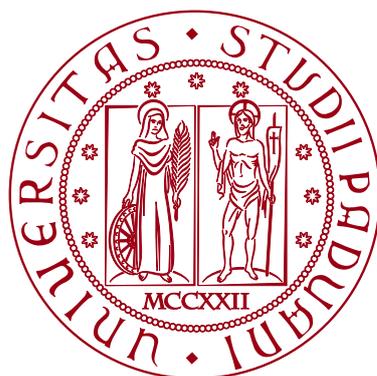


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

Biologia sintetica in *Acinetobacter baumannii*:

**ottimizzazione di protocolli di trasformazione e
progettazione di plasmidi per l'espressione di un
sistema di CRISPR interference**

Tutor: Prof.ssa Marisa Brini
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Co-Tutor: Ing. Massimo Bellato, PhD
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Dott.sa Sara Letrari
Dipartimento di Medicina Molecolare

Asia Picchi - 2000454

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1	Introduzione	5
1.1	Biologia sintetica e CRISPRi	5
1.2	Antibiotico resistenza	7
1.2.1	Il progetto MUTANS	9
1.3	Acinetobacter baumannii	9
1.3.1	Trasformazione tramite elettroporazione	10
2	Scopo del lavoro	13
3	Materiali e metodi	15
3.1	Materiali	15
3.1.1	Plasmidi	15
3.1.2	Ceppi batterici	16
3.1.3	Oligonucleotidi	16
3.1.4	Strumentazione	17
3.2	Metodi	17
3.2.1	Trasformazione per elettroporazione	17
3.2.2	Misura dell'efficienza di trasformazione	19
3.2.3	Propagazione plasmidi	19
3.2.4	Estrazione DNA plasmidico e quantificazione	19
3.2.5	BioBrick Standard Assembly 10	20
3.2.6	Digestione, purificazione e ligazione	20
3.2.7	Sequenziamento	21
3.2.8	Misura dell'efficienza di sintesi	21
4	Risultati e discussione	23
4.1	Ottimizzazione protocollo di elettroporazione	23
4.2	Costruzione plasmide	24
4.2.1	Stabilità del plasmide con RFP	25
4.2.2	Inserimento cassetta CRISPRi	28
5	Conclusione	31

1 Introduzione

1.1 Biologia sintetica e CRISPRi

La biologia sintetica si basa su un approccio interdisciplinare: la rigorosa disciplina ingegneristica viene unita alla biologia per creare, controllare e programmare le cellule e il loro comportamento seguendo lo schema del *engineering cycle* detto anche DBTL (*Design, Build, Test, Learn*). In particolare, partendo dal problema biologico preso in considerazione, sulla base delle conoscenze teoriche, si crea un primo progetto (*design*) della soluzione che si sceglie di adottare, viene quindi costruito un modello matematico predittivo per poi passare alla fase di implementazione fisica (*build*) e caratterizzazione quantitativa (*test*) in cui il sistema viene assemblato seguendo standard progettuali ed implementativi predefiniti e vengono allestiti gli esperimenti necessari a validarlo; se i dati sperimentali non sono in linea con la predizione ottenuta dal modello allora, passando alla fase di apprendimento (*learn*), si analizzano i problemi e le possibili soluzioni per poi andare ad aggiustare e perfezionare il sistema e il modello (León-Buitimea et al. 2022).

L'approccio della biologia sintetica prevede l'utilizzo di cassette di espressione costituite da 4 parti fondamentali: promotore, RBS (*Ribosome Binding Site*), regione codificante e terminatore. L'unione di più cassette permette la formazione di sistemi complessi detti circuiti genetici. Un particolare metodo di assemblaggio delle cassette è il BioBrick Standard Assembly che permette di integrare i principi di astrazione e standardizzazione alla biologia sintetica.

Il primo Standard BioBrick fu ideato da Tom Knight nei primi anni 2000 (Knight n.d.); ogni parte BioBrick presenta un suffisso e un prefisso grazie ai quali è possibile assemblare in modo ordinato le parti e creare sistemi sempre più complessi. Partendo dal primo standard, sono poi state sviluppate e ottimizzate diverse varianti come lo stan-

dard BBF RFC 10, anch'esso ideato da T. Knight nel 2007 e punto di partenza per le parti registrate nel *Registry of Standard Biological Parts* della competizione internazionale di biologia sintetica iGEM (<https://parts.igem.org/Catalog> visitato 08/2023) (Røkke et al. 2014).

Uno degli strumenti che negli ultimi anni ha permesso un rapido sviluppo in biologia sintetica è il sistema di repressione genica CRISPRi (CRISPR interference).

I sistemi CRISPR/Cas, in natura, consistono in brevi sequenze palindromiche ripetute e raggruppate a intervalli regolari a cui viene associata una proteina Cas. Sono presenti in maniera endogena nel DNA sia di batteri che di archea e rappresentano il sistema immunitario adattivo dei procarioti. Sono stati classificati tre tipi di CRISPR/Cas ma i sistemi di tipo I e III sono complessi e non usati per l'ingegneria genetica. In particolare, il sistema di tipo II CRISPR/Cas9 più utilizzato deriva dal sistema immunitario del batterio *Streptococcus pyogenes*. In questo sistema è necessaria la formazione di una guida crRNA (CRISPR RNA) e un attivatore della crRNA detto tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*) che ne permette la maturazione e il legame con la proteina Cas9 (Hryhorowicz et al. 2017).

Il meccanismo del sistema immunitario procariotico basato su CRISPR/Cas9 si svolge in 3 fasi principali:

Inizialmente il batterio infettato acquisisce una sequenza del fago e la memorizza nel CRISPR array come *spacer*; la selezione della sequenza avviene con l'aiuto di motivi specifici PAMs (*Protospacer adjacent motif*) presenti nel genoma virale usati per il riconoscimento della sequenza bersaglio, ma non integrati nel locus CRISPR per non permettere il taglio del genoma batterico. La sequenza PAM viene definita dal tipo di proteina Cas9 usata (5'-NGG-3' in *Streptococcus pyogenes*, N indica qualsiasi nucleotide). Successivamente il CRISPR array viene trascritto in un pre-crRNA e il tracrRNA aiuta nella sua maturazione per formare crRNAs, ciascuno con uno spacer. Successivamente, si lega alla proteina Cas9. Infine, la crRNA guida la proteina Cas9 per tagliare il DNA complementare, 3 nucleotidi a monte della sequenza PAM, grazie ai domini nucleasici HNH e RuvC (Hryhorowicz et al. 2017) (Mahas, Neal Stewart e Mahfouz 2018).

