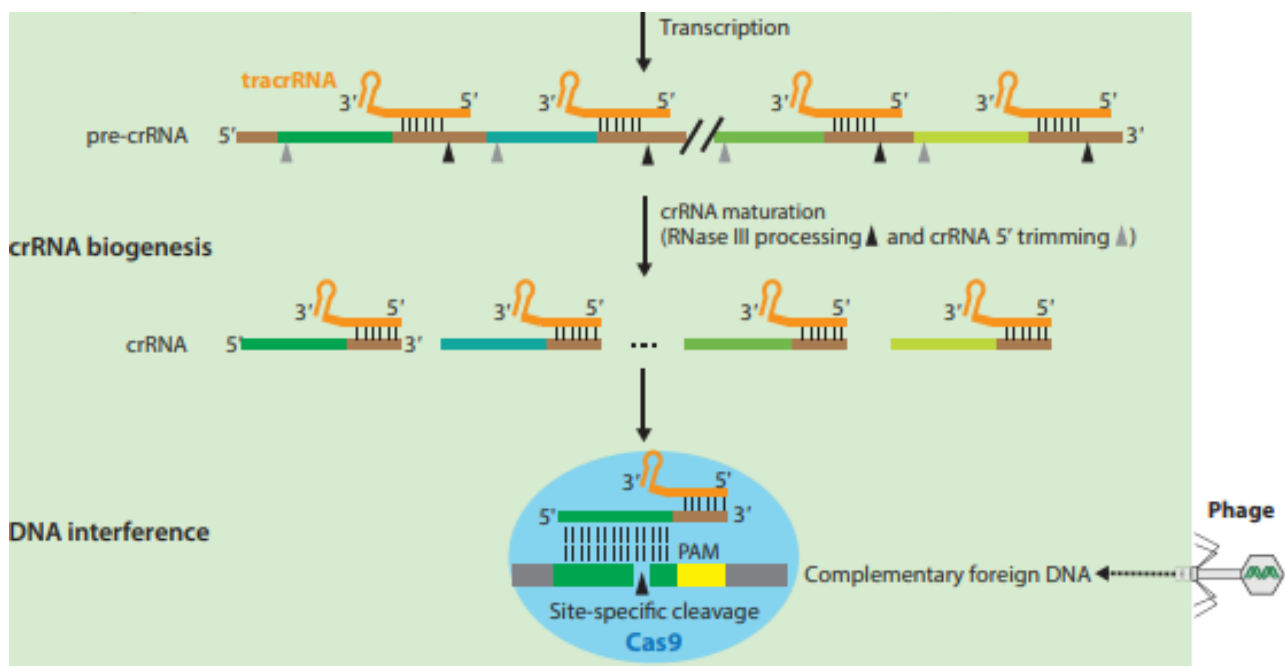


Figura 3. Schema della formazione del *crRNA* e dell'azione della *Cas9* sul DNA virale infettante. ⁽⁵⁾

1.4 SISTEMA CRISPR-Cas9 COME TECNICA DI EDITING GENETICO

Al giorno d'oggi le tecnologie basate sul sistema CRISPR consentono un efficiente riconoscimento ed alterazione del DNA di cellule viventi in molte specie animali, incluso l'uomo ed altri eucarioti. Nel 2012 si è scoperto che il batterio *S. pyogenes* poteva essere adattato per l'editing genetico. ⁽³⁾

Il principio di base dell'editing genetico è quello di utilizzare una guida a singolo filamento di RNA (*single guide RNA, sgRNA*) specifica, programmata per indirizzare la Cas9 verso qualsiasi regione di DNA di interesse nel genoma, così che essa generi una rottura a doppio filamento (*double strand*

breaks, DSB) sito specifica. Queste rotture a doppio filamento verranno poi riparate tramite una giunzione non omologa delle estremità tagliate (*non-homologous end joining*, NHEJ) o attraverso una ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR).⁽⁵⁾

1.4.1 Guide RNA

La *sgRNA* è costituita da due RNA non codificanti:

- Il *CRISPR RNA* (*crRNA*) è una sequenza di circa 20 nucleotidi, complementare ad una specifica sequenza target di uno dei due filamenti di DNA, che regola quindi la specificità dell'RNA guida.
- Il *tracrRNA* è una sequenza omologa ai *repeats* della sequenza CRISPR che aiuta il processamento e la maturazione del *crRNA* ed il legame della *gRNA* con la Cas9.⁽⁷⁾

1.4.2 L'endonucleasi Cas9

La proteina Cas9 di *S. pyogenes* è una grande DNA endonucleasi multifunzionale e multidominio, in grado di tagliare il doppio filamento di DNA 3 pb a monte di una specifica sequenza denominata PAM. La Cas9 è costituita da due lobi, il primo responsabile del riconoscimento dell' α -elica di DNA (REC) e il secondo responsabile dell'attività nucleasica (NUC). In particolare, quest'ultimo lobo è composto da due domini nucleasici: un dominio *HNH-like* che taglia il filamento di DNA *target* complementare alla *sgRNA* e un dominio *RuvC-like* responsabile invece del clivaggio del filamento di DNA opposto. Inoltre, in questo lobo è presente anche un terzo dominio C-terminale, molto variabile, contenente i siti di interazione per l'interrogazione della sequenza PAM.⁽⁵⁾

1.4.3 Formazione del complesso sgRNA-Cas9

La *sgRNA* acquista una conformazione a L⁽⁸⁾, consentendo così il legame con l'endonucleasi Cas9. In particolare, la Cas9 ha tipicamente una conformazione inattiva e, grazie al legame con la guida, acquisisce delle modificazioni conformazionali tali da rendere l'endonucleasi cataliticamente attiva; si forma così un canale centrale, contenente i due siti attivi che consentono il riconoscimento della sequenza *target* nel doppio filamento di DNA.⁽⁷⁾

1.4.4 Riconoscimento del DNA target

Una volta avvenuto il legame tra la *sgRNA* e la Cas9, il complesso è pronto per il riconoscimento della sequenza target nel doppio filamento di DNA. Tale riconoscimento richiede sia la complementarità dei 20 nucleotidi del *crRNA*, sia la presenza di una sequenza conservata adiacente al sito target: la PAM. Tale sequenza è fondamentale per discriminare le sequenze proprie da quelle

non proprie. La sequenza PAM, usata per la Cas9 derivata da *S. pyogenes*, è costituita dai tre nucleotidi 5'-NGG-3', dove N sta ad indicare uno qualsiasi tra i 4 nucleotidi costituenti il DNA.

Alcuni esperimenti hanno dimostrato che la Cas9 inizia la ricerca del DNA target proprio a partire da un'appropriata sequenza PAM e poi andando ad interrogare il DNA che la affianca, per identificare la sequenza complementare alla *sgRNA*. Una volta identificata la corretta sequenza, l'intero *crRNA* si ibridizza al filamento di DNA complementare, formando un ibrido RNA-DNA (*RNA-DNA heteroduplex*) che si troverà nel canale centrale della Cas9, tra i lobi REC e NUC. La Cas9 riconosce specificatamente la geometria di un ibrido guida-*target* piuttosto che la sequenza delle sue basi, ecco perché si può andare a riconoscere una qualsiasi sequenza di DNA con una specifica *sgRNA*.⁽⁵⁾

1.4.5 Rottura del doppio filamento da parte della Cas9 e riparazione

L'endonucleasi Cas9 è ora in grado di eseguire un taglio al doppio filamento grazie ai suoi domini nucleasici (vedi 1.3.2). Ogni dominio taglia un solo filamento di DNA, specificatamente tre nucleotidi a monte rispetto alla PAM.

La rottura nel doppio filamento di DNA viene poi riparata attraverso i normali meccanismi di riparazione della cellula. In particolare, questa ricongiunzione delle due estremità può avvenire secondo le seguenti modalità:

- NHEJ: mancando un segmento di DNA di riparazione che funge da guida, si formano inserzioni o delezioni (*indels*) di alcune paia di basi o sostituzioni nucleotidiche; queste portano frequentemente a delle mutazioni *frameshift* che causano il *knock-out* o la perdita di funzione di un gene.⁽⁵⁾
- HR: in presenza di un segmento di DNA donatore, contenente una sequenza di interesse affiancata da estremità omologhe al sito di taglio, il meccanismo di riparazione cellulare ha uno stampo su cui basarsi, che può essere esogeno o endogeno⁽³⁾, per riparare correttamente il DNA o inserire nel genoma una specifica sequenza di interesse. Si generano così *knock-in* di geni, correzioni o mutagenesi.⁽⁵⁾ Questo sistema è però meno efficiente rispetto alla *NHEJ*.

(3)

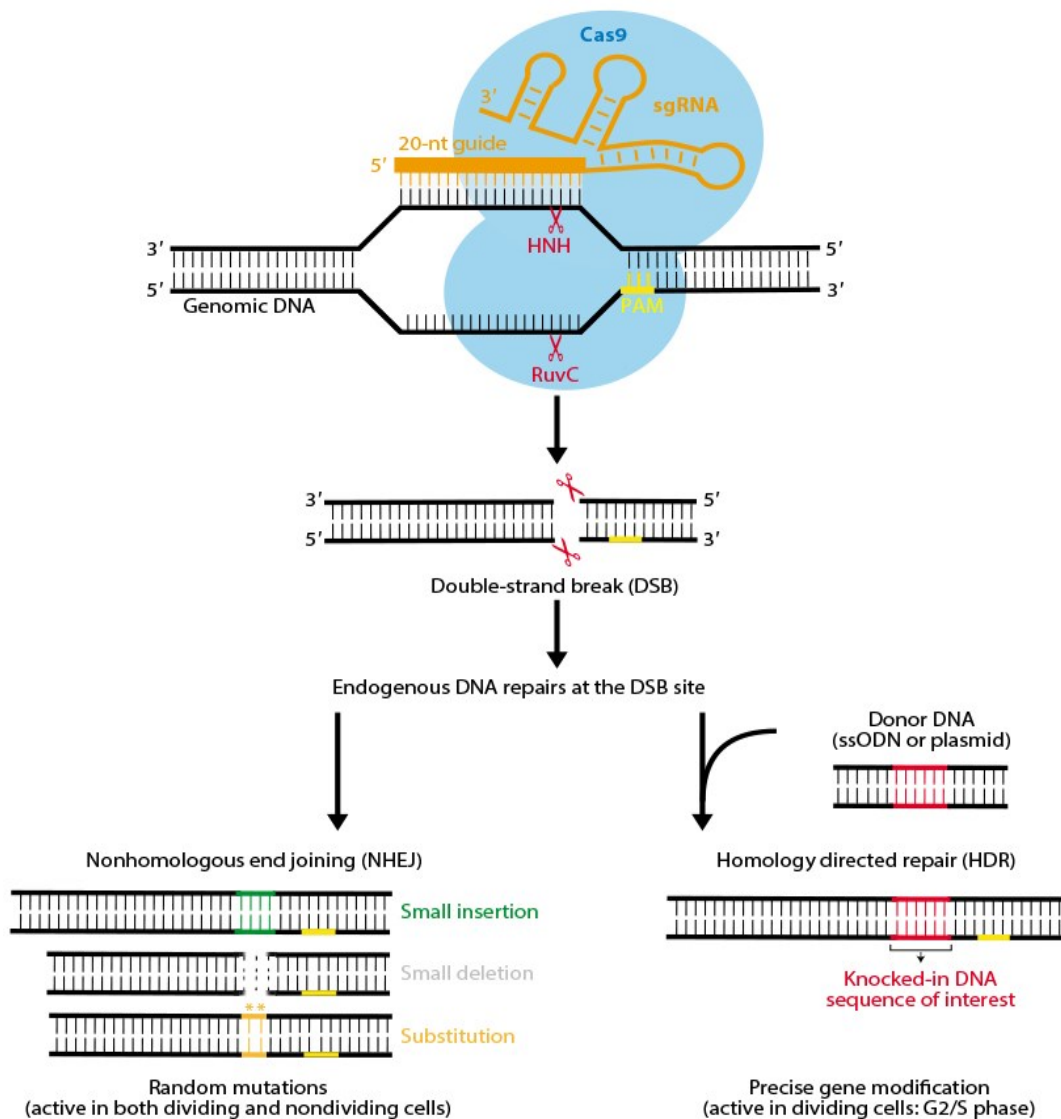


Figura 4. Schema funzionamento del sistema CRISPR-Cas9⁽⁵⁾

1.5 GENERAZIONE DI AMPIE DELEZIONI GENOMICHE ATTRAVERSO LA TECNICA CRISPR-Cas9

Questa tecnica differisce leggermente dalla classica CRISPR-Cas9 per il fatto che si vanno ad utilizzare due *sgRNA*, che riconoscono due siti specifici del DNA a doppio filamento, consentendo all'endonucleasi Cas9 di eseguire due tagli in regioni diverse del genoma, anche molto distanti tra loro. Quando poi il sistema di riparo della cellula interviene, le estremità dei due siti di taglio si legano tra loro generando una delezione di molte paia di basi, anche nell'ordine delle Kb o Mb (Kilobasi o Megabasi).⁽¹⁾

1.6 I MITOCONDRI

1.6.1 Il mitocondrio e le sue funzioni

I mitocondri sono degli organelli presenti nel citoplasma delle cellule eucariotiche. Essi sono composti da due membrane: una membrana esterna e una interna, tra le quali si trova lo spazio intermembrana; lo spazio delimitato dalla membrana interna è detto matrice mitocondriale. In particolare, la membrana interna si estende nella matrice formando delle pieghe dette creste mitocondriali. Il mitocondrio è poi dotato di un proprio genoma detto DNA mitocondriale.

Il mitocondrio svolge molte funzioni; la principale è la produzione di energia durante il processo di respirazione cellulare, ma esso è necessario anche per la regolazione dell'apoptosi, la regolazione del ciclo cellulare, la sintesi dell'eme e del colesterolo, la produzione di calore e la β -ossidazione degli acidi grassi.⁽⁹⁾

La disfunzione mitocondriale è associata all'invecchiamento e ad una pletera di disturbi metabolici, tra cui cancro, neurodegenerazione, diabete ed errori innati del metabolismo. Questi ruoli importanti per i mitocondri hanno portato a un'ampia ricerca utilizzando sistemi modello, che hanno fornito approfondimenti sulle attività mitocondriali e sul loro impatto sulla crescita, lo sviluppo e la fisiologia delle cellule e degli organismi. Nonostante questi sforzi, circa un quinto del proteoma mitocondriale rimane in gran parte non caratterizzato. Questo include molte proteine che sono altamente conservate in tutti gli organismi eucarioti, una forte indicazione del fatto che svolgono funzioni di fondamentale importanza.⁽¹⁰⁾

1.6.2 La fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa, fase finale della respirazione cellulare, è composta da due fasi: la prima consente di generare un gradiente di protoni attraverso una catena di trasportatori di elettroni, è localizzata nella membrana mitocondriale interna ed è formata da quattro complessi multiproteici chiamati complesso I (NADH deidrogenasi), complesso II (Succinato deidrogenasi), complesso III (Citocromo-c reduttasi) e complesso IV (Citocromo-c ossidasi); la seconda consente l'effettiva sintesi dell'ATP ad opera dell'enzima ATP sintasi, anche nota come complesso V.

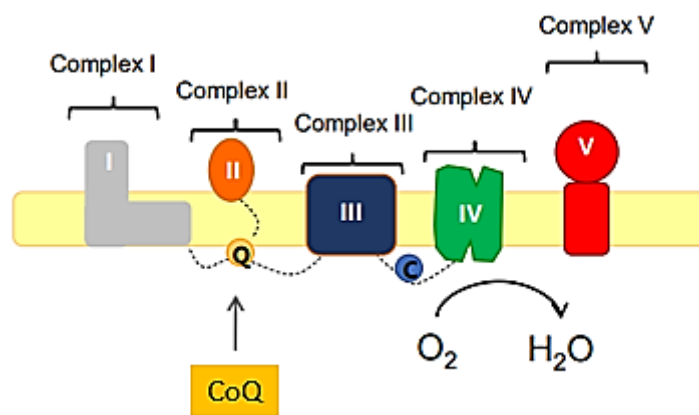


Figura 5. Schema della catena respiratoria mitocondriale.