Da quando nel 2012 venne usata la proteina Cas9 e un crRNA per tagliare una specifica sequenza di DNA in vitro (Jinek et al. 2012) il sistema CRISPR/Cas9 ha subito notevoli sviluppi e si è arrivati ora

a poter utilizzare una guida ad RNA chimera sgRNA (single guide RNA) che unisce il crRNA e il tracrRNA permettendo un più facile e veloce utilizzo di questo strumento. Un'importante evoluzione del sistema CRISPR/Cas9 è la CRISPRi in cui la proteina Cas9 viene modificata inattivando i domini catalitici HNH e RuvC e di conseguenza il dominio nucleasico. Si ottiene così la dCas9 (dead Cas9), che non è più in grado di tagliare il doppio filamento di DNA ma si posizionerà sulla sequenza target e rimarrà attaccata impedendo la trascrizione e reprimendo così il gene (Hryhorowicz et al. 2017). Poiché la dCas9 non attua un taglio sul DNA la sua azione è reversibile e diminuisce la probabilità di formazione di mutazioni come invece possono avvenire nel sito di taglio della Cas9.

1.2 Antibiotico resistenza

Secondo l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (Iacchini et al. 2022) l'antibiotico resistenza è uno dei principali problemi della sanità pubblica con un impatto sia a livello clinico che economico. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'Unione Europea stanno ricercando nuove strategie volte a contenere il fenomeno.

L'analisi sull'antibiotico resistenza commissionata dal Governo Britannico ha stimato che nel 2050 l'antibiotico resistenza potrebbe uccidere 10 milioni di persone. Solo nel 2019 infatti ci sono state 4.95 milioni di morti associate a patogeni resistenti agli antibiotici, delle quali 1.27 milioni sono direttamente attribuibili all'antibiotico resistenza (Murray et al. 2022).

In Italia le percentuali di resistenza alle principali classi di antibiotici usate in ambito ospedaliero sono tra le più alte in Europa (Iacchini et al. 2022) e il paese si colloca sopra alla media europea nel consumo di antibiotici come visibile nella figura 1.1, ottenuta dal report: "*Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. L'uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2021 2023*".

L'OMS nel 2017 ha istituito una lista di batteri maggiormente antibiotico resistenti e più problematici nonché impattanti dal punto di vista sanitario, raggruppandoli in una classe definita nell'acronimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*. Questi patogeni per eludere gli antibiotici hanno

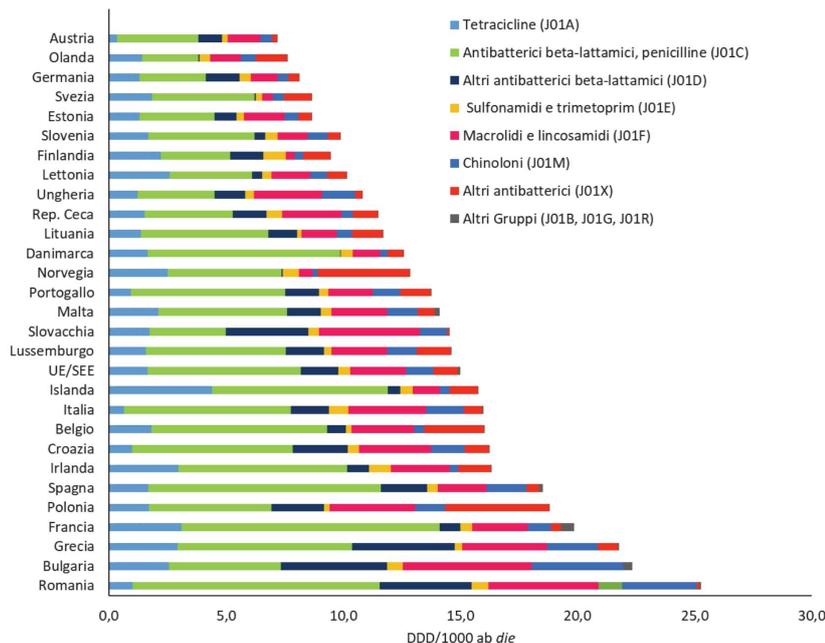


Figura 1.1: Consumo (DDD/1000 ab die) territoriale di antibiotici per Paese

adottato diverse strategie tra le quali: l'alterazione del target antibiotico, minore assorbimento del medicinale, produzione di biofilm o matrici esterne polisaccaridiche, enzimi che degradano gli antibiotici, sovra espressione di pompe di efflusso e alterazione dei percorsi metabolici.

Il fenomeno della multi-resistenza, ossia la resistenza a più classi di antibiotici in contemporanea, è causato principalmente dall'uso eccessivo degli antibiotici sia sull'uomo che negli allevamenti; tuttavia, ancora poco si sta facendo per controllare il loro abuso. (Denissen et al. 2022). Fra le strategie disponibili per affrontare i patogeni multi-resistenti oltre allo sviluppo di nuovi antibiotici o la modifica di quelli già esistenti, stanno iniziando a raccogliere interesse la terapia fagica, l'ingegnerizzazione di fagi e la costruzione di sistemi di controllo microbico ingegnerizzando l'intera cellula vivente (León-Buitimea et al. 2022).

Sebbene queste tecniche possano indubbiamente beneficiare di un approccio basato sulla biologia sintetica per prendere piede e venire rapidamente messe a punto ed ottimizzate per uso clinico, la quantità di strumenti e informazioni disponibili per i batteri appartenenti al gruppo ESKAPE sono ad oggi molto limitate, non essendo questi ultimi degli organismi modello. Per lo sviluppo di un progetto di biologia sintetica si sottolinea quindi la necessità di uno studio più ap-

profondito di questi batteri che saranno presto un problema a livello mondiale.

1.2.1 Il progetto MUTANS

Il progetto MUTANS (<https://mutans.biologia.unipd.it/> visitato 08/2023) si colloca all'interno della realtà universitaria patavina come Progetto Innovativo che si occupa di Biologia sintetica e scienze della vita. Nato nel 2021 da studenti dell'Università di Padova si è posto l'obiettivo di partecipare alla competizione mondiale di biologia sintetica iGEM (igem.org visitato 08/2023).

Il progetto sviluppato per la competizione è denominato P.A.S.T.A. (*Phage Assisted Silencing Tool against Antibiotic resistant*). In particolare, vuole essere uno strumento a sussidio degli antibiotici per evitare il ripetersi dell'evoluzione della resistenza anche contro nuove terapie.

PASTA si basa su due parti principali: un sistema di silenziamento basato sulla CRISPR interference, che ha come bersaglio geni legati alla resistenza antibiotica, ed un sistema di trasporto basato su batteriofagi ingegnerizzati, che indirizza il sistema di silenziamento alle cellule bersaglio (2023.igem.wiki/uni-padua-it/ visitato 08/2023).

I batteri su cui il progetto si concentra sono *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*; proprio su quest'ultimo andrà a concentrarsi questa tesi.

1.3 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii è un batterio gram-negativo, aerobio, non mobile, altamente infettivo e multi-resistente (Biswas e Rather 2019); è in grado di causare severe infezioni nosocomiali con un tasso di mortalità pari al 35%, ma raramente causa malattie fuori dal contesto sanitario.

Il problema maggiore è la sua capacità di acquisire resistenze se esposto a condizioni di essiccamento e ad antibiotici: sono infatti stati riportati casi di ceppi resistenti a tutti gli antibiotici clinicamente disponibili. Questa multi-resistenza è favorita dalla sua capacità di formare biofilm che facilita il trasferimento genico orizzontale mentre protegge i batteri da antibiotici e sistema immunitario. Il biofilm inoltre, essendo in grado di formarsi su quasi ogni tipo di materia-

le impiegato in ambito sanitario, porta ad una elevata trasmissibilità in ambiente ospedaliero (Cavallo et al. 2023). In figura 1.2 sono presenti i principali meccanismi e relativi geni coinvolti nella resistenza antibiotica di *A. baumannii*.

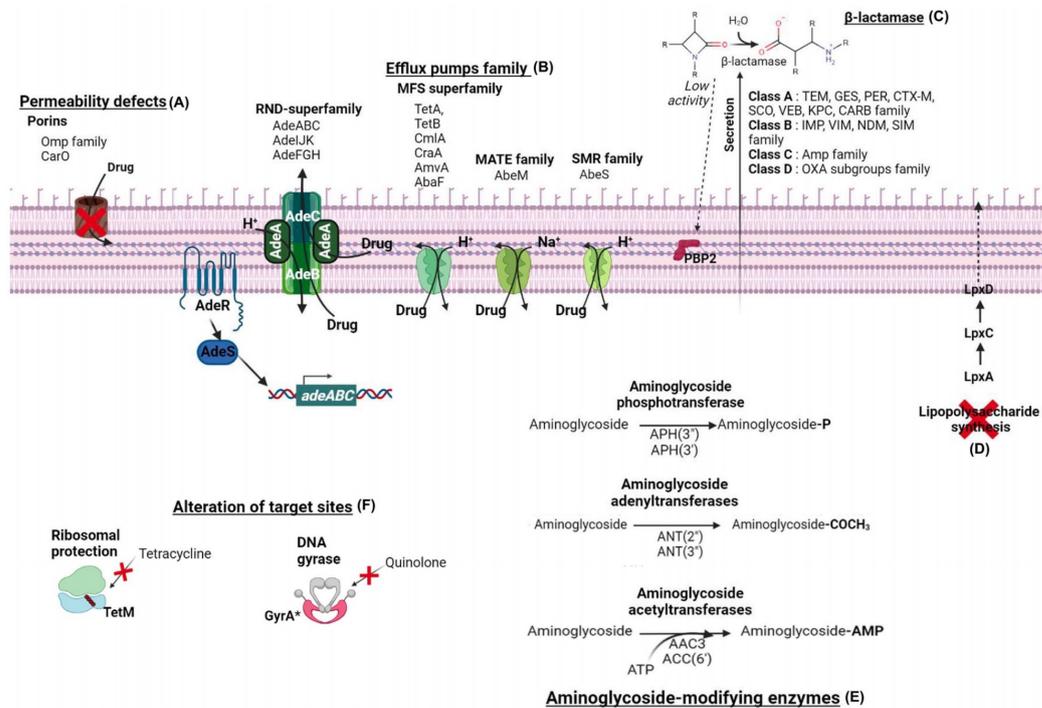


Figura 1.2: Sono qui riportati i principali meccanismi di antibiotico resistenza di *Acinetobacter baumannii*. Questi possono essere divisi in sei categorie. (A) Difetti nella permeabilità della membrana dovuti a modifiche delle porine, proteine di membrana. (B) L'estrusione degli antibiotici in uno o due passaggi per mezzo di pompe di efflusso. (C) L'idrolisi degli antibiotici β -lattamici per opera delle β -lattamasi. (D) La perdita completa di lipopolisaccaridi grazie all'inattivazione della biosintesi dei geni per il lipide A. (E) Enzimi per la modifica degli aminoglicosidi. (F) L'alterazione di siti target di antibiotici. (Cavallo et al. 2023)

Risulta quindi importante ampliare le tecniche e le componenti geniche disponibili per lavorare su questo batterio in modo da rendere più facile e veloce lo sviluppo di nuove terapie efficaci contro di esso.

1.3.1 Trasformazione tramite elettroporazione

Al fine di ingegnerizzare una cellula batterica, è necessario innanzi tutto riuscire a trasferirvi materiale genetico all'interno. La trasformazione di cellule batteriche in vitro si divide in tre passaggi fondamentali: la preparazione delle cellule competenti, lo shock delle cellule ed infine la ripresa.

Nella prima fase di preparazione le cellule vengono rese competenti in modo che possano ricevere del DNA esogeno a seguito di modifiche a livello delle membrane cellulari che vengono rese più permeabili. Nella fase di shock le cellule sono trattate con shock termico/sonico/elettrico che porta all'apertura di pori sulle membrane in modo transiente permettendo al DNA di entrare nella cellula. Nella fase finale di ripresa le cellule trasformate vengono incubate in un terreno ricco di nutrienti in modo da poter riparare i danni causati dallo shock.

La trasformazione chimica può essere applicata solo su ceppi batterici che sono naturalmente competenti; alternativamente, è possibile rendere competenti le cellule batteriche applicando ad una coltura opportunamente concentrata in specifici terreni dei campi elettrici, in un processo definito elettroporazione; per *A. baumannii* si ricorre alla seconda tecnica.

L'elettroporazione consiste nell'applicare a delle cellule precedentemente trattate un campo elettrico che crea dei vortici d'acqua e canali di acqua attraverso la membrana. Il voltaggio presente tra il doppio strato fosfolipidico aumenta e risulta in un riarrangiamento dei fosfolipidi e quindi alla formazione di pori nelle membrane. La tensione è in funzione del potenziale di dipolo della membrana e della struttura dei fosfolipidi, ma anche della purezza del DNA, della temperatura, della densità cellulare, della fase di crescita in cui si trovano le cellule, della composizione del tampone, e della presenza nel genoma di sistemi di restrizione o modifica. Per questi motivi, i protocolli di elettroporazione devono essere ottimizzati per i ceppi batterici che si vogliono utilizzare (Biswas e Rather 2019) (*Gene Pulser Xcell Electroporation System - Instruction Manual* n.d.). Al fine di verificare l'efficienza di trasformazione, è infine necessario disporre di un plasmide da trasformare che fornisca un'opportuno marker di selezione per le cellule trasformate nonché, possibilmente, codifichi per una cassetta d'espressione in grado di generare un fenotipo facilmente misurabile nella cellula trasformata.

2 Scopo del lavoro

Questo lavoro si pone l'obiettivo principale di sviluppare un protocollo di trasformazione attraverso elettroporazione *per Acinetobacter baumannii*, funzionale ed ottimizzato; a tal fine, si occupa inoltre della progettazione e della costruzione di un plasmide per l'espressione di geni ricombinanti, in cui inserire il sistema CRISPRi (provvisto di cassetta di espressione per la proteina dCas9 e la sgRNA), conforme allo standard BioBrick BFB RFC 10, per l'impiego di *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 in biologia sintetica.