1.6.3 Il CoQ

Il Coenzima Q (CoQ) o Ubichinone (UQ) è un lipide composto da una lunga coda poliisoprenica, che gli conferisce un'estrema idrofobicità, e una testa chinonica, che consente l'azione di ossidoriduzione dei substrati. L'attività di ossidoriduzione permette al CoQ di funzionare come cofattore di numerosi enzimi, inclusi quelli della catena di trasporto elettronica; in particolare, il CoQ trasporta elettroni dal complesso I e dal complesso II al complesso III.

La lunghezza della coda poliisoprenica differisce da specie a specie per il numero di unità isopreniche presenti, che generalmente viene scritto come pedice (ad esempio nell'uomo viene prodotto maggiormente il CoQ₁₀, un coenzima Q con 10 unità isopreniche).⁽¹¹⁾

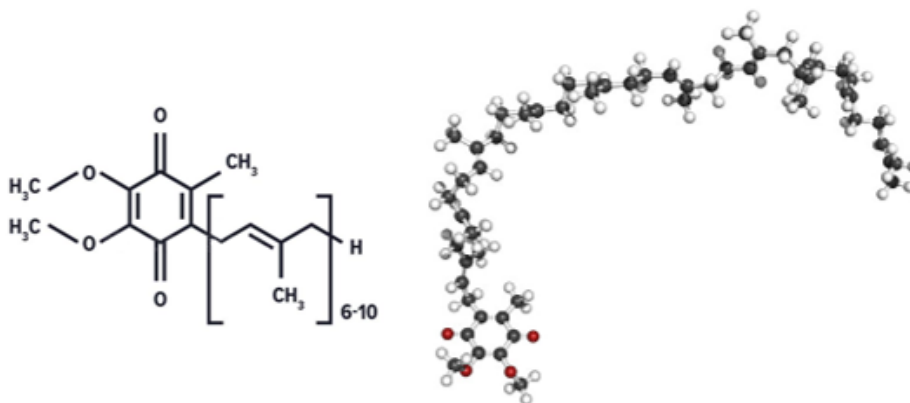


Figura 6. Formula chimica e struttura del Coenzima Q.

Il CoQ viene sintetizzato nel mitocondrio di tutte le cellule da un gruppo d'enzimi non completamente caratterizzati.

La famiglia di proteine ADCK, (*aarf domain containing kinase*) ha caratteristiche strutturali comuni alle serina/treonina chinasi o alle tirosin chinasi e presenta un dominio transmembrana. Nell'uomo sono presenti 5 proteine ADCK e in particolare ADCK2, ADCK3 e ADCK4 sono coinvolte nella sintesi di CoQ, mentre il ruolo di ADCK1 e ADCK5 è sconosciuto.⁽¹²⁾

Mutazioni nei geni nucleari che codificano per le proteine responsabili della biosintesi del CoQ causano una deficienza primaria del CoQ, un gruppo di disordini multisistemici ad esordio pediatrico caratterizzati da bassi livelli di ubiquinone nei tessuti.⁽¹³⁾

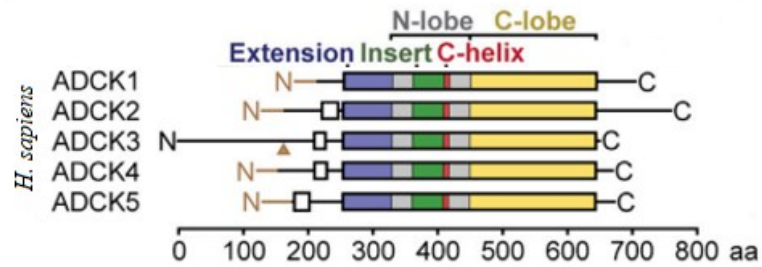


Figura 7. Struttura dei domini delle proteine ADCK. Il quadrato corrisponde al dominio transmembrana.⁽¹⁴⁾

1.6.4 ADCK1

La proteina ADCK1 è codificata dal gene *ADCK1*, localizzato nel braccio lungo del cromosoma 14 in posizione 14q24.3 (GRCh37/hg19).

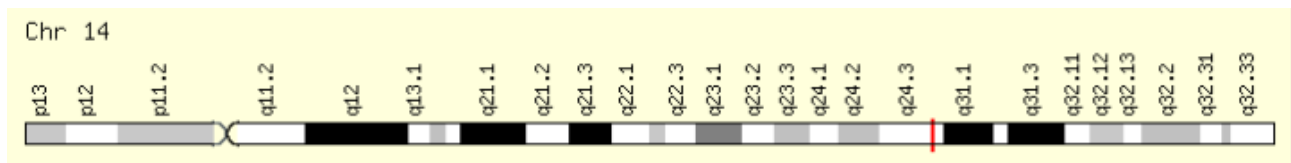


Figura 8. Localizzazione cromosomica di ADCK1 ([ADCK1 Gene - GeneCards](#) | [ADCK1 Protein](#) | [ADCK1 Antibody](#)).

Il gene presenta 8 varianti trascrizionali di cui solo due sono codificanti; in particolare, la variante trascrizionale 1 presenta 11 esoni per un totale di 523 aminoacidi, mentre la variante trascrizionale 2 presenta 10 esoni, poiché manca l'esone 4, per un totale di 455 aminoacidi.

La funzione di ADCK1 non è ancora stata ben definita; in letteratura, infatti, sono presenti scarse informazioni relative a questa proteina. In particolare, sono stati eseguiti studi sui moscerini della frutta (*Drosophila melanogaster*), sulle cellule di mammifero e sull'uomo. In questi studi si è osservato che in *Drosophila* ADCK1 consente il mantenimento della struttura delle creste mitocondriali e della struttura e funzione del sistema muscolare. I moscerini con carenza di ADCK1 mostrano difetti di sviluppo, strutture alari anormali, disabilità di volo e diminuzione delle attività locomotorie.⁽¹²⁾

Nell'uomo si è studiato il ruolo di ADCK1 in pazienti con carcinoma del colon e si è osservato che la proteina promuove la formazione di tumori e di metastasi *in vivo*. In particolare, sembra che ADCK1 attivi la via di segnalazione β -catenina/Wnt, la quale promuove l'invasione cellulare e la crescita delle cellule indipendentemente dalla presenza di un ancoraggio, indicando che la proteina favorisce la progressione delle cellule tumorali in fenotipi maligni.⁽¹⁵⁾

ADCK1 sembra anche avere un ruolo di oncogene nello sviluppo del carcinoma paratiroideo.⁽¹⁶⁾ Inoltre, sembra che i polimorfismi genetici in *ADCK1* siano strettamente correlati alla schizofrenia e

possano essere utilizzati per prevedere gli effetti curativi del Paliperidone, un farmaco per il trattamento di questo disturbo.^(15,17)

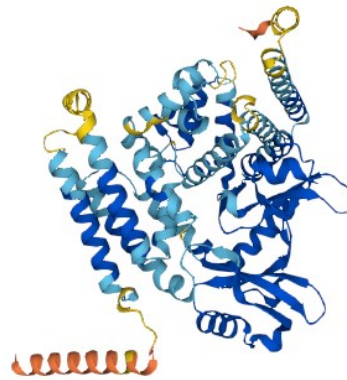


Figura 9. Struttura tridimensionale della proteina ADCK1 ([ADCK1 - AarF domain-containing protein kinase 1 - Homo sapiens \(Human\) | UniProtKB | UniProt](#)).

2. SCOPO DELLA TESI

La sintesi di CoQ nell'uomo è un processo poco conosciuto. La famiglia di proteine ADCK è composta da 5 membri: ADCK 1-5. Mentre ADCK2, ADCK3 ed ADCK4 sono coinvolte nella biosintesi del CoQ, la funzione di ADCK1 e ADCK5 nell'uomo non è mai stata studiata.

Lo scopo della tesi è generare cellule HEK (Human Embryonic Kidney) 293 *knock-out* per il gene *ADCK1* attraverso una variazione del sistema CRISPR-Cas9 che consente di generare grandi delezioni genomiche. In questo modo si potrà creare un modello cellulare che permetta di indagare le funzioni di ADCK1 all'interno della cellula e comprendere se una mutazione in questo gene possa essere in qualche modo connessa ad un'alterazione della sintesi del CoQ.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Le cellule HEK293 sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) con glucosio ad una concentrazione di 4,5 g/L, supplementato con il 10% di Siero Fetale Bovino (FBS, (Gibco)) scomplementato, l'1% di L-glutamina (Gibco), l'1% di sodio piruvato, l'1% di Penicillina/Streptomicina (Invitrogen) e lo 0,1% di Uridina. Le cellule sono state seminate in fiasche di opportuna dimensione e mantenute in coltura in incubatore ad una temperatura di 37°C, con 5% CO₂. I lavaggi sono stati eseguiti con PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer 1X. Le cellule sono state poi staccate dalla fiasca utilizzando Tripsina-EDTA (0,05%) con rosso fenolo (Gibco).

3.2 Conteggio delle cellule con la camera di Burker

Le cellule sono state staccate dalla fiasca utilizzando Tripsina-EDTA (0.05%) e successivamente risospese in DMEM in una Falcon da 15mL. Per contare le cellule con la camera di Burker, si agita bene la sospensione cellulare evitando la formazione di bolle e schiuma. Per la conta delle cellule vitali, le cellule sono state diluite 1:1 con Trypan blue (Sigma Aldrich). Il colorante diffonde solo nelle cellule la cui permeabilità di membrana è fortemente danneggiata, il che indica che le cellule colorate in blu devono essere escluse della conta perché sono cellule morte. Sono stati prelevati 10μL di campione da contare e posti in un settore della cameretta di Burker. Al microscopio ottico sono state contate le cellule vive contenute nei quadrati disposti sulle diagonali della camera (Fig.5). Con il numero così ottenuto è stato calcolato il numero di cellule presenti in 1 mL di sospensione cellulare, con la seguente formula:

$$N_{cell} / mL = \{[(N_{cell} : 4) : 24] \times 2\} \times 10^6$$

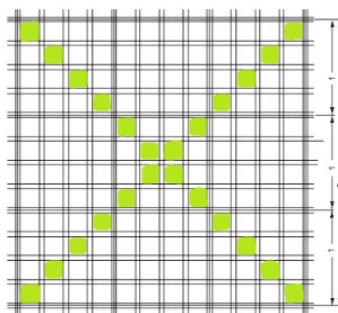


Figura 10. Schema cameretta di Burker. In verde sono evidenziate le due diagonali.

3.3 Curva di mortalità cellulare con Puromicina

Il giorno prima di iniziare il trattamento con l'antibiotico le cellule sono state staccate e contate come precedentemente descritto. Successivamente sono state seminate 250'000 cellule per pozzetto in una multiwell da 6 (VWR), in un volume finale di 3mL di terreno per pozzetto e mantenute in coltura nelle condizioni precedentemente descritte per 24 ore.

Il giorno seguente sono state valutate le cellule al microscopio ottico affinché avessero una confluenza ideale del 70%. È stato cambiato il terreno di coltura aggiungendo per ogni pozzetto del DMEM con una concentrazione crescente (1- 10µg/mL) di Puromicina (Invitrogen); le piastre sono state poste nuovamente in incubatore.

Ogni due giorni è stato cambiato il terreno mantenendo le medesime concentrazioni di antibiotico. A sette giorni dall'inizio del trattamento sono state valutate le cellule trattate con le diverse concentrazioni di antibiotico ed è stata scelta come ottimale la minima concentrazione di antibiotico tale per cui tutte le cellule risultavano essere morte.

3.4 Criteri per il disegno delle gRNAs

Per il disegno della sgRNA da inserire all'interno del vettore, è necessario massimizzare l'efficienza di legame *on-target* e minimizzare il legame della guida in regioni *off-target*.

I criteri seguiti dalle compagnie per il disegno delle *gRNA* sono:

- Lunghezza del *crRNA* di circa 17-20 nucleotidi seguiti da una specifica sequenza PAM (generalmente 5'-NGG-3').⁽⁷⁾
- Sequenza della *gRNA* deve essere univoca e avere il minor numero possibile di similitudini con altri siti non specifici.
- Localizzazione, distribuzione e numero dei *mismatches* rispetto ai siti *off-target*: il numero di mismatches dovrebbe essere maggiore di tre; devono essere presenti almeno due mismatches nella regione prossimale alla PAM nel sito *off-target*; i mismatches presenti dovrebbero essere consecutivi o intervallati da sequenze non mutate, minori di 4 pb.⁽¹⁸⁾
- Contenuto in CG: *gRNA* con contenuto in CG molto elevato ($\geq 80\%$) può portare ad una migliore ibridazione e aumento della stabilità dell'interazione tra la *gRNA* e il DNA *target* anche in presenza di *mismatch*; *gRNA* con contenuto in CG molto basso ($\leq 35\%$) invece porta ad una ridotta stabilità di interazione tra le basi che è necessaria per la stabilità di legame e l'attività stessa della *gRNA*;
- Espressione della *gRNA* e della *Cas9*: un'elevata espressione di *Cas9* può portare all'aumento di effetti *off-target* e la concentrazione considerata ottimale, dipende dalla potenza della *gRNA*.⁽⁷⁾

La ditta dalla quale si acquistano le gRNAs normalmente garantisce che tali guide abbiano elevati *score on-target* e *off-target*.

L'*on-target score* è un valore da 0 a 100 che indica l'efficienza delle *gRNA*, ossia quanto bene la guida si lega al sito target, e quindi, anche con quanta efficienza taglia l'endonucleasi *Cas9*; maggiore è il valore, maggiore sarà l'efficienza.

L'*off-target score* è un valore da 0 a 100 che indica la specificità delle *gRNA* ossia la sua capacità di riconoscere solo il sito target; maggiore è il valore, maggiore sarà la specificità.

3.4.1 Descrizione dei vettori di espressione

Sono stati acquistati vettori di espressione transEDIT™ pCLIP-ALL-EFS (transOMIC) (Tab. 1) sottoforma di stock batterici. Questi sono batteri *E. coli* trasformati con il plasmide di interesse che fornisce loro resistenza alla Carbenicillina (analogo dell'Ampicillina).

Il plasmide è composto da (Fig. 6):

- Gene di resistenza all'Ampicillina/Carbenicillina per la selezione del batterio correttamente trasformato
- Gene di resistenza alla Puromicina per la selezione della cellula correttamente trasfettata
- Gene che codifica per l'endonucleasi Cas9
- Gene che codifica per il gRNA

Nome plasmide	Caratteristiche	Score
TEVH-1203833 (gRNA1)	Gene: ADCK1 Specie: Homo sapiens Sequenza: CGTGAAGGTCCAGCACCCAA Vettore di destinazione: pCLIP-ALL-EFS-Puromycin	<i>On-target</i> : 64,4 <i>Off-target</i> : 75.9
TEVH-1069549 (gRNA2)	Gene: ADCK1 Specie: Homo sapiens Sequenza: AATCCACTGGGACCTGTCCA Vettore di destinazione: pCLIP-ALL-EFS-Puromycin	<i>On-target</i> : 61,8 <i>Off-target</i> : 59.9
TEVH-1136691 (gRNA3)	Gene: ADCK1 Specie: Homo sapiens Sequenza: CTTAGAGATTCGCAACAACG Vettore di destinazione: pCLIP-ALL-EFS-Puromycin	<i>On-target</i> : 69,3 <i>Off-target</i> : 92,6
TELA1011	Gene: Negative Control Specie: Homo sapiens Sequenza: GGAGCGCACCATCTTCTTCA Vettore di destinazione: pCLIP-ALL-EFS-Puromycin	

Tabella 1. Elenco plasmidi acquistati dalla Transomic con sequenza del gRNA e Score ottenuti dal sito ([Editor · Benchling](#)).