3 Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Plasmidi

Plasmide pSGAb-km Come plasmide di partenza è stato scelto pSGAb-km (AddGene link #121999 da Wang et al. 2019), di dimensioni pari a 6073 paia di basi (pb), che presenta 2 ORI (*Origin of Chromosome replication*): pMB1 per la replicazione in *E. coli* e WH1266 per la replicazione in *Acinetobacter baumannii*. Il plasmide presenta il gene per la resistenza alla kanamicina ed è stato usato in Wang et al. 2019 come vettore per la sgRNA di un sistema CRISPR/Cas9. Comprende una versione modificata del promotore BioBrick BBa_J23119 della libreria di promotori sintetici sviluppata da Anderson (Catalogo parti iGEM, libreria di Anderson) che contiene un sito di restrizione per SpeI. Ulteriori informazioni sono visibili nella figura 3.1

Plasmide pSB1A2 Il plasmide pSB1A2 ha una lunghezza di 2940 pb e al suo interno, tra suffisso e prefisso è presente la cassetta iGEM i13507 (887 pb), contenente il (*Ribosome Binding Site*)_b0034, il gene BBA_e1010 per l'espressione della RFP e il terminatore BBA_b0015 composto da 2 terminatori: T7 e TE.

Plasmide J116_dCas_m Il plasmide J116_dCas_m di lunghezza 7062 è stato ottenuto partendo dal plasmide J116_dCas_3k3 come descritto in Zanin 2023. Al suo interno presenta la cassetta di espressione per la proteina dCas9 contenente il promotore BioBrick BBa_J23116 della libreria di promotori sintetici sviluppata da Anderson (Catalogo parti iGEM, libreria di Anderson), l'RBS_b0034, il gene per l'espressione della proteina dCas9 di 4107 pb e infine il terminatore BBA_b0015.

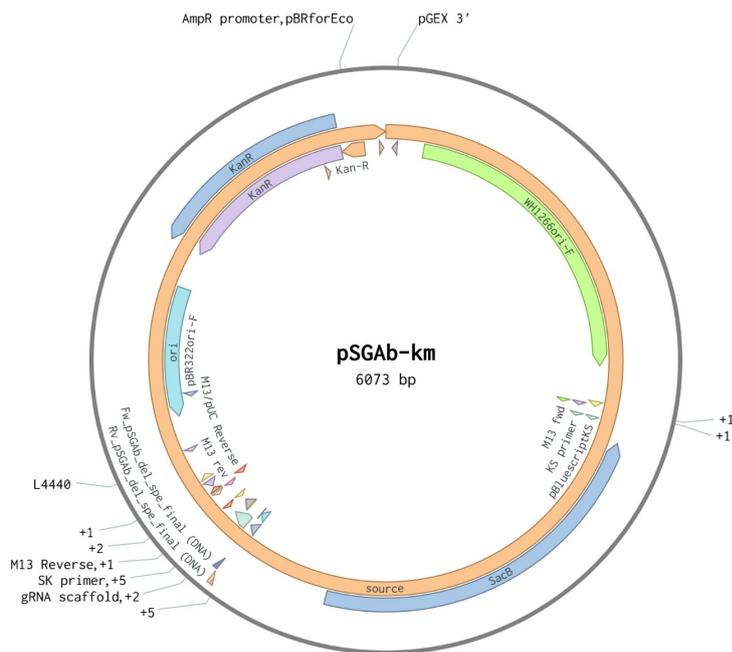


Figura 3.1: Plasmide pSGAb

3.1.2 Ceppi batterici

***Acinetobacter baumannii* ATCC19606** Il ceppo è disponibile presso la collezione ATCC (American Type Culture Collection) sul cui sito è disponibile la scheda del prodotto e il sequenziamento dell'intero genoma (www.atcc.org/products/19606). Si tratta di un batterio aerobico che deve essere utilizzato in un BLS2.

***Escherichia coli* TOP10** Genotipo F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Thermofisher). Si tratta di un ceppo di *E. coli* adatto alla trasformazione chimica.

3.1.3 Oligonucleotidi

Di seguito è riportata la tabella degli oligonucleotidi utilizzati per i sequenziamenti, partendo dal template pSGAb_iGEM, sono stati creati dei primer appaianti nelle regioni a monte e a valle rispettivamente del prefisso e del suffisso in modo da confermare la presenza delle parti inserite.

Nome	Sequenza 5'-3'
FW_seq_pSgAb	gcaactggctctatttcctc
RV_seq_pSgAb	gcaacgcaattaatgtgagt

Tabella 3.1: Lista dei primer utilizzati

3.1.4 Strumentazione

Elettroporatore Sono state utilizzate le cuvette Sigma-Aldrich® electroporation cuvettes da 0.1 cm (SKU Z706078-50EA)

Spettrofotometro Per le quantificazioni è stato usato il NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis della Thermofisher.

Elettroporatore Per le elettroporazioni è stato usato l'elettroporatore Gene Pulser Xcell Electroporation System della Bio-Rad Laboratories (*Gene Pulser Xcell Electroporation System - Instruction Manual* n.d.).

Incubatore L'incubatore utilizzato è il New Brunswick Excella E25 Shaking Incubator.

Lettore di micropiastre Il lettore di micropiastre utilizzato è il Varioskan™ LUX multimode microplate reader.

3.2 Metodi

3.2.1 Trasformazione per elettroporazione

Il protocollo di elettroporazione è stato ottimizzato partendo dalle informazioni riportate nei seguenti riferimenti: Biswas e Rather 2019 e Jacobs et al. 2014.

Giorno 1 Eseguire lo striscio di *A. baumannii* ATCC19606 su una piastra LB e incubare a 37 °C per 16h.

Giorno 2 Dalla piastra inoculare una singola colonia in 4 mL di terreno LB liquido pre-riscaldato a 37 °C all'interno di tubi da inoculo da 13 mL. Incubare a 37 °C a 220 rpm per 16h.

Giorno 3 Inoculare 0.5 mL della coltura del giorno 2 in 50 mL di LB liquido pre-riscaldato a 37 °C in una beuta da 500 mL. Crescere a 37 °C a 220 rpm per 24h.

Giorno 4 Dopo 24h l'inoculo avrà raggiunto un OD_{600} compreso tra 4.5 e 6.0, quindi procedere con i seguenti passi:

1. Trasferire l'inoculo in un tubo da 50 mL e centrifugare per 10 minuti a 10.000 Xg a temperatura ambiente.
2. Eliminare il surnatante e sospendere gentilmente il precipitato in 25 mL di glicerolo 10 % sterile a temperatura ambiente.
3. Centrifugare nuovamente i batteri per 10 minuti a 10.000 Xg, eliminare il surnatante e sospendere gentilmente il precipitato in 25 mL di glicerolo 10 % sterile a temperatura ambiente.
4. Centrifugare nuovamente i batteri per 10 minuti a 10.000 Xg, eliminare il surnatante e sospendere gentilmente il precipitato in 1.5 mL di glicerolo 10 % sterile a temperatura ambiente.
5. Per ogni elettroporazione, usare 50 μ L.¹
6. In un tubo da 1.5 mL unire 50 μ L di elettrocompetenti e 1 μ L di DNA plasmidico (in concentrazione di circa 25 ng/ μ L), mischiare gentilmente.
7. Eseguire l'elettroporazione con i seguenti parametri: 1800 V, 100 Ω , 25 μ F in cuvette da 1 mm.
8. Velocemente, dopo aver elettroporato, aggiungere 950 μ L di terreno liquido SOC pre-riscaldato a 37 °C nella cuvetta da elettroporazione e mischiare.
9. Trasferire tutto in un tubo da inoculo da 13 mL e incubare a 37 °C a 220rpm per 1h.²
10. Piastrare 100 μ L di cellule su piastre LB che contengono l'antibiotico necessario (pre-riscaldate a 37 °C).

¹I competenti che non vengono usati possono essere conservati a -80 °C aliquotando 50 μ L in tubi da 1.5 mL.

²Per limitazioni dovute alla capienza delle cuvette e dei puntali disponibili è stato deciso di aggiungere solamente 140 μ L di SOC pre-riscaldato all'interno della cuvetta e successivamente trasferirli nei tubi da inoculo preparati in precedenza e contenenti 810 μ L di SOC pre-riscaldato.

11. Quindi incubare a 37 °C per 16h

Nel caso si volessero trasformare batteri resi elettrocompetenti in precedenza, prendere lo stock da -80 °C ottenuto nel punto 5 e procedere con gli step successivi dopo averli fatti scongelare in ghiaccio.

Le modifiche apportate ai protocolli sopra citati sono riportate nella Sezione 4.1 di Risultati e discussione.

3.2.2 Misura dell'efficienza di trasformazione

Partendo da una piastra LB (con kanamicina 25 ng/ μ L) contenente colonie di *A. baumannii* elettroporato, in cui è stato inserito il plasmide pSGAb_I13507, è stata presa una singola colonia rossa ed è stata inoculata in 4 mL di LB liquido selettivo (kanamicina 25 ng/ μ L) in tubi da inoculo da 13 mL, quindi è stata lasciata in incubazione per 18h a 37 °C a 220 rpm.

Il giorno successivo sono stati piastrati 100 μ L su terreno LB selettivo (kanamicina 25 ng/ μ L) con diluizioni 1:1.000 e 1:10.000, quindi le piastre sono state incubate per 24h a 37 °C. Una volta cresciute le colonie sono state contate. In totale sono state eseguite 5 conte per ognuna delle due diluizioni, per un totale di 10 piastre.

3.2.3 Propagazione plasmidi

Le colonie di *E. coli* necessarie per la propagazione dei plasmidi sono state coltivate in 5 mL di terreno LB liquido selettivo (kanamicina 25 ng/ μ L per tutte le versioni di pSGAb) in tubo da 15 mL. Successivamente si seleziona una colonia ben isolata dalla piastra di trasformazione e viene inoculata con un puntale sterile all'interno del terreno LB. Quindi si lascia la provetta in incubazione per 16h a 37 °C a 220 rpm.

3.2.4 Estrazione DNA plasmidico e quantificazione

Il DNA plasmidico è stato estratto attraverso il kit QIAprep Spin Miniprep® (QIAGEN ID: 27104) usando il protocollo fornito con il kit. La quantificazione è stata eseguita utilizzando lo spettrofotometro riportato nella Sezione Strumenti 3.1.4

3.2.5 BioBrick Standard Assembly 10

Lo Standard BioBrick scelto per la costruzione dei plasmidi è il BBF RFC 10 ideato da Tom Knight nel 2007. Presenta un prefisso e suffisso standard che permettono il veloce assemblaggio di tutte le parti compatibili.

Il prefisso presenta, in ordine, i siti di restrizione per gli enzimi **EcoRI**, **NotI** e **XbaI** (5'-GAATTCGCGGCCGCTCTAGAg-3').

Il suffisso invece presenta, in ordine, i siti di restrizione per gli enzimi **SpeI**, **NotI** e **PstI** (5'-tACTAGTgCGGCCGCTGCAG-3').

Gli enzimi XbaI e SpeI sono isocaudameri ossia, una volta avvenuto il taglio, formano delle estremità coesive complementari, le due estremità legandosi vanno a creare una sequenza che non è riconosciuta da nessuno degli enzimi di restrizione e viene quindi definita "cicatrice" (5'-TACTAG-3') (Røkke et al. 2014).

Per unire due parti BioBrick è quindi possibile decidere se inserire un inserto BioBrick a monte o a valle del BioBrick già presente nella *backbone* che si intende mantenere come vettore, generando un nuovo inserto che è ancora confacente allo standard BioBrick. Nel caso di un inserimento a monte, è possibile digerire l'inserto con gli enzimi EcoRI e SpeI mentre la *backbone* viene digerita con gli enzimi EcoRI e XbaI. In questo modo andrà a ricrearsi il prefisso a monte e la cicatrice a valle. Se invece si vuole andare a inserire del DNA a valle dell'inserto presente nel *backbone* di interesse, ossia nella regione del suffisso, è sufficiente andare a digerire l'inserto con gli enzimi XbaI e PstI, mentre la *backbone* con gli enzimi SpeI e PstI.

3.2.6 Digestione, purificazione e ligazione

La reazione di digestione è stata eseguita utilizzando 100 ng di DNA plasmidico, 10 U degli enzimi di restrizione utilizzati, 2.5 µL di Fast-Digest Buffer (ThermoFisher) fornito con gli enzimi ed acqua demineralizzata per raggiungere il volume di reazione finale di 25 µL. Per verificare la riuscita della reazione, è stata caricata su un gel di agarosio al 1% una aliquota del digerito.

La purificazione è stata condotta utilizzando il kit QIAquick® PCR Purification & Gel Cleanup Kit (QIAGEN ID: 28506) seguendo il protocollo fornito.

La reazione di ligazione è stata eseguita in un tubo da 0.2 mL in cui è stato inserito il DNA del vettore, il DNA dell'inserto, 2 µL di Buffer Ligasi 10X (Thermofisher #B69), 400 U di T4 DNA ligasi (Thermofisher #EL0011) e acqua deionizzata per raggiungere il volume di reazione di 10 µL. Per determinare le quantità di vettore e inserto da utilizzare si usa la seguente formula:

$$X(\text{ng}) = [Y(\text{pb}) * 300 \text{ ng}] / V(\text{pb})$$

in cui X corrisponde all'inserto, Y alle paia di basi dell'inserto e V alle paia di basi del vettore plasmidico.

L'incubazione è stata impostata a 16 °C per 16h. Successivamente l'enzima è stato disattivato attraverso un procedimento termico a 65 °C per 10 minuti. Quindi il prodotto di ligazione è stato trasformato in *E.coli* Top 10 chimicamente competente come stock a lungo termine.

3.2.7 Sequenziamento

I campioni sono stati sequenziati con metodo Sanger tramite il servizio offerto da Eurofins Genomics, preparando i campioni come da loro richiesto. Brevemente, 100 ng/µL di plasmide vengono aliquotati in un volume totale di 5 µL, a cui vengono aggiunti 5 µmol di primer, spediti poi per via postale al servizio.