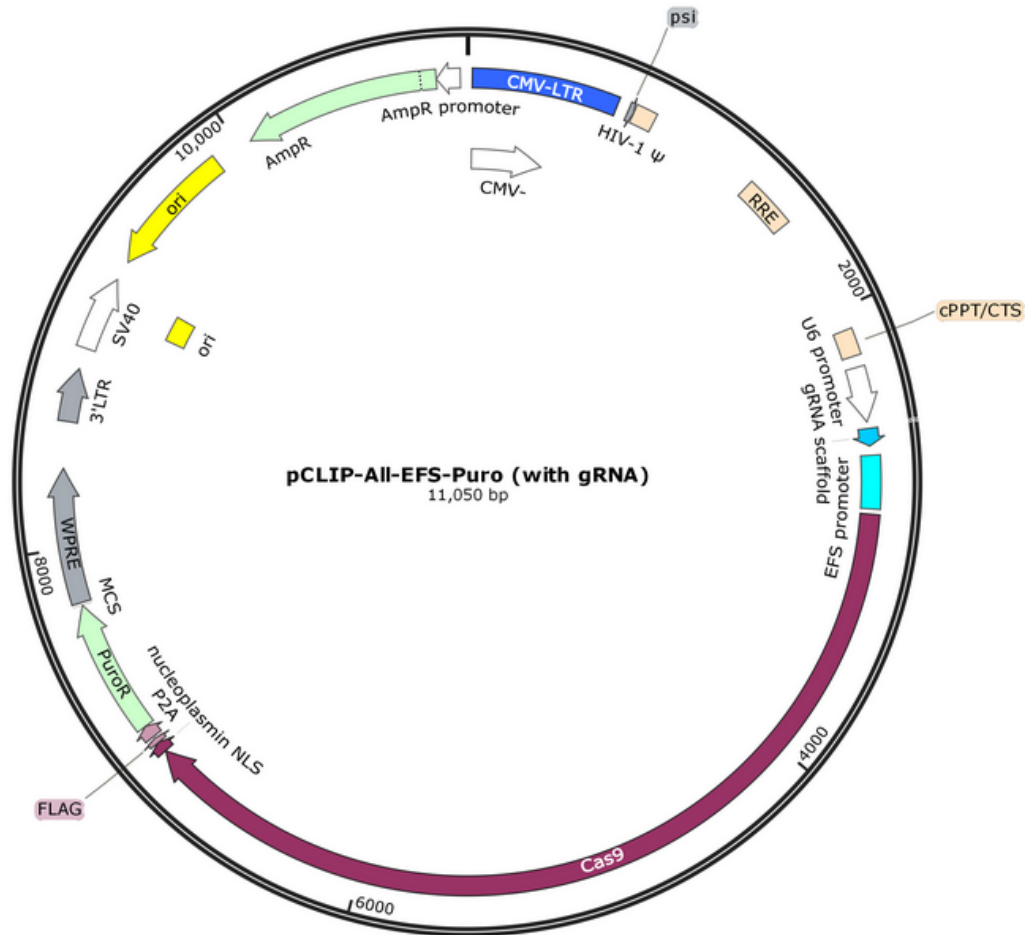


Figura 11. Mappa del vettore che codifica per il gRNA e la Cas9 (TransOmic).

3.4.2 Inoculo batteri

Per amplificare i vettori sono stati amplificati i batteri acquistati alla TransOMIC. Il protocollo utilizzato per l'inoculo batterico è il seguente:

- In una provetta per batteri da 12mL, sono stati aggiunti 3mL di LB (brodo di lisogenia, terreno a base di triptone ed estratto di lievito).
- Sono stati aggiunti poi 3μL Ampicillina 1000X.
- Dallo stock di batteri conservati a -80°C, sono stati prelevati, con il puntale sterile, i batteri raschiando la superficie congelata dalla provetta.
- È stato risospeso il materiale prelevato dentro all'LB e Ampicillina, lasciando poi il puntale dentro alla provetta.
- Sono stati incubati i batteri in incubatore a 30°C per 16-18 ore in agitazione (230 rpm).

3.4.3 Purificazione dei plasmidi (Miniprep)

Il giorno seguente, è stato isolato il DNA plasmidico dai batteri usando il QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il DNA estratto è stato poi quantificato utilizzando Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Il NanoDrop fornisce informazioni riguardo la concentrazione del DNA in ng/ μ L; permette inoltre di effettuare un'analisi qualitativa mediante i rapporti di assorbanza 260/280 (indice relativo alla contaminazione da proteine) e 260/230 (relativo alla contaminazione da solventi come carboidrati e fenoli).

3.5 Trasfezione transiente

Il giorno precedente alla trasfezione le cellule HEK 293 sono state staccate e contate, come descritto precedentemente, per piastrarne 250'000 per pozzetto in una multiwell da 6 pozzetti (VWR). Il giorno seguente le cellule, al 70% di confluenza circa, sono state trasfettate con lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Invitrogen) secondo il seguente protocollo:

- Dalla multiwell da 6 pozzetti è stato rimosso il DMEM e aggiunti 1,3mL Opti-MEM™ Reduced Serum Media (Gibco™).
- Sono state preparate due Eppendorf da 1.5 mL per ogni coppia di vettori utilizzati
 1. 100 μ L Opti-MEM
12 μ L Lipofectamina
 2. 100 μ L Opti-MEM
2 μ g Plasmide (1 μ g di ogni vettore)
- Dopo 5 minuti, è stato unito il contenuto delle due Eppendorf.
- Dopo 30 minuti, il mezzo di trasfezione ottenuto è stato aggiunto uniformemente, goccia a goccia, nei pozzetti.
- Le piastre sono state poi poste in incubatore 37°C 5%CO₂ per 7 ore.
- Trascorso questo tempo l'Opti-MEM™ contenuto nei pozzetti è stato sostituito con normale DMEM e la piastra riposta nuovamente in incubatore.

Dopo 48 ore dalla trasfezione, a seguito di una valutazione visiva delle cellule per confermarne la vitalità, è stato cambiato il terreno e sono stati aggiunti, in ogni pozzetto, 3mL di DMEM con la concentrazione di Puromicina ottimale precedentemente definita, così da selezionare solo le cellule che hanno incorporato il vettore plasmidico.

Al quinto giorno di selezione sono state staccate le cellule dalla multiwell e sono state passate in una fiasca T75 per proseguire la selezione per altri due giorni.

Finita la selezione, le cellule vive sono state amplificate mettendole in coltura con DMEM senza Puromicina.

3.6 Colonie cellulari derivanti da una singola cellula

Le cellule selezionate in antibiotico, sono state staccate le cellule, e successivamente contate e risospese in DMEM. Sono state diluite con diluizioni seriali fino ad ottenere una concentrazione finale di 1 cellula in 10 μ L utilizzando il seguente protocollo:

- Sono stati aggiunti 190 μ L DMEM per ogni pozzetto di una multiwell da 96.
- Sono state preparate tre Eppenderf (E1, E2, E3) da 1.5mL.
- In E1, dopo aver contato le cellule, sono state diluite le cellule in modo da ottenere una concentrazione di 100 cell/ μ L in un volume finale di 1 mL DMEM.
- In E2 sono stati aggiunti 10 μ L di soluzione E1 e 990 μ L DMEM così da ottenere una concentrazione di 1 cell/ μ L.
- In E3 sono stati aggiunti 100 μ L di soluzione E2 e 900 μ L DMEM così da ottenere la concentrazione desiderata di 1 cell in 10 μ L.
- Sono stati aggiunti 10 μ L di soluzione E3 in ogni pozzetto della multiwell.
- Sono state riposte le piastre in incubatore a 37°C con 5%CO₂.

Il giorno seguente sono stati valutati tutti i pozzetti scartando tutti quelli vuoti o che contengono più di una cellula. Una volta arrivate a confluenza le cellule sono state staccate e passate in una multiwell da 12 pozzetti; raggiunta la confluenza sono state poi nuovamente staccate e passate in fiasca T25, fino al raggiungimento di una confluenza ottimale dell'80%.

A questo punto 1/3 delle cellule contenute nella fiasca sono state congelate e dalla porzione rimanente si è stratto il DNA.

3.7 Preparazione del pellet cellulare

È stato utilizzato il seguente protocollo per ottenere il pellet cellulare:

- Le cellule sono state staccate e risospese in DMEM in una Falcon da 15mL
- Sono state centrifugate a 2200 rpm per 5 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C svuotando il surnatante.
- Sono state lavate con 5mL PBS risospesando bene le cellule.
- Sono state centrifugate a 2200 rpm per 5 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C svuotando il surnatante.
- Sono state congelate le cellule a -20°C per futuri utilizzi (in particolare estrazione di proteine o di DNA).

3.8 Estrazione rapida di DNA

Per l'estrazione del DNA si procede con i seguenti punti:

- Sono state risospese le cellule con 300 μ L TE (Tris-EDTA) buffer (Invitrogen) e spostata la soluzione in una Eppendorf da 1.5 mL.
- Sono state poste le Eppendorf in termoblock a 100°C per 10 minuti e successivamente in ghiaccio per 5 minuti.
- Sono state centrifugate a 2000g per 2 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C
- È stato prelevato il surnatante e posto in una Eppendorf da 1,5mL scartando il pellet di detriti.
- In ogni Eppendorf è stato aggiunto 1 μ L di proteinasi K e sono state incubate le provette a 37°C per 1 ora.
- Sono state poste le Eppendorf in termoblock a 100°C per 10 minuti per disattivare l'enzima e successivamente in ghiaccio per 5 minuti.
- È stata eseguita una centrifugazione rapida
- È stato quantificato il DNA ottenuto utilizzando il Nanodrop 2000 e conservato in Eppendorf a -20°C.

3.9 Screening delle colonie per la presenza di delezioni

Per lo screening delle colonie, per verificare la presenza della delezione di interesse, è stata utilizzata una reazione di PCR. Dapprima si è eseguita una PCR per rilevare le colonie senza la delezione e successivamente, le colonie risultate negative, sono state sottoposte a una PCR per rilevare la presenza di delezioni.

Per ogni colonia da analizzare è stata preparata una Eppendorf da 0,2mL in cui sono stati posti 20 μ L di Mix composta come segue:

Reagenti	Volume per una reazione di PCR	Concentrazione finale
Acqua Nuclease-free	a 20 μ L	
10X PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)	2 μ L	1X
25 mM MgCl ₂	1,8 μ L	0,9mM
10 mM dNTPs	0,4 μ L	200 μ M
10 μ M Forward Primer	0,8 μ L	0,5 μ M
10 μ M Reverse Primer	0,8 μ L	0,5 μ M
Templato	1 μ L	70ng/ μ L
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD Hot Start (Applied Biosystems)	0,1 μ L	1.25 Units/reaction

Tabella 2. Master Mix per PCR AmpliTaq Gold®.

Successivamente le Eppendorf da 0,2mL sono state poste nel termociclatore dove è avvenuta la reazione di PCR con i seguenti cicli:

Step	Temperatura	Tempo	
		(Non-deleta)	(deleta)
Denaturazione iniziale	95°C	5 minuti	5 minuti
Denaturazione	95°C	15 secondi	15 secondi
Annealing	57,9°C	15 secondi	15 secondi
Estensione	72°C	20 secondi	25 secondi
Estensione finale	72°C	7 minuti	7 minuti
	4°C	∞	∞

} 35 cicli

Tabella 3. Programma termociclatore per PCR AmpliTaq Gold® nell'esperimento 1.

Step	Temperatura	Tempo	
		(Non-deleta)	(deleta)
Denaturazione iniziale	95°C	5 minuti	5 minuti
Denaturazione	95°C	15 secondi	15 secondi
Annealing	59°C	15 secondi	15 secondi
Estensione	72°C	50 secondi	17 secondi
Estensione finale	72°C	7 minuti	7 minuti
	4°C	∞	∞

} 35 cicli

Tabella 4. Programma termociclatore per PCR AmpliTaq Gold® nell'esperimento 2.

Terminata la reazione di PCR, gli ampliconi ottenuti sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio 1% utilizzando il Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe) come intercalante del DNA e il TAE 1X come buffer di corsa. Andando ad osservare la presenza o meno di una banda di peso molecolare noto, grazie all'aiuto di un marker di peso molecolare, sarà possibile identificare rispettivamente quali colonie non presentano o presentano la delezione.

I primers che sono stati utilizzati nelle reazioni di PCR sono i seguenti:

	Primer	Sequence
PCR non-deleta (esperimento 1)	Forward → 106-F (introne 6 ADCK1)	CTCCTGGGCCTCTTCTCC
	Reverse → 106-R (introne 7 ADCK1)	CTTGACCAAGCCCACGTT
PCR non-deleta (esperimento 2)	Forward → int5-F (introne 5 ADCK1)	GAAACAAGCCTGCACATCCT
	Reverse → int6-F (introne 6 ADCK1)	GATGATGGCGATGCTGATAG
PCR deleta (esperimento 1)	Forward → 120-F (introne 4 ADCK1)	GGGTCATCTTTTTTCATTGCTC
	Reverse → 113-R (introne 10 ADCK1)	GCTAGGAGGGGAGGAGAGG
PCR deleta (esperimento 2)	Forward → 120-F (introne 4 ADCK1)	GGGTCATCTTTTTTCATTGCTC
	Forward → 106-R (introne 7 ADCK1)	CTTGACCAAGCCCACGTT

Tabella 5. Primers utilizzati per visualizzare rispettivamente l'assenza della delezione (PCR non-deleta) e confermare la presenza della delezione (PCR deleta).

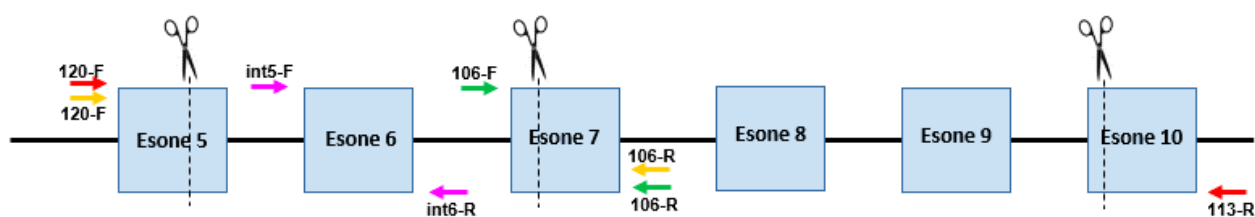


Figura 12. Schema dell'allineamento dei primers descritti in tabella 4 e dei siti di taglio della Cas9.

I primers sono stati disegnati utilizzando il software Primer 3 Plus ([Primer3Plus \(bioinformatics.nl\)](http://Primer3Plus(bioinformatics.nl))) impostando come caratteristiche ottimali una lunghezza compresa tra 18-27 pb, una temperatura di melting compresa tra 57-63°C e contenuto in CG% di circa 55%, e con minimi valori di auto-complementarietà.

La temperatura di *annealing* invece è stata scelta utilizzando il software Tm Calculator Thermo Fisher Scientific (Tm Calculator | Thermo Fisher Scientific - IT).

3.10 Sequenziamento Sanger

3.10.1 Purificazione PCR

Sono state purificate le PCR precedentemente ottenute ponendo in una Eppendorf da 0,2mL:

- 5µL di PCR
- 2µL Exo-Pro-Star Illustra

Successivamente è stata inserita la provetta in un termociclatore con il seguente programma:

Step	Temperatura	Tempo
Azione enzima	37°C	15 minuti
Inattivazione enzima	80°C	15 minuti

Tabella 6. Programma termociclatore per purificazione PCR.

3.10.2 Big Dye

In questa fase viene preparata una mix di reazione contenete i dNTPs e i terminatori di catena (ddNTPs) necessari per il sequenziamento Sanger. In particolare, i 7 μ L di volume totale ottenuto con la purificazione della PCR (3.10.1), sono stati divisi in due mix di reazione (3,5 μ L campione in ogni mix).

La mix di reazione per la Big Dye è la seguente:

Reagenti	Volume per 1 reazione
Buffer 5X (Applied Biosystem)	3 μ L
Campione	3,5 μ L
Primer (10 μ M)	0,6 μ L
BigDye™ Terminator (Applied Biosystem)	3 μ L
Nuclease-free water	9,9 μ L

Tabella 7. Mix di reazione per Big Dye.

Le due mix differiscono per il *primer* in esse contenuto; infatti, in una è presente il *primer* 120-F (sia nell'esperimento 1 che nel 2) (Tab. 5) e nell'altra il *primer* 113-R (esperimento 1) e 106-R (nell'esperimento 2) (Tab. 5) così da sequenziare i segmenti amplificati in entrambe le direzioni, *forward* e *reverse*, per avere una maggiore copertura ed una maggiore sicurezza nei risultati ottenuti.

Il programma del termociclatore utilizzato è il seguente:

Temperatura	Tempo
96°C	10 secondi
50°C	5 secondi
60°C	2 minuti
4°C	∞

Tabella 8. Programma termociclatore per Big Dye.

3.10.3 Injection e sequenziamento

I prodotti così ottenuti sono stati purificati con Centrisep™ Spin Columns (Applied Biosystem). Sono state poi preparate le injections inserendo in ogni pozzetto di una multiwell da 96:

- 10 μ L Hi-Di™ Formamide (Invitrogen)
- 10 μ L di campione purificato

e sequenziati i campioni con AppliedBiosystem 3500.