3.2.8 Misura dell'efficienza di sintesi

Per misurare l'efficienza di sintesi del plasmide pSGAb_I13507 trasformato per elettroporazione all'interno di *A. baumannii* si è deciso di eseguire una analisi al lettore di micropiastre. I pozzetti sono stati preparati inserendo LB liquido e batteri diluiti al 2.5 %. La durata totale delle misurazioni è stata di 14h, i parametri utilizzati sono: agitazione pulsata a 300 rpm, 37 °C, le analisi turbidimetriche sono state condotte ad una lunghezza d'onda di 600 nm, le analisi di fluorescenza sono state condotte con lunghezza d'onda eccitatoria di 535 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 610 nm, la larghezza di banda di eccitazione è stata impostata a 5 nm; entrambe i parametri (turbidimetrici e di fluorescenza) sono stati misurati ogni 100 ms. Sono stati caricati campioni contenenti le 5 colonie ottenute dalla prima elettroporazione di *A. baumannii* con pSGAb_I13507, quindi campioni di

E. coli contengono un plasmide che esprime il gene RFP con il promotore pTet e altri che lo esprimono con il promotore J23101, infine sono stati caricati campioni di *A. baumannii* WT (*Wild type*) e *E. coli* WT; ogni campione è stato caricato in triplo.

4 Risultati e discussione

4.1 Ottimizzazione protocollo di elettroporazione

Il protocollo di elettroporazione è stato ottimizzato considerando i seguenti protocolli: Biswas e Rather 2019 e Jacobs et al. 2014. Il rapporto del volume di LB e la capacità del tubo di inoculo è stato mantenuto pari a 0,3. Mentre il rapporto tra il volume dell'inoculo e la capacità della beuta utilizzata per il secondo inoculo è stato mantenuto pari a 0,1. Questi bassi rapporti sono necessari poiché *A. baumannii* è un batterio aerobico che necessita di grandi quantità di aria per poter crescere in modo adeguato (Yildirim et al. 2016). Per questo stesso motivo l'agitazione dell'incubatore deve essere mantenuta a 220 rpm.

Poiché il procedimento prevede l'esecuzione di due inoculi l'OD600 risulta essere molto alto e per questo il precipitato risulta essere di dimensioni notevoli e particolarmente adeso alle pareti della provetta. Il motivo principale per cui vengono eseguiti i due inoculi, oltre a quello di formare un buon precipitato, è quello di raggiungere il momento iniziale della fase di crescita stazionaria, momento migliore per elettroporare *A. baumannii* visti gli studi riportati da Biswas e Rather 2019 e Yildirim et al. 2016.

I parametri dell'elettroporatore utilizzati (1800 V, 100 Ω , 25 μ F) sono stati scelti dopo aver precedentemente testato quelli riportati nel protocollo Jacobs et al. 2014 (1700 V, 100 Ω , 25 μ F) che avevano però dato risultato negativo.

Utilizzando il protocollo presentato al Capitolo 3 la prima elettroporazione aveva portato alla crescita di colonie fenotipicamente sia bianche che rosse. In particolare sono state selezionate cinque colonie delle quali quattro visibilmente bianche e una visibilmente rossa (campione 2.2A visibile nell'immagine 4.2a).

Per verificare la riuscita dell'esperimento sono stati eseguiti diversi test sia per confermare l'identità del batterio sia per confermare

l'effettiva trasformazione del plasmide pSGAb_I13507; in particolare è stato eseguito un test microbiologico MALDI-TOF presso l'Unità Operativa Complessa di microbiologia dell'Azienda Ospedale di Padova che ha confermato l'identità delle colonie come *A. baumannii*, mentre per confermare la presenza del plasmide è stato estratto il DNA plasmidico e mandato a sequenziare, i primer FW_seq_pSGAb e RV_seq_pSGAb (Tabella 3.1) hanno confermato la presenza del gene RFP e quindi del plasmide pSGAb_I13507 in tutte e 5 le colonie.

Inoltre, nonostante Jacobs et al. 2014 riportasse una diminuita efficienza di trasformazione dai campioni mantenuti a -80°C , i test di elettroporazione eseguiti hanno avuto successo e non è stata rilevata una particolare perdita di efficienza.

Per comprendere il motivo per il quale alcune delle colonie presentassero un fenotipo rosso altre invece un fenotipo bianco sono stati eseguiti due test principali: una analisi della crescita e della fluorescenza attraverso il lettore di micropiastre e una conta delle colonie entrambi riportati nel capitolo 4.2.1.

4.2 Costruzione plasmide

Per rendere pSGAb-km conforme allo standard BioBrick precedentemente descritto è stato necessario aggiungere le sequenze di prefisso e suffisso, eliminare i siti di restrizione EcoRI, XbaI, SpeI e PstI presenti all'interno del plasmide in un *Multiple Cloning Site* ed eliminare il promotore e la sgRNA originariamente presenti.

Per attuare queste modifiche è stato possibile procedere con un singolo passaggio. In particolare, la reazione di restrizione per togliere la cassetta d'espressione del sgRNA, da promotore a terminatore inclusi, è stata eseguita usando gli enzimi HindII (ThermoFisher #FD0504) e SacI (ThermoFisher #FD1133), la successiva reazione di ligazione ha permesso l'inserimento nel *backbone* di un inserto, presente in figura 4.1, fatto sintetizzare da Eurofins Genomics Padova.

All'estremità dell'inserto troviamo 6 pb (*landing bases*) necessarie per permettere il corretto riconoscimento e legame ai siti di restrizione da parte degli enzimi HindIII e SacI, presenti appena dopo le 6 pb, da parte degli enzimi con cui è stata successivamente digerita la sequenza (oltre che per minimizzare errori in regioni rilevanti durante la sintesi). Internamente, la sequenza presenta poi in ordine: il prefisso, il



Figura 4.1: Inserto utilizzato per aggiungere suffisso e prefisso e per eliminare i siti di restrizione superflui e la cassetta per la sgRNA.

promotore standardizzato iGEM BBa_J23119 e quindi il suffisso. In questo modo è stato ottenuto il plasmide denominato pSGAb_iGEM di dimensione pari a 5966 pb.

Successivamente è stata eseguita una seconda reazione di digestione utilizzando gli enzimi XbaI (Thermofisher #FD0684) e PstI (Thermofisher #FD0614) per permettere l’inserimento della cassetta iGEM i13507 di 887 pb che presenta la sequenza del *Ribosome binding site_B0034*, il gene indicatore RFP BBA_e101 e il terminatore BBA_b0015 presente all’interno del plasmide pSB1A2 (Preso dal registro delle parti standard iGEM) digerito con gli enzimi XbaI (Thermofisher) e PstI (Thermofisher). Il plasmide ottenuto è stato denominato pSGAb_I13507 con dimensioni pari a 6835 pb e presenta quindi il gene codificante la RFP espresso dal promotore BBa_J23119.