Le sequenze ottenute sono state lette con il programma FinchTV e confrontate con la sequenza di riferimento GRCh37 / hg19 ([UCSC Genome Browser Home](#)) per poter identificare dove è avvenuta la delezione e se questa fosse in frame o out of frame.

3.11 SDS-PAGE e Western blot

3.11.1 Estrazione delle proteine totali

L'estrazione è iniziata a partire dal pellet cellulare e procedendo poi con il seguente protocollo:

- È stato preparato il buffer aggiungendo 196 μ L di CHAPS, 2 μ L di inibitore di proteasi (100X) e 2 μ L di inibitore di fosfatasi (100X) per ogni campione da estrarre.
- In una Eppendorf da 1,5 μ L è stato risospeso il pellet cellulare con 200 μ L di soluzione.
- Sono state incubate le Eppendorf in ghiaccio per 20 minuti.
- Sono state centrifugate a 600g per 10 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C.
- Sono stati prelevati 200 μ L di surnatante e sono stati posti in una nuova Eppendorf da 1,5mL.
- Le proteine così ottenute possono essere lasciate in ghiaccio per la quantificazione proteica e la preparazione del campione, oppure conservate a -20°C.

3.11.2 Quantificazione delle proteine con BCA

Sono state preparate 5 Eppendorf da 1,5mL per la curva di taratura, due Eppendorf da 1,2mL per i bianchi e due Eppendorf da 1,5mL per ciascun campione di proteine da quantificare inserendo in ciascuna le seguenti quantità di soluzione:

Standard	Bovine Serum Albumin (BSA) 2mg/mL	H ₂ O
1 (2 μ g/ μ L)	1 μ L	49 μ L
2 (4 μ g/ μ L)	2 μ L	48 μ L
3 (6 μ g/ μ L)	3 μ L	47 μ L
4 (8 μ g/ μ L)	4 μ L	46 μ L
5 (10 μ g/ μ L)	5 μ L	45 μ L

	Buffer	H ₂ O
Bianco	1 μ L	49 μ L

	Proteine	H ₂ O
Campione	1 μ L	49 μ L

Tabella 9. Tabelle dei volumi necessari per la quantificazione delle proteine con BCA assay.

In una falcon è stato preparato il *working reagent* (WR) aggiungendo 50 parti di soluzione A e 1 parte di soluzione B, calcolando come volume finale 1mL per ogni eppendorf.

Successivamente sono stati aggiunti in ogni eppendorf 950 μ L di WR, sono state poi mescolate per inversione e incubate in bagnetto termostato a 60°C per 30 minuti.

Infine, sono state quantificate le proteine (μ g/ μ L) allo spettrofotometro leggendo l'assorbanza a 562nm.

3.11.3 Preparazione dei campioni

Sulla base della quantificazione, secondo i calcoli riportati in tabella (Tab.9), in una eppendorf da 1,5mL, sono stati preparati i campioni per il western blot tenendo in considerazione che la quantità iniziale ottimale di proteine da caricare in un pozzetto è di circa 30µg.

Media (µg/µL)	30µg proteine (µL)	Buffer (a 12µL)	βmercapto-etanolo (4X)
$\frac{\text{Misurazione 1} + \text{Misurazione 2}}{2}$	$\frac{30 \mu\text{g}}{\text{Media } \mu\text{g}/\mu\text{L}}$	12µL – proteine µL	4µL

Tabella 10. Formule e volumi per la preparazione di 1 campione.

Le Eppendorf sono state poste in termoblocco per 10 minuti a 100°C così da denaturare le proteine.

3.11.4 Corsa su Gel SDS-Page

- È stato preparato il *Running Buffer*, utilizzando 25mL NuPage MOPS SDS Running Buffer (20X) e 475mL di H₂O milliQ e successivamente posto nell'apposita vaschetta di corsa.
- Sono stati caricati 16µL di campione in ogni pozzetto del gel precast Invitrogen™ NuPage™ 4-12% Bis-Tris MOPS.
- È stato caricato il marker Novex™ Sharp pre-stained protein standard (Invitrogen)
- È stato corso il gel per 1ora e 30 minuti a 120V.

3.11.5 Trasferimento su membrana

- È stato preparato il *Transfer buffer* aggiungendo 50mL di Metanolo (10X), 25mL di NuPage Transfer Buffer (20X) e 425ml di H₂O milliQ.
- È stata tagliata PVDF (polivinilidenefluoruro) Blotting Membrane (Amersham™ Hybond™) e attivata per 1 minuto in agitazione con Metanolo.
- Sono state imbibite le spugnette e le carte filtro con il buffer
- È stata montata la struttura per il trasferimento nel seguente ordine (Fig.13):
 - Spugnette
 - Carta filtro
 - Membrana in nitrocellulosa
 - Gel
 - Carta filtro
 - Spugnette
- È stato corso per 1ora e 30 minuti a 30V

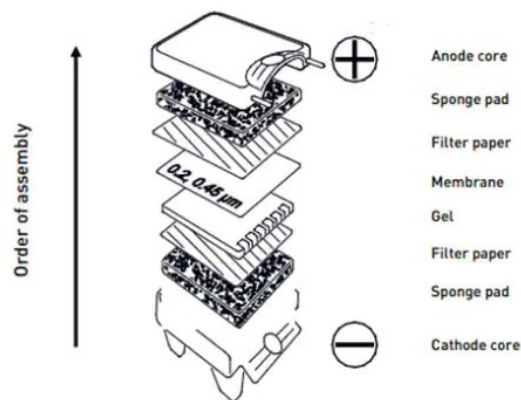


Figura 13.Ordine di assemblaggio per trasferimento. (Life technologies™, Mini Blot Module).

3.11.6 Incubazione con Anticorpi

- È stata preparata la *Blocking solution* aggiungendo in una falcon da 50mL 1g di siero-albumina bovina 2%, 5mL di TBS (Tris-buffered saline) (10X), 50μL di Tween (0,1%) e portando a volume con H₂O.
- È stata posta la membrana in *Blocking solution* per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente.
- È stata tagliata la membrana in pezzi sulla base del peso molecolare delle proteine di interesse.
- Sono state incubate le membrane con Anticorpo primario specifico over-night a 4°C oppure 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.

ADCK1	β-Actina (Loading Control)
LS Bio α-ADCK1 rabbit α-human diluizione 1:1000	Sigma Aldrich α-β-Actina mouse α-human diluizione 1:50'000

Tabella 11. Anticorpi primari.

- Sono stati eseguiti tre lavaggi da 10 minuti con TBS-Tween (1X).
- Sono state incubate le membrane con gli Anticorpi secondari specifici.

ADCK1	β-Actina (Loading Control)
Chicken α-rabbit diluizione 1:10'000	Goat α-mouse diluizione 1:10'000

Tabella 12. Anticorpi secondari.

- Sono stati eseguiti tre lavaggi da 10 minuti con TBS-Tween (1X).

3.11.7 Visualizzazione della membrana all'iBright™ 1500 (Thermo Fisher)

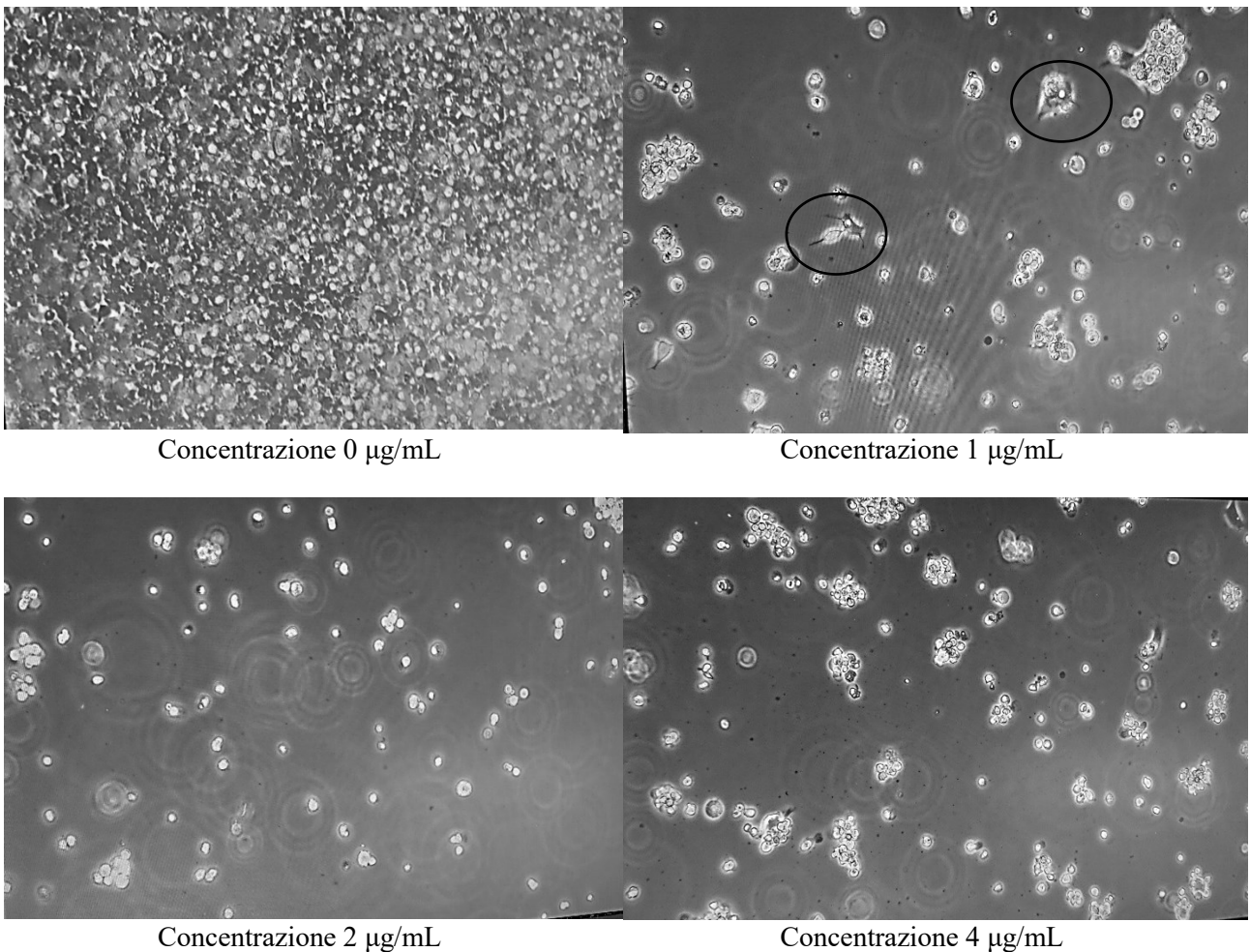
- È stata preparata la soluzione per la visualizzazione della membrana aggiungendo in una falcon da 15mL 2mL di Luminol Enhancer (Euroclone) e 2mL di Peroxide buffer (Euroclone).
- Sono state cosparse le membrane con la soluzione e successivamente visualizzate all'iBright™ 1500 (Thermo Fisher).

4. RISULTATI

Attraverso una curva di mortalità cellulare è stata identificata la minima concentrazione di antibiotico Puromicina che consentisse la selezione delle sole cellule trasfettate e, di conseguenza, garantisse invece la morte di tutte quelle non trasfettate. A questo scopo, cellule HEK293 *wt* sono state piastrate e poste in coltura per 7 giorni con diverse concentrazioni di antibiotico.

Una prima selezione è stata eseguita con concentrazioni di Puromicina in un range compreso tra 1 e 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Già ad una concentrazione minima di 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, le cellule risultavano essere quasi completamente morte, con l'eccezione di qualche cellula che era ancora viva e adesa al fondo della piastra (Fig.14, vedi cellule cerchiare in nero); a concentrazioni superiori invece le cellule erano tutte completamente morte, come si può vedere dalla figura 14.

PUROMICINA (concentrazioni 0-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



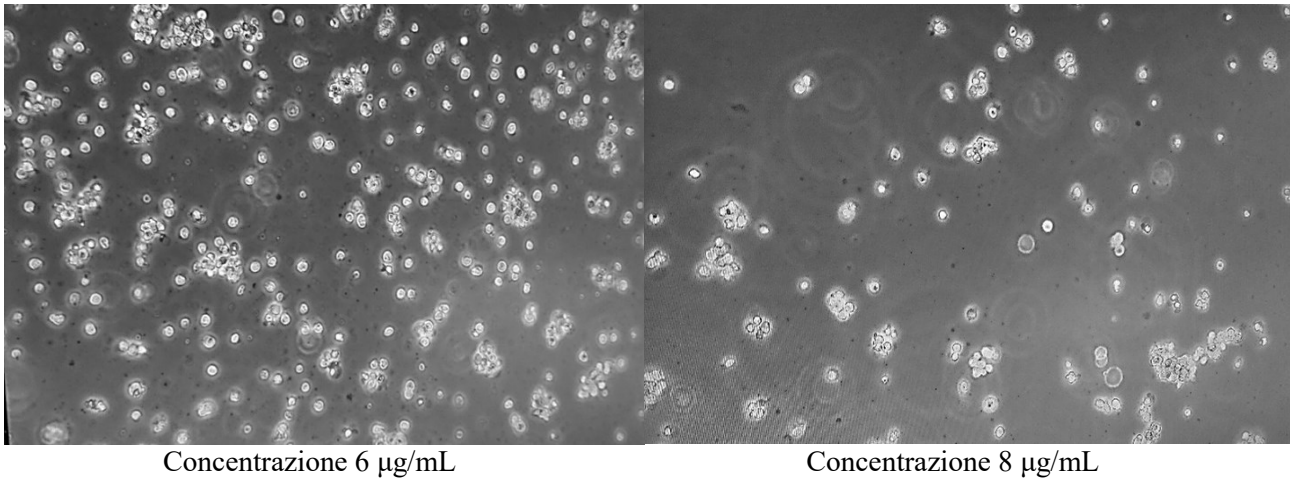
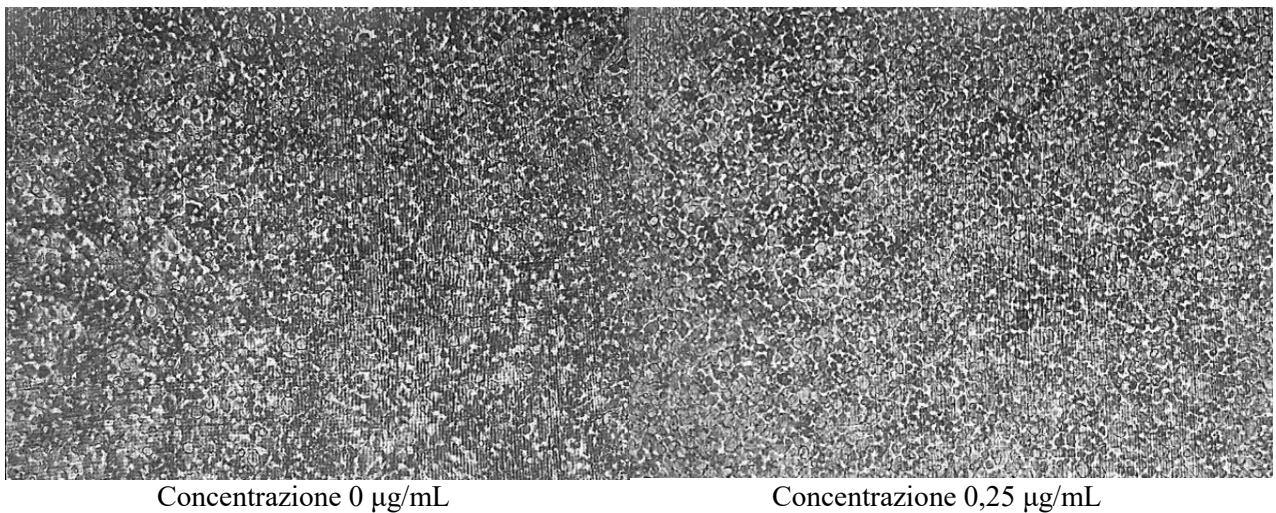


Figura 14. Curva di mortalità con concentrazioni di Puromicina comprese tra 1 e 8 µg/mL.