Per verificare la sequenza, il plasmide ottenuto, pSGAb_I13507, è stato sequenziato utilizzando i primer FW_seq_pSGAb e RV_seq_pSGAb in tabella 3.1 che ne hanno confermato la correttezza.

In questo modo si è quindi ottenuto un plasmide funzionante in *A. baumannii* che permette, grazie allo standard BioBrick utilizzato, di costruire circuiti genetici arbitrariamente complessi assemblandoli in modo semplice e veloce.

4.2.1 Stabilità del plasmide con RFP

Una volta eseguita l’elettroporazione le colonie risultanti hanno presentato una discreta variabilità nella espressione della RFP, valutata fenotipicamente a livello qualitativo (colonie visibili rosse o colonie visibili bianche). Per questo motivo si è deciso di procedere con un test di colture seriali per verificare il rate di insorgenza di mutanti; quindi, selezionando una delle colonie rosse dalla piastra di elettroporazione, sono stati eseguiti una serie di inoculi e piastraggi. L’ipotesi iniziale prevede che le colonie bianche siano dovute a una mutazione nella cassetta di espressione della RFP, questa mutazione inibisce l’espressione del gene andando ad alleggerire il carico metabolico dei batteri mutati, rendendo questa mutazione favorevole.

n° test	Diluizione 1:1.000			Diluizione 1:10.000		
	Colonie rosse	Colonie bianche	Rapporto	Colonie rosse	Colonie bianche	Rapporto
1	276	46	0,8571	46	3	0,9388
2	366	143	0,7191	47	8	0,8545
3	0	Tutte	0	0	Tutte	0
4	199	15	0,9299	7	2	0,7778
5	695	186	0,7889	119	10	0,9225

Tabella 4.1: Dati ottenuti dalla conta delle colonie di *A. baumannii* elettroperate con pSGAb_I13507. Il rapporto è stato calcolato dividendo il numero di colonie rosse con il numero totale delle colonie (rosse più bianche).

Una volta contate le colonie rosse e bianche sono stati ottenuti i dati riportati nella tabella 4.1. Come è possibile vedere nella tabella, i rapporti di insorgenza di colonie bianche sembrano mantenersi sempre attorno al 80%. Tuttavia, i rapporti tra colonie bianche e rosse del test n° 3 presentano un valore di colonie rosse pari a 0, nonostante questo l'inoculo cresciuto dalla selezione di una di queste colonie bianche è risultato rosso ed è possibile vedere anche in tabella che le colonie cresciute nel test n°4 presentano un rapporto di colonie rosse e bianche simile ai test n°1 (immagine 4.2b), n°2 e n°5.

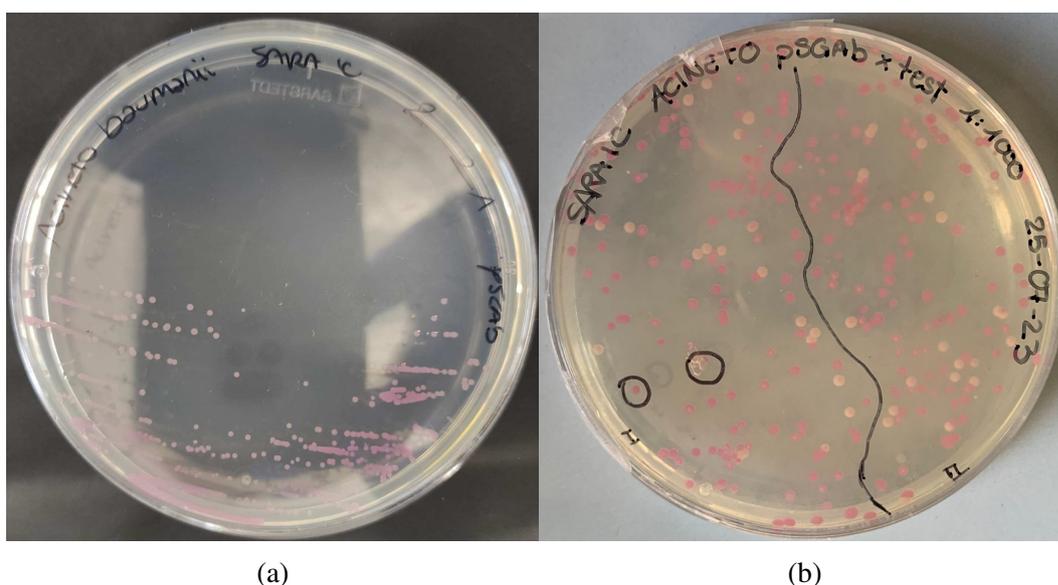


Figura 4.2: Colonie di *A. baumannii* elettroperate con pSGAb_I13507. (a) Striscio della colonia 2.2A risultata visibilmente rossa nella prima elettroporazione. (b) Conta delle colonie, piastra del test 1.

I dati riportati nelle immagini 4.3 sono stati ottenuti analizzando al lettore di micropiastre le 5 colonie di *A. baumannii* elettroporato con pSGAb_I13507 sopra citate e mettendole a confronto con l'espressione della RFP in *E. coli* TOP 10 espressa con due diversi promotori (pTet e J23101); e campioni non trasformati di *A. baumannii* e *E. coli*.

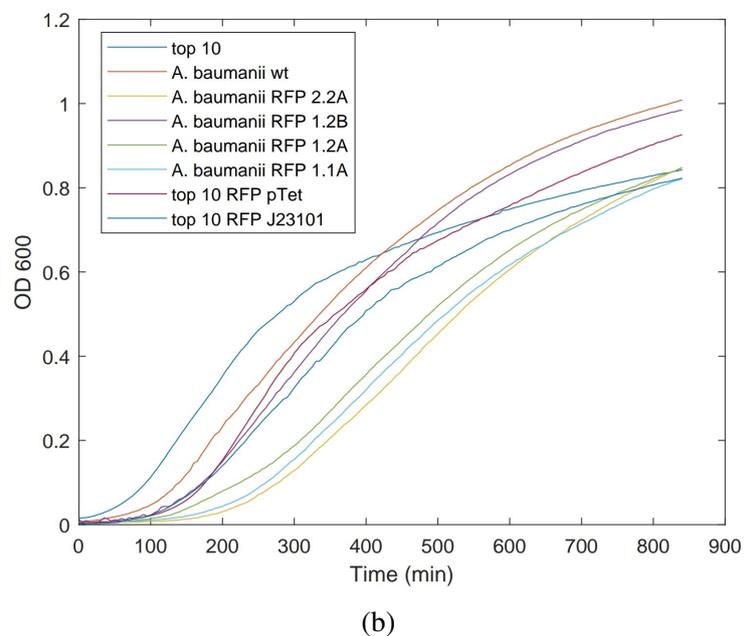
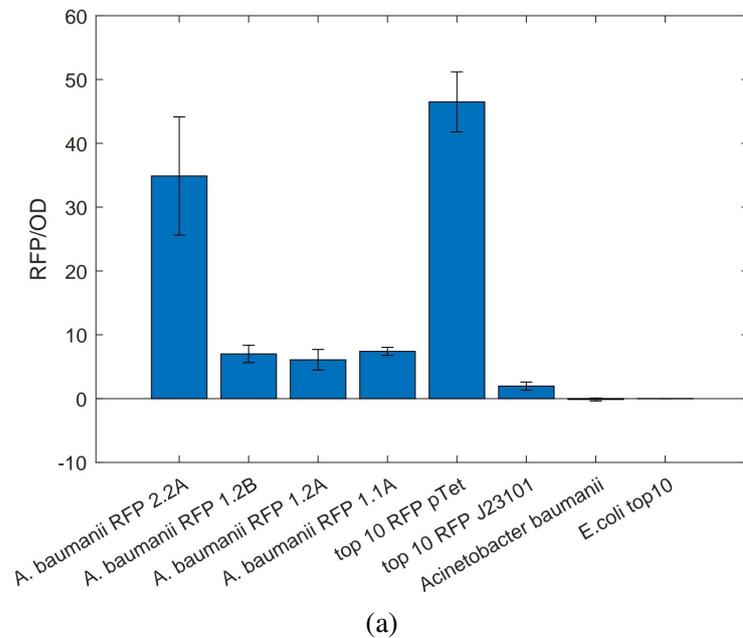