È stata poi eseguita una nuova curva di mortalità utilizzando però un range di concentrazioni più stringente, compreso tra 0,25 e 1,25 µg/mL. Fino ad una concentrazione di 0,5µg/mL le cellule risultavano essere vive e ben adese al fondo della piastra; a concentrazioni maggiori invece, fino a 1,25µg/mL, la quantità di cellule morte presenti aumentava all'aumentare della concentrazione, ma erano comunque presenti cellule ancora vive e ben adese alla superficie della fiasca (cellule cerchiare in figura 15).

PUROMICINA (concentrazione 0-1,25 µg/mL)



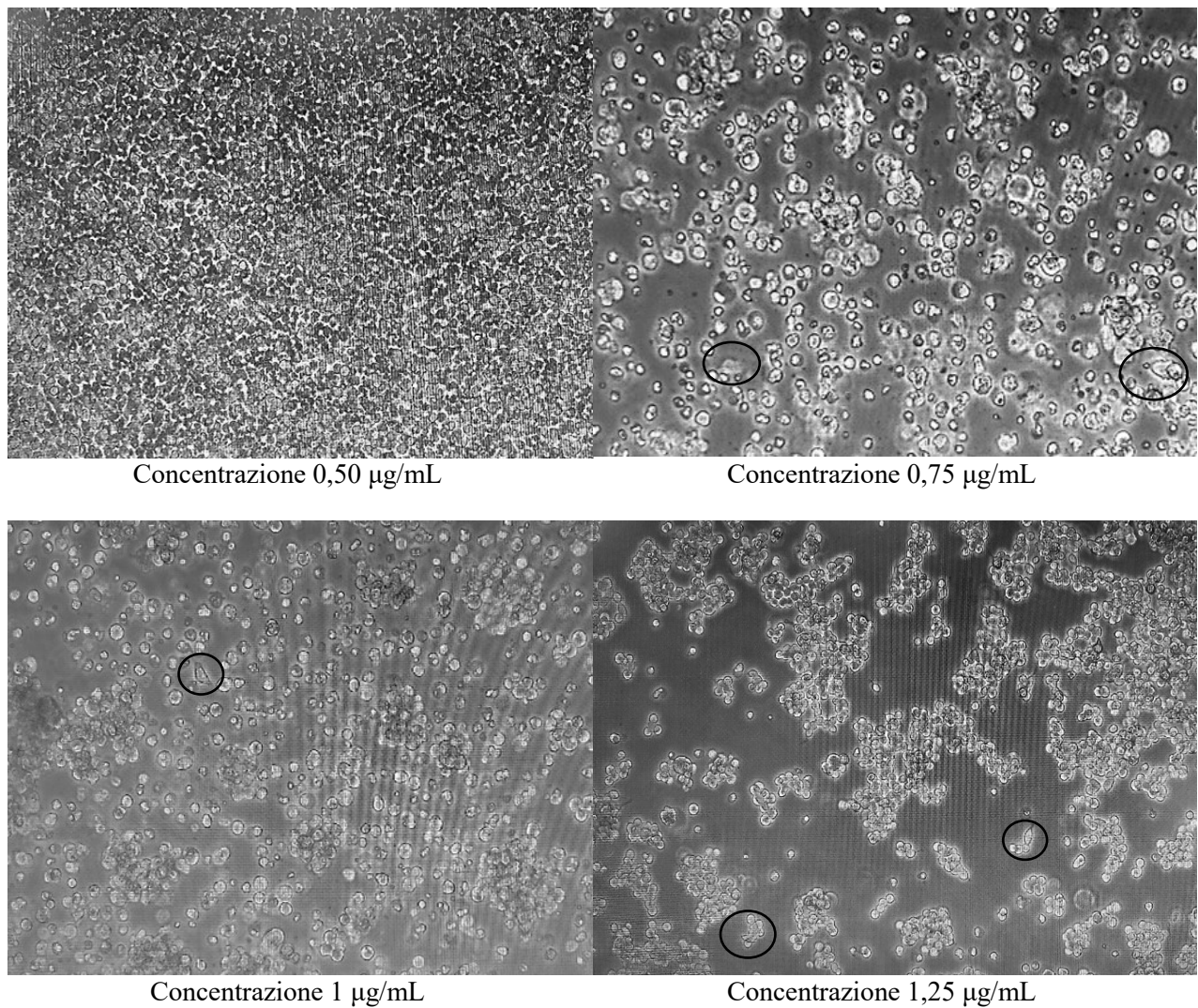


Figura 15. Curva di mortalità con concentrazioni di Puromicina comprese tra 0,5 e 1,25 µg/mL.

In base a tali risultati, è stata scelta come ottimale una concentrazione di 2 µg/mL.

Successivamente, affinché la Cas9 potesse eseguire dei tagli in due punti distinti del genoma, le cellule sono state trasfettate contemporaneamente con due plasmidi (vedi 3.4.1).

In particolare, sono stati condotti due distinti esperimenti; nel primo le cellule sono state trasfettate con i plasmidi contenenti rispettivamente la gRNA1 (TEVH-1203833) e la gRNA3 (TEVH-1136691); nel secondo invece sono stati usati i plasmidi contenenti rispettivamente la gRNA1 (TEVH-1203833) e la gRNA2 (TEVH-1069549).

La scelta di utilizzare queste due coppie di plasmidi è stata data dal fatto che le rispettive gRNA in essi codificate vanno a riconoscere specificatamente dei siti *target* (riportati in Tab. 1) presenti nell'esone 5 (gRNA1), 7 (gRNA2) e 10 (gRNA3) del gene *ADCK1*.

Esoni 5

ATCCATGATTTGTTCCAGAGCTTCGATGACACCCCTCTGGGGACGGCCTCCCTGGCCCAGGTCCACAAGGCAGTGCTG
 CATGATGGGCGGACGGTGGCCCGTGAAGGTCCAGCACCCAAAGGTGCGGGCTCAGAGCTCGAAGGACATTCTCTGA
 TGGAG

Esoni 7

GTCCCCCGAATCCACTGGGACCTGTCCACGGAGCGGGTCTCCTGATGGAGTTTGTGGATGGCGGGCAGGTCAATGA
 CAGAGACTACATGGAGAGGAACAAGATCGACGTCATGAG

Esoni 10

GACITAGAGATTCGCAACAACGCGGCCAACTACCTCCCCAGATCAGCCATCTCCTCAACCACGTGCCGCGCCAGATG
 CTGCTCATCTTGAAGACCAACGACCTGCTGCGTGCCATTGAGGCCGCCCTGGGCACCCGCGCCAGCGCCAGCTCCTTT
 CTC AACATGTCACGTTGCTGCATCAGAGCGCTAGCTGA

Figura 16. Sequenza degli esoni 5, 7 e 10 del gene ADCK1; in azzurro la sequenza riconosciuta dalla gRNA e in rosso la sequenza PAM.

Nel primo esperimento con gRNA1 e gRNA3, la delezione attesa era di 5 esoni e dei rispettivi introni tra essi compresi, per un totale di circa 44'300 pb. Considerando il cDNA, in cui è già avvenuto lo splicing, e quindi contenente solo i singoli esoni, la delezione risultava essere di circa 800 pb.

Nel secondo esperimento con gRNA1 e gRNA2 invece, la delezione che ci si aspettava era di soli due esoni e dei rispettivi introni tra essi compresi, per un totale di 20'600 pb; considerando il cDNA, la delezione risultava di circa 159 pb.

Dopo la trasfezione le cellule sono state dapprima selezionate utilizzando la concentrazione di Puromicina di 2µg/ml scelta empiricamente attraverso la curva di mortalità e successivamente amplificate, diluite e nuovamente amplificate per ottenere colonie di cellule derivanti da una singola cellula.

Le colonie ottenute nel primo esperimento sono state denominate con numerazione progressiva in numero arabo affiancato dalla lettera A (da 1A a 71A); le colonie ottenute invece nel secondo esperimento sono state denominate con numero arabo affiancato dalla lettera B (da 1B a 38B).

Da ogni colonia è stato poi estratto il DNA ed è stato eseguito uno screening con due diverse reazioni di PCR per verificare la presenza della delezione. Dapprima è stata eseguita una PCR utilizzando *primers* interni alla sequenza deleta (*PCR non-deleta*) e i prodotti di PCR così ottenuti sono stati visualizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio (Fig.17 e 18).

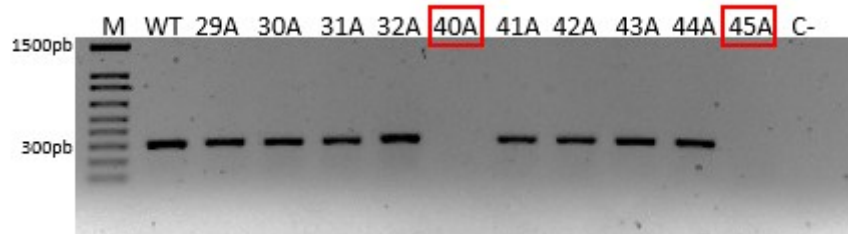


Figura 17. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR non-deleta. Assenza della banda nelle colonie 40A e 45A.

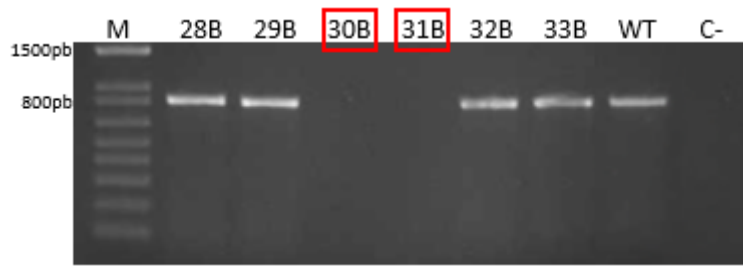


Figura 18. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR non-deleta. Assenza della banda nelle colonie 30B e 31B.

L'assenza di bande di amplificazione nel gel di agarosio stava a significare che quella particolare colonia presentava una delezione e quindi mancava della porzione di genoma che i *primers* specifici avrebbero dovuto amplificare. Per avere un'ulteriore conferma della presenza della delezione, si è eseguita una nuova reazione di PCR (*PCR deleta*) utilizzando *primers* esterni alla sequenza deleta. Se non ci fosse stata la delezione, i *primers* sarebbero stati troppo distanti tra loro e non avrebbero consentito l'amplificazione della regione tra essi compresa; se invece la delezione fosse stata effettivamente presente, si sarebbero osservati su gel i prodotti di amplificazione ad un peso molecolare noto (Fig.19 e 20).

Lo *screening* nel primo esperimento è stato eseguito su 74 colonie cellulari, di cui 3 (10A, 40A e 45A) presentavano la delezione.

Nel secondo esperimento invece lo *screening* è stato eseguito su 38 colonie, di cui 3 (30B, 31B e 38B) presentavano la delezione.

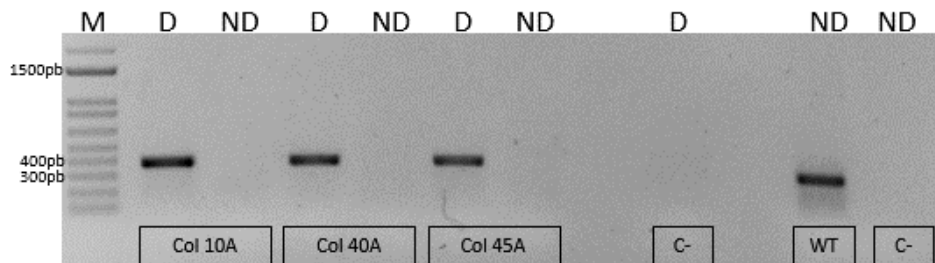


Figura 19. Elettroforesi su gel di agarosio 1% delle PCR non-deleta (ND) e PCR deleta (D) delle colonie 10A, 40A e 45A. E' stato utilizzato come controllo positivo DNA di cellule HEK wt (WT) e come controllo negativo H₂O (C-).

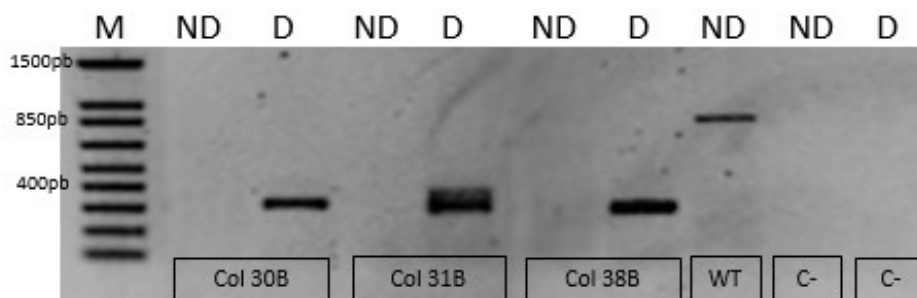


Figura 20. Elettroforesi su gel di agarosio 1% delle PCR non-deleta (ND) e PCR deleta (D) delle colonie 30B, 31B e 38B. E' stato utilizzato come controllo positivo DNA di cellule HEK wt (WT) e come controllo negativo H₂O (C-).

Nella colonia 31B è stata osservata la presenza di una doppia banda all'altezza del peso molecolare atteso (Fig. 20); questo potrebbe indicare la presenza di una delezione diversa nei due alleli del gene *ADCK1*.

Successivamente, i prodotti di PCR delle sei colonie con delezione sono stati sequenziati per verificare se la delezione fosse *in frame* o *out of frame*.

Le sequenze sono state visualizzate con il programma FinchTV ed in particolare si è visto che le colonie 45A, 30B e 38B presentavano un singolo picco per tutta la sequenza, a significare che entrambi gli alleli del gene *ADCK1* presentavano la medesima delezione (Fig. 23, 24 e 26), mentre le altre tre colonie, 10A, 40A e 31B, ad un certo punto dell'elettroferogramma presentavano una sequenza con doppi picchi (Fig. 21, 22 e 25; vedi freccia rossa), ad indicare la presenza di delezioni differenti nei due alleli del gene *ADCK1*.

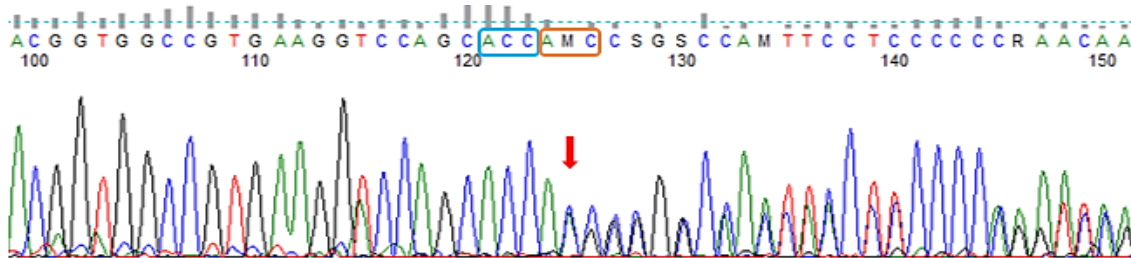


Figura 21. Sequenza della colonia 10A. Riquadrati in azzurro e in arancione rispettivamente le porzioni di *gRNA1* e *gRNA3*.

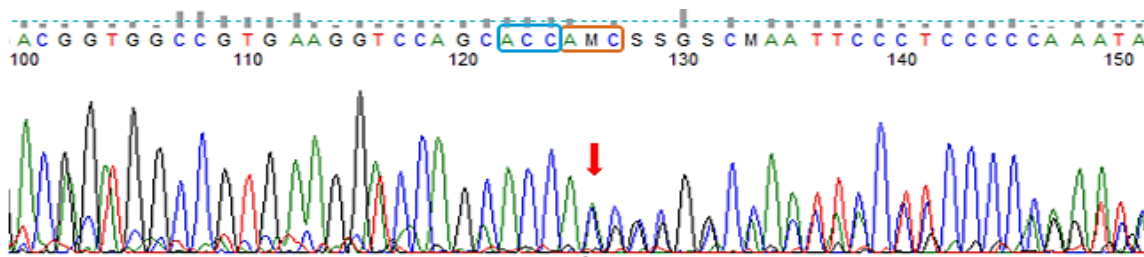


Figura 22. Sequenza della colonia 40A. Riquadrati in azzurro e in arancione rispettivamente le porzioni di *gRNA1* e *gRNA3*.

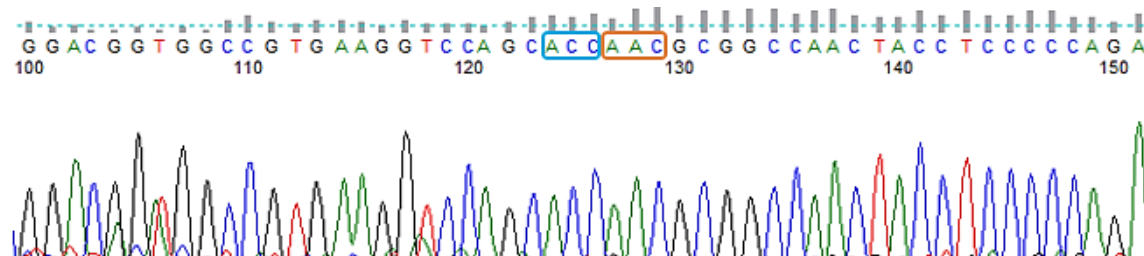


Figura 23. Sequenza della colonia 45A. Riquadrati in azzurro e in arancione rispettivamente le porzioni di *gRNA1* e *gRNA3*.

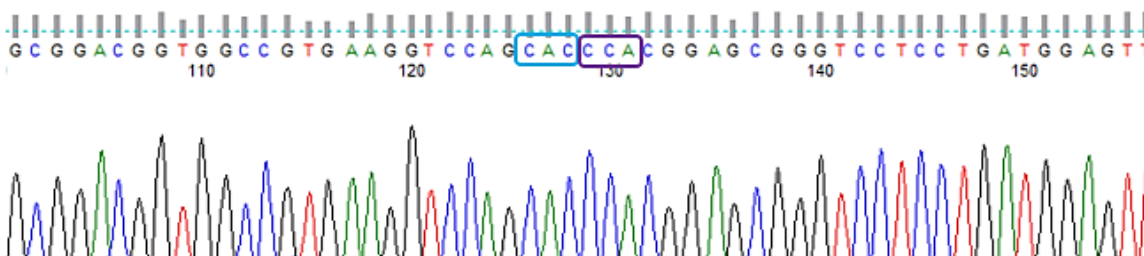


Figura 24. Sequenza della colonia 30B. Riquadrati in azzurro e in viola rispettivamente le porzioni di *gRNA1* e *gRNA2*.

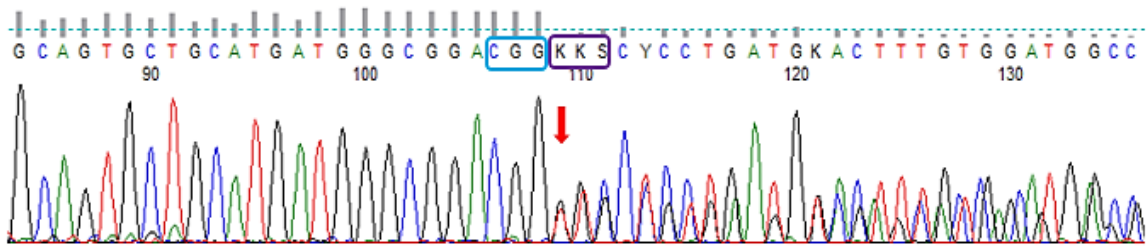


Figura 25. Sequenza della colonia 31B. Riquadrati in azzurro e in viola rispettivamente le porzioni di gRNA1 e gRNA2.

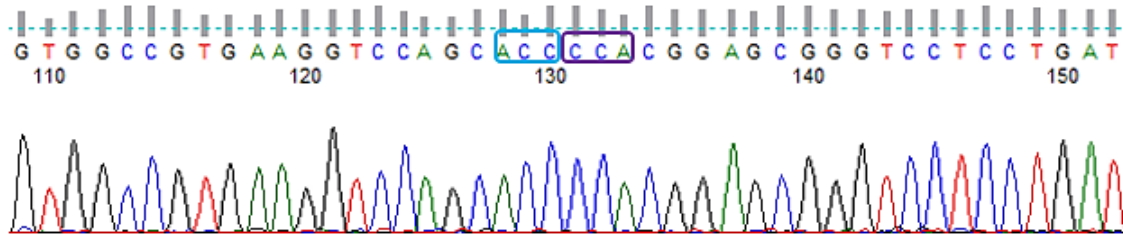


Figura 26. Sequenza della colonia 38B. Riquadrati in azzurro e in viola rispettivamente le porzioni di gRNA1 e gRNA2.

Le sequenze sono poi state allineate con una sequenza ottenuta unendo due porzioni del genoma, come spiegato in seguito, per verificare la lunghezza della delezione presente. La sequenza usata come riferimento era diversa per i due esperimenti, a seconda degli esoni riconosciuti dalle diverse gRNA utilizzate:

- quella usata per il primo esperimento era composta dall'unione della sequenza inclusa tra il sito di ibridazione del *primer forward*-120 (120-F) e la fine dell'esone 5 e della sequenza inclusa tra l'inizio dell'esone 10 e il sito di ibridazione del *primer reverse*-113 (113-R) (Fig. 27 e 28);

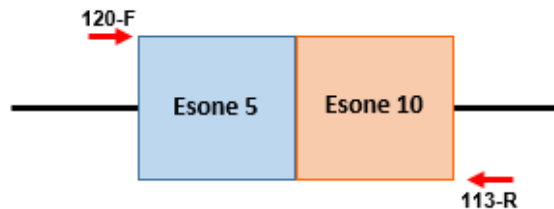


Figura 27. Schema della composizione della sequenza di riferimento utilizzata nel primo esperimento.

```

gggtcatctttttcattgctctgttctctccactcccagacagATCCATGATTTGTTCCAGAGCTTCGATGACACCCCTCTGGGGACGGCC
TCCCTGGCCCAGGTCCACAAGGCAGTGCTGCATGATGGGCGGACGGTGCCCGTGAAGGTCCAGCACCCAAAGGTGC
GGGCTCAGAGCTCGAAGGACATTCTCCTGATGGAGGACTTAGAGATTGCAACAACGCGGCCAACTACCTCCCCAG
ATCAGCCATCTCCTCAACCACGTGCCGCGCCAGATGCTGCTCATCTTGAAGACCAACGACCTGCTGCGTGGCATTGAG
GCCGCCCTGGGCACCCGCGCCAGCGCCAGCTCCTTTCTCAACATGTCACGTTGCTGCATCAGAGCGCTAGCTGAgtgagt
gtgggctcctccctctctcccctctag
  
```

Figura 28. Sequenza utilizzata come riferimento nel primo esperimento. In minuscolo gli introni, in maiuscolo l'esone 5 (sottolineato in azzurro) e l'esone 10 (sottolineato in arancione) con le sequenze di allineamento dei gRNA in grassetto; in rosso, rispettivamente i primers 120-F e 113-R.

- quella usata invece nel secondo esperimento era composta dalla sequenza inclusa tra il sito di ibridazione del *primer forward*-120 (120-F) e la fine dell'esone 5 e della sequenza inclusa tra l'inizio dell'esone 7 e il sito di ibridazione del *primer reverse*-106 (106-R) (Fig. 29 e 30).



Figura 29. Schema della composizione della sequenza di riferimento utilizzata nel secondo esperimento.

gggtcatctttttcattgctctgttctctccactcccagacagATCCATGATTTGTTCCAGAGCTTCGATGACACCCCTCTGGGGACGGCC
TCCCTGGCCCAGGTCCACAAGGCAGTGCTGCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCCAAAGGTGC
GGGCTCAGAGCTCGAAGGACATTCTCCTGATGGAGGTCCCCGAATCCACTGGGACCTGTCCACGGAGCGGGTCTC
CTGATGGAGTTTGTGGATGGCGGGCAGGTCAATGACAGAGACTACATGGAGAGGAACAAGATCGACGTCAATGAGg
tgaggccaagagctcagggctgctgtgccgggg**aacgtgggcttggtcaag**

Figura 30. Sequenza utilizzata come riferimento nel secondo esperimento. In minuscolo gli introni, in maiuscolo l'esone 5 (sottolineato in azzurro) e l'esone 7 (sottolineato in viola) con le sequenze di allineamento dei gRNA in grassetto; in rosso, rispettivamente i primers 120-F e 106-R.

L'allineamento tra la sequenza dei cloni cellulari e quella usata come riferimento, effettuata con Clustal Omega (Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI), uno strumento bioinformatico, ha prodotto i seguenti risultati:

- La colonia 10A e la colonia 40A presentavano due differenti delezioni nei due alleli del gene *ADCK1*, uguali in entrambe le colonie; in particolare, era presente una delezione di 62 pb in un allele, che generava una delezione *out of frame*, e una di 63 pb nell'altro allele, che generava invece una delezione *in frame*.
- La colonia 45A presentava una delezione *out of frame* di 62 pb in entrambi gli alleli del gene *ADCK1*, ed il taglio era avvenuto nello stesso sito. (Fig. 31).
- La colonia 31B presentava due differenti delezioni *out of frame* nei due alleli del gene *ADCK1*, in particolare una di 71 pb in un allele e l'altra di 101 pb nel secondo allele (Fig.33). Questo confermava anche quanto evidenziato dalla PCR-deleta mostrata in figura 20.
- Le colonie 30B e 38B presentavano una delezione rispettivamente di 70 pb, *out of frame* (Fig. 32), in entrambi gli alleli del gene *ADCK1*, e di 69 pb, *in frame*, in entrambi gli alleli.

```

COLONIA 45A
ref          GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCCCAAGGTGCGGGCTCAGAGCTCGAAGGACAT
allele1     GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCC-----62pb-----
allele2     GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCC-----62pb-----
*****

ref          TCTCCTGATGGAGGACTTAGAGATTTCGCAACCAACGCGGCCAACTACCTCCCCAGATCAGCCA
allele1     -----AACGCGGCCAACTACCTCCCCAGATCAGCCA
allele2     -----AACGCGGCCAACTACCTCCCCAGATCAGCCA
*****

```

Figura 31. Allineamento tra le sequenze dei singoli alleli di *ADCK1* e la sequenza usata come riferimento per la colonia 45A.

COLONIA 30B

```
ref          GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCCAAAGGTGCGGGCTCAGAGCTCGAAGGACATT
allele1     GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCAC-----70pb-----
allele2     GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCAC-----70pb-----

ref          CTCCTGATGGAGGTCCCCCGAATCCACTGGGACCTGTCCACGGAGCGGGTCTCTCTGATGGA
allele1     -----CCACGGAGCGGGTCTCTCTGATGGA
allele2     -----CCACGGAGCGGGTCTCTCTGATGGA
```

Figura 32. Allineamento tra le sequenze dei singoli alleli di ADCK1 e la sequenza usata come riferimento per la colonia 30B.

COLONIA 31B

```
ref          GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCACCCAAAGGTGCGGGCTCAGAGCTCGAAGGACATTC
allele1     GCATGATGGGCGGACGGTGGCCGTGAAGGTCCAGCAC-----71pb-----
allele2     GCATGATGGGCGGACGG-----101pb-----

ref          TCCTGATGGAGGTCCCCCGAATCCACTGGGACCTGTCCACGGAGCGGGTCTCTCTGATGGA
allele1     -----ACGGAGCGGGTCTCTCTGATGGA
allele2     -----GTCTCTCTGATGGA
```

Figura 33. Allineamento tra le sequenze dei singoli alleli di ADCK1 e la sequenza usata come riferimento per la colonia 31B.

Per valutare l'effetto della delezione sulla produzione della proteina, si è deciso di analizzare le sole colonie *knock-out* con delezione *out of frame* (45A, 30B e 31B), la quale genera uno slittamento della finestra di lettura della proteina, producendo un codone di stop prematuro.

La localizzazione del codone di stop prematuro, della proteina codificata dal gene *ADCK1*, è stata visualizzata convertendo, la sequenza di DNA di riferimento e la sequenza di DNA con la delezione, in sequenze amminoacidiche (con ExPasy, [ExPASy - Translate tool](http://expasy.org/translate/)) e, successivamente, andando ad allineare le due sequenze (con MultAlin - <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig. 34-42).

cDNA WT

atgccagaaggtctcaagcttctctgtggaccagcatggctcttctgctctgctctgctcttctacttctacagtaacaagcttggaccctaagcttggcgtgtcagggtgggacagcagttgctacagcggctgtcatcagttacgactacctccttgaagagtgtcccttatggctcagaggacttgcagctgagatcaaggtgcaccttctctgcccagcgtctgtgagctctgtgtgccaaccggggcacttcatcaaggtggccagcactggggctctggactactgttccagaggagtacaccagcagctgaaggtactgcacagccaggtccacagagcagcatgcaagagatccgacaggtcctccgagaagatctgggcaaggagatccatgattgtccaagcttctgacacccctctgggacgacctcctggcccaggtccacaagcagtgctgcatgatggcggacggctgcccgtgaaggtccagcaccacaaggtcggcctcagagctcgaagacattctctgatgaggtgctctgttctgctgtggaagcagctgttcccagagttgagttatgtggctgtggtgatgaagccaagaagaacctgaccttggagctgatttctcaatgaagggaggaatgctgagaaggtgtcccagatgtcagcagcatttgcacttctgaaagttcccccgaatccactggacctgtccacggagcggctcctctgagattgtgatgcccaggtcaatgacagagactacatggagaggaacaagatgacgtcaatgagatctcacgccacctggcaagatgtatgtagatgcttctgcaatgcttctgactgcatccccccggcaatgtactggtggaagcaccggcagcgggaaaggcggagattgtcctgttgacctggccttaccagatgctcacggaagaattccgctgaattactgcccactctgagctgtgactgacatgaagagagtgaaggagtacagccagcagctgggagcggggtctctaccttctgttctgcatgctgacggcggatctgtggactcggtaacagaggcatcagccaagctcccgtcactgccaactgagacttagagattcgaacaacggcgaactacctcccagatcagccatctctcaaccagctgccgcgccaagatgctgctcatcttgaagaccaacgacctgctgctgacattgagggccctgggacccggcgaagcggcagctctcttctcaacatgctacgtgctgcatcagagcgtgctgagcacaagaagaatactgttctcagaaggaccagatctcttcagcaggccttcaactatgagatcaacctcatgactcctgctgtgaaaggggtgaaagctggtgaccggcttggccctaataatgctggtgttccctgctcacttga

Sequenza amminoacidica WT

MARKALKLASWTSMALAASGIYFYSNKYLDPNDFGAVRVGRAVATTAVISYDYLTSLKSVPYGSSEYQLRSKVHLRSARRLCELCCANRGTFIKVGQHLGALDYLLPEEYTSSTLKVLSQAPQSSMQEIRQVIREDLGKEIHDLFQSFDDTPLGTASLAQVHKAVLHDGRTVAVKVQHPKVRAQSSKDILLMEVLVLAVKQLFPEFEFMWLVDCAKKNLPLELDFLNEGRNAEKVSQMLRHFDFLKVPRHWDLSTERVLLMEFVDGGQVNDRDYMERKNIDVNEISRHLGKMYSEMIFVNGFVHCDPFGNVLVRKHPGTGKAEIVLLDHGLYQMLTEEFRLNYCHLWQSLIWTDMKRVKEYSQRGLGADLYPLFACMLTARSWDSVNRGISQAPVTATEDLEIRNNAANYLPQISHLLNHVPRQMLLILKTNDLLRGIEAALGRTRASASSFLNMSRCCIRALAEHKKKNTCSFFRRTQISFSEAFNLWQINLHELILRVKGLKLA DRV LALICWLFAPL-

Figura 34. Sequenza nucleotidica del cDNA di HEK293 wt e la rispettiva traduzione in sequenza amminoacidica.

cDNA con delezione di 62 pb

atgccagaaaggctctcaagcttctctgtggaccagcatggctcttctgctcctctggcatctacttctacagtaacaagtacttggaccctaatacttggcgtgtcagggtggcagagcaggtgtctacgacggctgtcatcagttacgactacctcacttccctgaagagtgtcccttatggctcagaggagtacttgcagctgagatctaaaggtgcaccttcgcttccagggcgtctctgtgagctctgtgtccaaccggggcaccttcatcaaggtggccagcacctggggcctctggactacctgttccagaggagtacaccagcacgtgaaggtactgcacagccaggtccacagagcagcatgcaagagatccggcaggtcatccgagaagatctggcaaggagatccatgattgttccagaactcctgatgacacccctctggggacggcctccttggccaggtccacaaggcagtgctgcatgatggcggacgtggcctgaaggtccagcaccacggcgccaactacctccccagatcagccatctcctcaaccacgtgccgcccagatgctgctcatctgaagaccaacgacctgctgctggcattgaggccgccttggcaccggcggcagcggcagctcttctcaacatgtcacgttctgctcatcagagcgtactgagcacaagaagaatactgttattcttgaagagaccagatcttctcagcgaggccttcaacttatggcagatacaacctcatgagctcatcctgcgtgtgaaggggtgaagctggctgaccgggtcttggcctaataatgctgctgttccctgctcactctga

Sequenza aminoacidica con delezione 62 pb

MARKALKLASWTSMALAASGIYFYSNKYLDPNDFGAVRVGRAVATTAVISYDYLTSLKSVPYGSEEYLQLRSKVHLRSARRLCELCCANRGTFIKVGQHLGALDYLLPEEYTTSTLKVLSQAPQSSMQEIRQVIREDLGKEIHDLFQSFDDTPLGTASLAQVHKAVLHDGRTVAVKVQHQRGQLPPDPQSPQPRAPDAAHLEDQRPAAWH-GRPGHPRQRQLLSQHVTLHLQASAS-AQEEEYLFILQKDPDLFQRGLQLMADQPP-AHPACEGVEAG-PGLGNMLAVP CSTL

Figura 35. Sequenza nucleotidica del cDNA di HEK293 con delezione in frame di 62 pb e la rispettiva traduzione in sequenza aminoacidica.

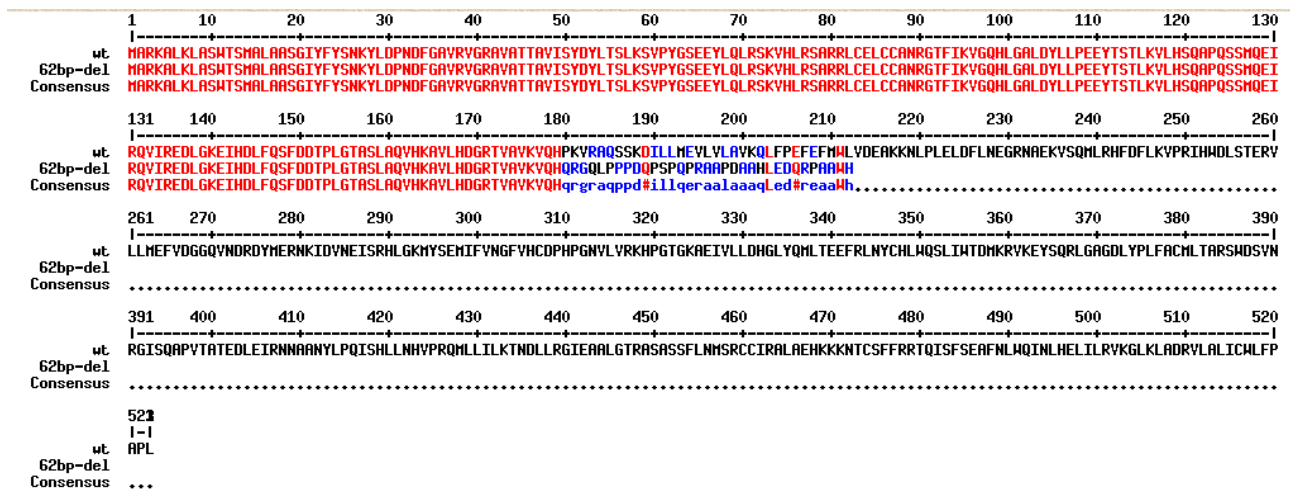


Figura 36. Allineamento tra la sequenza aminoacidica wt e la sequenza prodotta dalla delezione di 62 pb.

cDNA con delezione di 70 pb

atgccagaaaggctctcaagcttctctgtggaccagcatggctcttctgctcctctggcatctacttctacagtaacaagtacttggaccctaatacttggcgtgtcagggtggcagagcaggtgtctacgacggctgtcatcagttacgactacctcacttccctgaagagtgtcccttatggctcagaggagtacttgcagctgagatctaaaggtgcaccttcgcttccagggcgtctctgtgagctctgtgtccaaccggggcaccttcatcaaggtggccagcacctggggcctctggactacctgttccagaggagtacaccagcacgtgaaggtactgcacagccaggtccacagagcagcatgcaagagatccggcaggtcatccgagaagatctggcaaggagatccatgattgttccagaactcctgatgacacccctctggggacggcctccttggccaggtccacaaggcagtgctgcatgatggcggacgtggcctgaaggtccagcaccacggcgccaactacctccccagatcagccatctcctcaaccacgtgccgcccagatgctgctcatctgaagaccaacgacctgctgctggcattgaggccgccttggcaccggcggcagcggcagctcttcaacatgtcacgttctgctcatcagagcgtactgctgagcacaagaagaatactgttattcttcaagagaccagatcttctcagcgaggccttcaactatggcagatcaacctcatgagctcatcctgcgtgtgaaggggtgaagctggctgaccgggtcttggcctaataatgctgctgttccctgctcactctga

Sequenza aminoacidica con delezione 70 pb

MARKALKLASWTSMALAASGIYFYSNKYLDPNDFGAVRVGRAVATTAVISYDYLTSLKSVPYGSEEYLQLRSKVHLRSARRLCELCCANRGTFIKVGQHLGALDYLLPEEYTTSTLKVLSQAPQSSMQEIRQVIREDLGKEIHDLFQSFDDTPLGTASLAQVHKAVLHDGRTVAVKVQHPRSGS-WSLWMAGRSMTETTWRGTRRSTSMRSHATWAR CIVR-SSSMASCTAIPAMYWCGSTPARERRRLSCWTMGFTRCSRKNSA-ITATSGSL-SGLT-RE-RSTASDWE PGISTPCLPAC-RRDRGTRSTEASAKLPSLPLRT-RFATTRPTTSPRSASISSTTCRARCCSS-RPTTCCVALRPPWAP APAPAPFSTCHVAASER-LSTRRRIPVHSSEGPRLSARPSTY GRSTSMSSSCV-RG-SWLTGSWP-YAGCSLLHS

Figura 37. Sequenza nucleotidica del cDNA di HEK293 con delezione in frame di 70 pb e la rispettiva traduzione in sequenza aminoacidica.

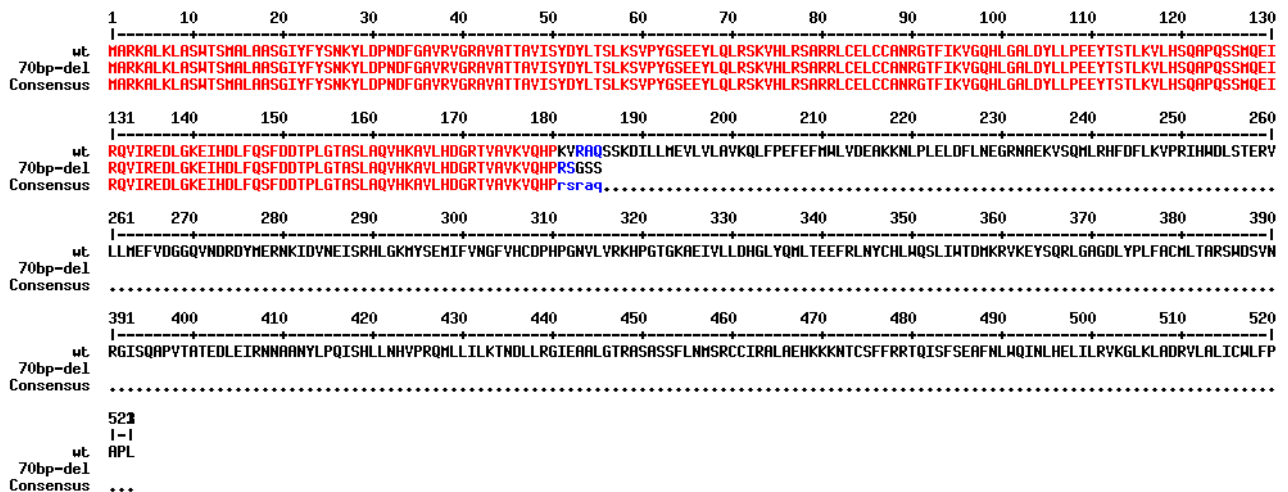


Figura 38. Allineamento tra la sequenza aminoacidica wt e la sequenza prodotta dalla delezione di 70 pb.

cDNA con delezione di 71 pb

atgccagaagacctctcaagcttctctctgaccagcatggctcttctctgctctctgacctctgacctctacttctacagtaacaagacttggaccctaactgactttggcgcgtgcagggtgggagagcagctgctacgacggctgtcctcagctacgactacactctccctgaagagtgctccctatggctcagaggagacttgcagctgagatcgaaggtgcacctctcctctgcccagggctctctgtgagctctgtgccaaccggggcacctcactcaaggtggggcagcacctgggggctctggactacctgtgcccagaggagtagaccagcagcctgaaagtactgcacagccaggtccacagagcagcatgcaagagatccgcccaggtcaccgagaagatctgggcaaggagatccatgatttctccagagcttctgatgacacccctctggggagcggctcctctggcccaggtccacaaggcagtgctgcatgatggcggcggcgtgcccgtgaagggtccagcacacggagcgggctcctctgatggatttgggatggcggcaggtcaatgacagagactacatggagaggaacaagatcagctcaatgagatctcaccacctgggcaagatgatagtgagatgatctctgcaatgctctgtgactgcgacccccacccggcaatgtactgggtgggaagcaccggcaggggaaaggcggagattgctctgttgacctggcctttaccagatgctcacggaagaatfccgctgaattactgccacctctggcagctctgtactggactgacatgaagagagtgaggagtagaccagcagctgggagccggggatctctaccctgtttgctgcatgctgacggcgcgacgtgggactcggtaacagaggcatcagccaagctccgctactgacctgaggacttagagattcgaacaacgggcaactactctccagatcagccatctctcaaccagctgccgcgcaagatgctgctatctgaagaccaacgactgctgctggcattgagggccctgggacccggcagcagccagctcttctcaacatgctcagctgctgcatcagagcgtgctgagcacaagaagaatactgttcatcttcagaaggaccagatctcttcagcaggcctcaactatgagatcaacctcatgactcatctctgctgtgaagggtggaagctggctgaccgggtcttggccctaataatgctgctgttccctgctcactctga

Sequenza aminoacidica con delezione 71 pb

MARKALKLASWTSMALAASGIYFYSNKYLDPNDFGAVRVGRAVATTAVISYDYLTSLKSVYPYGSEEYLQLRSKVHLSARRLCELCCANRGTFFIKVQHLGALDYLLPEEYTSLLKVLHSQAPQSSMQEIRQVIREDLGKEIHDLFQSFDDTPLGTASLAQVHKAVLHDGRTVAVKVVQHHPKVRARQSSKDILLMEVLVAVKQLPEFEFHALVDEAKKNLPLEDFLNEGRNAEKVSQLRHFDFLKVPRIHADLSTERYV--DDLRLQWLRALRSPRQCTGAEAPRHGKGGDCPVGWPALPDAHGRIPPELLPPLAVSDLD-HEESEGVQPATGSRGSLPLVCLHADGAIVGLGQQRHQSSRHCH-GLRDSQQRGQLPPPDPSPQPRAAPDAAHLEDQRPAAWH-GRPGHPRQRQLLSQHVTLLHQSSAS-AQEEYLFILQKDPDLFQRGLQLMADQPP-AHPACEGVEAG-PGLGPNMLAVPCSTL

Figura 39. Sequenza nucleotidica del cDNA di HEK293 con delezione in frame di 71 pb e la rispettiva traduzione in sequenza aminoacidica.

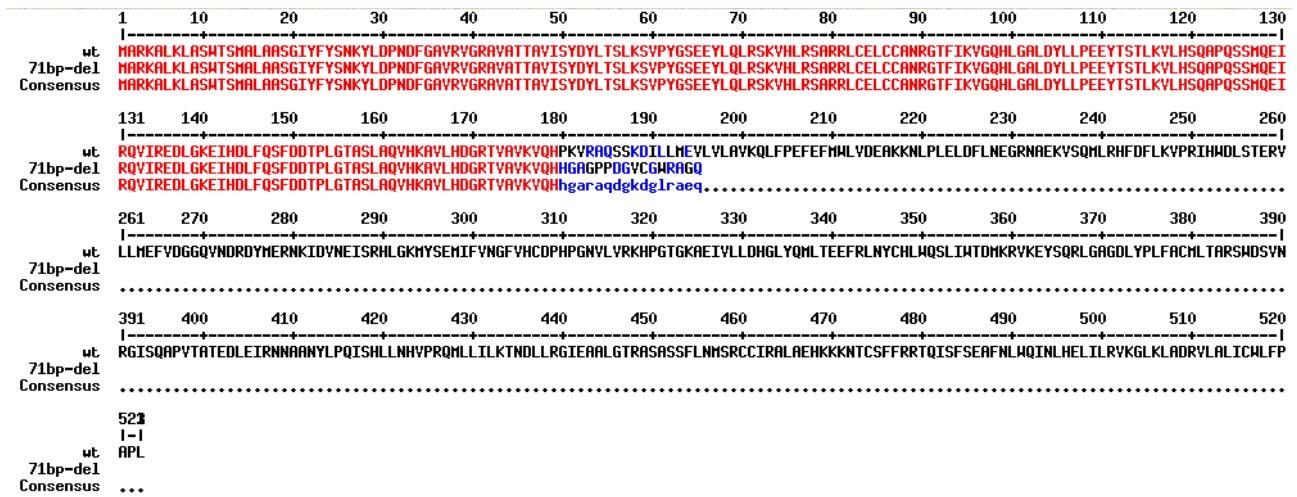


Figura 40. Allineamento tra la sequenza aminoacidica wt e la sequenza prodotta dalla delezione di 71 pb.

cDNA con delezione di 101 pb

atgccagaaaggctctcaagcttctctctgtgaccagcatggctctgtctctctggcatctacttctacagtaacaagtacttggaccctaatgactttggcgtgtcagggt
ggcagagcaggtgctacagcggctgtcatcagttacgactacctctcctgaagagtgtcccttatggctcagaggagtacttgcagctgagatctaaagtgacacctcgc
tctgccagcgtctctgtgagctctgtgtccaaccggggcaccttcatcaagtgggccagcacctggggctctggactacctgttccagagaggtacaccagcacgc
tgaaggtactgcacagccaggtccacagagcagcatgcaagagatccgaccaggtcatccgagaagatctgggaagagatccatgattgtccagagcttcgatgacac
ccctctggggacggcctccttggcccaaggtccacaagcagctgctgatgatggcggacgctctctctgatgagtttggatggcggcaggtcaatgacagagact
acatggagaggaacaagatcgactcaatgagatctcacgccacctgggaagatgtatgtgagatgatcttctgcaatggcttctgctacgtcgatccccaccggcaat
gtactgtgctggaagcaccggcagcgggaaagcgggagattgtctgttggacctggccttaccagatgctcagcggagaattccgctgaattactgccacctctggc
agtctctgatctggactgacatgaagagagtgaaggagtacagccagcagctggagccgggagatcttaccctgttggctgctgacgtgacggcgcgactgctgggactc
ggtaacagaggcatcagcaagctccctgactgcccactgaggacttagagattgccaacaacggcccaactacctccccagatcagccatctctcaaccagtgccg
cgccagatgctgctatcttgaagaccaacgacctgctgctggcattgagggccctgggacccggcgaagcggcagctcttctcaacatgctacgttctgctcatcag
agcgtgactgagcacaagaagaataacctgttctctcagaaggaccagatctctcagcagggcctcaactatggcagatcaacctcatgactcatctctgctg
gtgaaaggggtgagctggtgaccgggcttggccctaataatgctggtcttccctgctcactctga

Sequenza aminoacidica con delezione 101 pb

MARKALKLASWTSMALAASGIYFYSNKYLDPNDFGAVRVGRAVATTAVISYDYL TSLKSVPYGSEEYLQLRS
KVHLRSARRLCELCCANRGTFIKVGQHLGALDYLLPEEYTS TLKVLHSQAPQSSMQEIRQVIREDLGKEIHDLF
QSFDDTPLGTASLAQVHKAVLHDGRTGPPDGVCGWRAGQ-QRLHGEEQDRRQ-DLTPPGQDV--DDLRLQWLR
ALRSPRQCTGAEAPRHGKGGDCPVGPWALPDAHGRIPPELLPPLAVSDLD-HEESEGVQATGSRGSLPVLCL
HADGAIVGLGQQRHQPSRRHCH-GLRDSQQRQLPPDDQPSQPRAAPDAHLEDQRPAAWH-GRPGHPRQRQ
LLSQHVTLHQSAS-AQEEYLFILQKDPDLFQRGLQLMADQPP-AHPACEGVEAG-PGLGPNMLAVPCSTL

Figura 41. Sequenza nucleotidica del cDNA di HEK293 con delezione in frame di 101 pb e la rispettiva traduzione in sequenza aminoacidica.

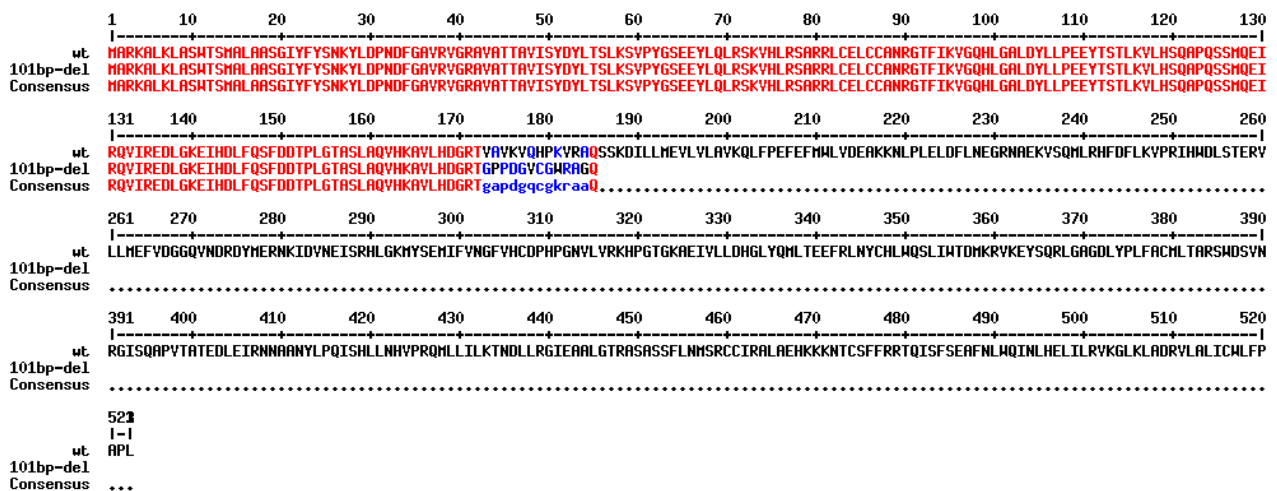


Figura 42. Allineamento tra la sequenza aminoacidica wt e la sequenza prodotta dalla delezione di 101 pb.

Una volta ottenute le tre colonie e verificato *in silico* la produzione di una proteina tronca, si è eseguito un SDS-PAGE e un Western blot per confermare che le colonie fossero effettivamente *knock-out*.

Come anticorpo primario è stato utilizzato l' α -ADCK1 *rabbit-anti-human* (LS Bio), il quale riconosce la porzione della proteina ADCK1 compresa tra l'aminoacido 220 e il 300, che nelle colonie descritte corrisponde ad una porzione che non viene tradotta.

La ditta da cui è stato acquistato l'anticorpo certificava il suo funzionamento su cellule A549 (cellule epiteliali basali alveolari di adenocarcinoma umano); non conoscendo l'efficienza dell'anticorpo nelle cellule HEK293 utilizzate per gli esperimenti, si è deciso di caricare come controlli positivi nel Western blot, oltre alle cellule HEK293 *wt*, anche le cellule A549, le *HeLa* (cellule immortalizzate di carcinoma della cervice uterina), le HepG2 (cellule di carcinoma epatocellulare), le SH-SY5Y (cellule di neuroblastoma) e le U-87MG (cellule di glioma maligno). Il peso molecolare della proteina ADCK1 risulta essere di circa 57 kDa (Fig. 43).

Per verificare di aver caricato in tutti i pozzetti la stessa quantità di materiale, è stato eseguito il *loading control*, che consiste nella visualizzazione della β -actina, una proteina del citoscheletro altamente conservata, con peso molecolare pari a circa 43 kDa.

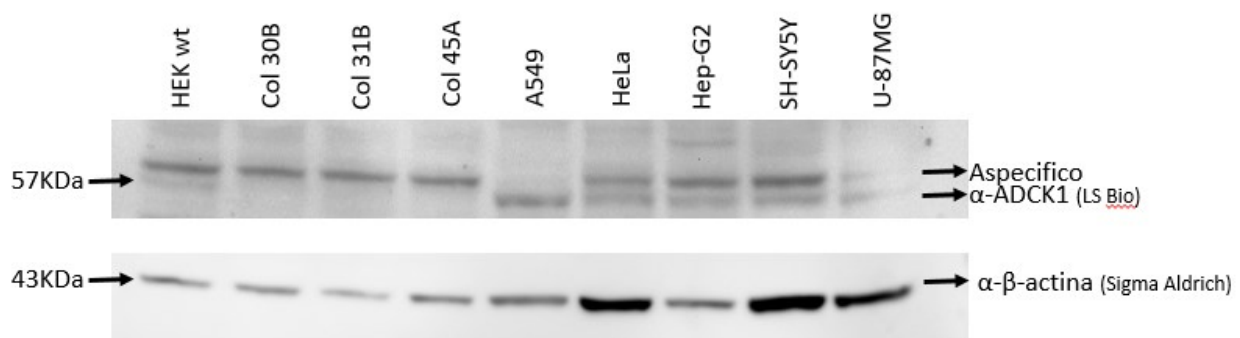


Figura 43. Western blot. Visualizzazione su membrana della proteina ADCK1 e del loading control con β -actina.

Tutte le linee cellulari utilizzate come controllo positivo presentavano la banda corrispondente alla proteina, mentre, in tutte le colonie la banda, e quindi la proteina, risultava assente. Appena sopra la banda di interesse era presente una banda aspecifica, la quale risultava essere però assente nelle cellule A549.

Tramite il *loading control*, si è osservato che in ogni pozzetto è stata caricata circa la stessa quantità di materiale, ad eccezione delle cellule *HeLa*, SH-SY5Y e U-87MG, in cui era presente più materiale.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il sistema CRISPR-Cas9 è una metodica di editing genetico di facile utilizzo e rapida per la generazione di cellule *knock-out* attraverso la delezione di ampie porzioni di un gene.

Si è scelto di utilizzare come modello *in vitro* cellule HEK293 per tre motivi: il primo è che queste cellule non sono tumorali, il secondo è che presentano una buona espressione del gene *ADCK1* (Fig. 44), che consente di valutare il funzionamento della proteina; il terzo è che mutazioni in diversi geni coinvolti nella sintesi di CoQ causano nefropatie; quindi, essendo cellule renali di embrione umano, sarebbero indicate per questo scopo.

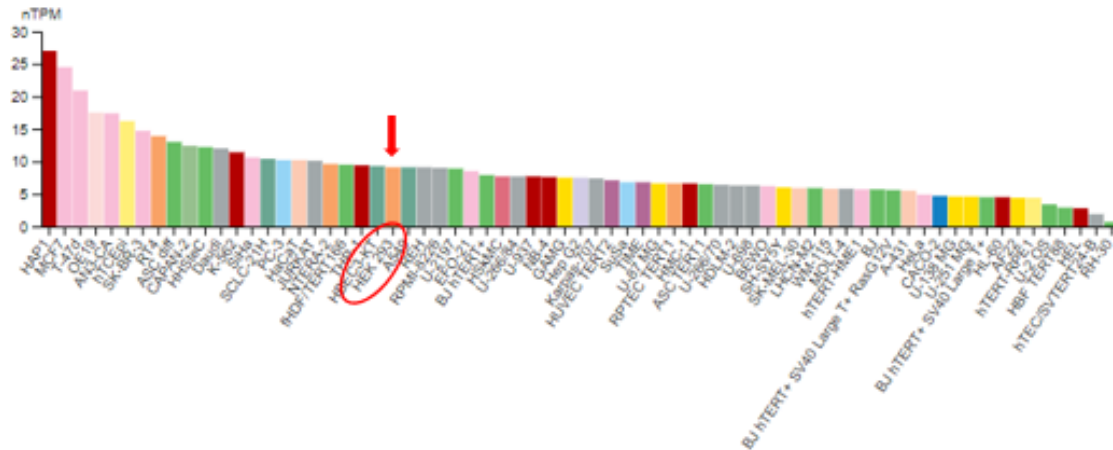


Figura 44. Livelli di espressione di *ADCK1* in varie linee cellulari (Protein Atlas).

È stato notato che l'efficienza della tecnica per generare delezioni, che potrebbero coinvolgere migliaia di pb e più esoni, è però relativamente ridotta. Infatti, nel primo esperimento, con gRNA1 e gRNA3, sono state ottenute solo 3 colonie su 71 (4,3%) con delezioni su entrambi gli alleli del gene *ADCK1*, di cui solo una presentava una delezione *out of frame* in entrambi gli alleli; nel secondo esperimento invece, con gRNA1 e gRNA2, una delezione su entrambi gli alleli del gene *ADCK1* è stata ottenuta in 3 colonie su 38 analizzate (7,9%, quasi il doppio rispetto al primo esperimento), di cui solo 2 presentavano una delezione *out of frame* in entrambi gli alleli.

In base agli *on-target score* (Tab. 1), si comprende che l'efficienza delle guide non è elevata, ma è comunque buona; essendo i valori abbastanza simili tra loro, ci si potrebbe aspettare un'uguale efficienza di taglio nei due esperimenti. La differenza nell'efficienza che invece si osserva potrebbe essere spiegata dal fatto che, come descritto da Bauer DE *et. al.*, l'efficienza della generazione di delezioni risulta essere inversamente proporzionale all'ampiezza della delezione.⁽¹⁾ Tutto ciò non implica, però, che l'efficienza dell'editing di per sé sia stata bassa; in questi esperimenti infatti è stata valutata la generazione di delezioni in entrambi gli alleli, e non sono state fatte valutazioni relative alla presenza di delezioni monoalleliche, né sulla presenza di piccoli *indels* nel gene *ADCK1*.

Spesso, parlando della tecnica CRISPR-Cas9, si affronta in genere anche la problematica legata agli effetti *off-target*, ossia la generazione di *DSB* ad opera dell'endonucleasi Cas9 in siti non *target* del

genoma⁽¹⁾ che potrebbe essere analizzata con un sequenziamento dell'intero genoma (*whole genome sequencing*), che nel nostro caso non è stato effettuato .

Per valutare gli effetti della delezione sulle proteine e per la caratterizzazione delle cellule, sono sufficienti almeno tre diverse colonie *knock-out* con delezione *out of frame*. Di conseguenza gli esperimenti funzionali verranno eseguiti, in parallelo, con almeno tre cloni di cellule *ADCK1 knock-out*, anche per escludere eventuali effetti *off-target* cloni specifici.

L'utilizzo della tecnica di PCR per lo screening delle colonie è un metodo piuttosto accurato, grazie all'utilizzo di *primers* specifici disegnati *ad hoc*; inoltre, è una tecnica piuttosto rapida, in quanto in un paio d'ore consente di avere risultati affidabili che permettono di selezionare immediatamente le colonie con la delezione.

L'aspetto negativo dello screening attraverso la PCR è però l'impossibilità di amplificare porzioni di DNA molto lunghe: questo rende quindi impossibile avere un controllo positivo per la PCR-*deleta*, poiché i *primers* utilizzati, essendo localizzati a 6 esoni di distanza nel primo esperimento e a 3 nel secondo esperimento, non consentono l'amplificazione, se non nel caso in cui sia effettivamente presente la delezione. Il controllo della presenza della delezione è stato comunque eseguito poi attraverso il sequenziamento SANGER.

La presenza di *tool* bioinformatici per l'allineamento delle sequenze nucleotidiche al fine di verificare la presenza della delezione, e per l'allineamento delle sequenze amminoacidiche, per identificare, almeno in linea teorica, delezioni *out of frame* e quindi proteine tronche con codone di stop prematuro, consente di avere un'idea dell'effetto della delezione sulla produzione della proteina.

Attraverso il Western blot è possibile verificare l'assenza di una porzione della proteina di interesse, qualora questa venga prodotta come proteina tronca, oppure l'assenza dell'intera proteina, qualora il *knock-out* del gene coinvolga l'intera proteina. Utilizzando l'anticorpo α -ADCK1 rabbit-anti-human della LS Bio, che riconosce come epitopo una porzione compresa tra gli aminoacidi 220 e 300 di ADCK1, che corrispondono alla porzione proteica *deleta*, è stato visto che le colonie prese in considerazione non presentavano la banda di interesse, a conferma del fatto che la delezione della porzione del gene era correttamente avvenuta. L'anticorpo utilizzato però è poco specifico, infatti ha prodotto bande aspecifiche, rendendo particolarmente complessa la visualizzazione della proteina di interesse.

Il Western blot consente quindi di verificare quanto osservato *in silico*, anche se un'ulteriore conferma potrebbe essere l'analisi dell'RNA mediante *RealTime* PCR.

Saranno necessari nuovi esperimenti per poter definire con certezza qual è l'effetto della delezione nella sopravvivenza della cellula e in che modo il gene di interesse reso *knock-out* partecipi alle funzioni cellulari e, in particolare, alle funzioni mitocondriali quali la sintesi di CoQ e la funzionalità della catena respiratoria.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. *JoVE*. 3 gennaio 2014;(83):52118.
2. Luthra R, Kaur S, Bhandari K. Applications of CRISPR as a potential therapeutic. *Life Sciences*. novembre 2021;284:119908.
3. Kozovska Z, Rajcaniova S, Munteanu P, Dzacovska S, Demkova L. CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. settembre 2021;141:111917.
4. Liu G, Lin Q, Jin S, Gao C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*. gennaio 2022;82(2):333–47.
5. Jiang F, Doudna JA. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 22 maggio 2017;46(1):505–29.
6. Philippe C, Moineau S. The endless battle between phages and CRISPR–Cas systems in *Streptococcus thermophilus*. *Biochem Cell Biol*. agosto 2021;99(4):397–402.
7. Chang AY. Single-guide RNAs: rationale and design. In: *CRISPR Genome Surgery in Stem Cells and Disease Tissues* [Internet]. Elsevier; 2022 [citato 3 luglio 2022]. pag. 47–55. Disponibile su: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128178768000036>
8. Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA. A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*. 26 giugno 2015;348(6242):1477–81.
9. Kuznetsov AV, Javadov S, Margreiter R, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Analysis of Mitochondrial Function, Structure, and Intracellular Organization In Situ in Cardiomyocytes and Skeletal Muscles. *IJMS*. 18 febbraio 2022;23(4):2252.
10. Wisidagama DR, Thomas SM, Lam G, Thummel CS. Functional analysis of Aarf domain-containing kinase 1 in *Drosophila melanogaster*. *Dev Dyn*. settembre 2019;248(9):762–70.
11. Stefely JA, Pagliarini DJ. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. ottobre 2017;42(10):824–43.
12. Yoon W, Hwang SH, Lee SH, Chung J. *Drosophila* ADCK1 is critical for maintaining mitochondrial structures and functions in the muscle. Lu B, curatore. *PLoS Genet*. 24 maggio 2019;15(5):e1008184.
13. Acosta MJ, Fonseca LV, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857;7.
14. Stefely JA, Reidenbach AG, Ulbrich A, Oruganty K, Floyd BJ, Jochem A, et al. Mitochondrial ADCK3 Employs an Atypical Protein Kinase-like Fold to Enable Coenzyme Q Biosynthesis. *Molecular Cell*. gennaio 2015;57(1):83–94.
15. Ji Y, Liu Y, Sun C, Yu L, Wang Z, Du X, et al. ADCK1 activates the β -catenin/TCF signaling pathway to promote the growth and migration of colon cancer cells. *Cell Death Dis*. aprile 2021;12(4):354.
16. Marini F, Giusti F, Palmini G, Perigli G, Santoro R, Brandi ML. Genetics and Epigenetics of Parathyroid Carcinoma. *Front Endocrinol*. 24 febbraio 2022;13:834362.

17. Su YA, Bousman C, Li Q, Li JT, Lin JY, Si TM. Genetic variations in the ADCK1 gene predict paliperidone palmitate efficacy in Han Chinese patients with schizophrenia. *J Neural Transm.* gennaio 2019;126(1):19–25.
18. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* settembre 2013;31(9):827–32.