Figura 4.3: Dati ottenuti dal lettore di micropiastre sulle 5 colonie elettroporate. (a) Analisi della fluorescenza dei campioni. (b) Analisi turbidimetrica dei campioni.

Come mostrato nell'immagine 4.3a la colonia 2.2A, ovvero quella visibilmente rossa presenta un'elevata espressione della RFP comparabile con quella di *E. coli* e il promotore pTet, per quanto riguarda

gli altri campioni (1.2B, 1.2A e 1.1A) l'espressione della RFP risulta notevolmente minore. Questi risultati indicano quindi che la produzione della proteina RFP è minore nelle colonie non visibilmente rosse, come era aspettato, ma non è completamente nulla.

Le analisi turbidimetriche (immagine 4.3b) mostrano come *A. baumannii* WT abbia una crescita maggiore rispetto ai campioni 2.2A, 1.2A e 1.1A ma è paragonabile alla crescita del campione 1.2B; se per quanto riguarda il campione 2.2A era prevedibile una minore crescita vista la maggiore espressione della RFP che presenta un determinato peso metabolico, per i campioni 2.2A, 1.2A e 1.1A invece era previsto un andamento più simile al campione 1.2B. Inoltre si può notare come la crescita di *E. coli* TOP 10 RFP pTet sia maggiore rispetto al campione 2.2A nonostante la analisi di fluorescenza mostri una maggiore presenza della proteina RFP e la crescita di *A. baumannii* WT sia maggiore della crescita di *E. coli* WT. Questi dati potrebbero indicare come l'espressione della proteina RFP sia particolarmente onerosa per il ceppo *A. baumannii* ATCC 19606 rispetto ad un ceppo modello come *E. coli* TOP 10.

Se l'ipotesi iniziale fosse stata corretta, successivamente al test n°3, le colonie non dovrebbero più presentare un fenotipo rosso mentre, come abbiamo già detto, sia l'inoculo che i test successivi presentano colonie visibilmente rosse, inoltre, confrontando le curve di crescita, tutte le colonie che non esprimono visibilmente RFP dovrebbero avere un vantaggio metabolico e quindi una maggiore crescita, che è però solo visibile in uno dei campioni.

L'ipotesi che quindi è stata successivamente formulata è che all'interno dello stesso ceppo di *A. baumannii* ATCC19606 possa esserci una certa variabilità nell'espressione della proteina RFP (in questo caso) e che quindi non sempre è visibile: non essendo *A. baumannii* ATCC19606 un batterio modello si ritiene sia presente un'intrinseca variabilità biologica.

4.2.2 Inserimento cassetta CRISPRi

L'inserimento della cassetta CRISPRi è stato organizzato nel seguente modo: in primo luogo verrà aggiunta la cassetta di espressione per la proteina dCas9 e successivamente la cassetta per la sgRNA.

Per inserire la dCas9 all'interno del plasmide pSGAb_I13507 sia l'inserito dal plasmide J116_dCas_m che la *backbone* da pSGAb_I13507

sono stati digeriti con gli enzimi EcoRI(Thermofisher #FD0274) e PstI in modo da sostituire la cassetta di espressione per la RFP con la cassetta di espressione per la proteina dCas9. Sono quindi stati isolati attraverso gel di agarosio ed è poi stata eseguita la ligazione tra il frammento *backbone* di pSGAb_I13507 e l'inserto dal plasmide J116_dCas_m. Per confermare l'inserimento è stato eseguito un sequenziamento che però ha dato esito negativo (ulteriori protocolli ed esperimenti sono riportati in Zanin 2023).

Per quanto riguarda le guide queste sono state disegnate per essere successivamente sintetizzate nel seguente modo: la guida viene disegnata posizionando, subito a valle del promotore (BBA_J23119) una sequenza di 20 nucleotidi che sarà l'RNA guida (gRNA) seguito da una sequenza di 80 nucleotidi detta gRNA *scaffold*, che forma un motivo a forcina e permette il legame della guida con la proteina Cas9. In fine viene posizionato il terminatore (BBa_B0010 rrnB T1). A valle e a monte sono posizionati le sequenze di prefisso e suffisso con 6 nucleotidi alle estremità. Per ulteriori dettagli sul *design* delle sgRNA consultare Zanin 2023.

5 Conclusione

L'antibiotico resistenza è uno dei problemi più preoccupanti, sia l'ISS che l'OMS portano dati allarmanti a riguardo, ma ad oggi non sono ancora state adottate sufficienti misure per contrastare in modo efficace la sua avanzata. Sono infatti pochi gli antibiotici disponibili contro i batteri multi-resistenti e in alcuni casi non sono disponibili antibiotici efficaci. Sia in ambito umano che in quello zootecnico e agricolo si sottolinea l'importanza di limitare l'uso degli antibiotici e di somministrarli con criterio e attenzione.

Nuovi antibiotici sono in via di sviluppo ma la ricerca negli ultimi anni è rallentata e si rende necessaria la ricerca di nuovi approcci terapeutici contro questi batteri; per questo, il progetto PASTA, all'interno del quale si colloca questa tesi, vuole proporre nuove piattaforme per facilitare lo studio di alcuni batteri multi-resistenti particolarmente preoccupanti, finalizzate allo sviluppo di un nuovo approccio terapeutico descritto al Capitolo 1.2.1.

La trasformazione per elettroporazione, il cui protocollo è stato riportato nel Capitolo 3 deve essere considerata valida per *A. baumannii* ATCC19606 in quanto differenti ceppi presentano un tasso di crescita diverso e caratteristiche fisiche differenti. L'efficienza di trasformazione di questo protocollo non risulta essere elevata come riportato in Biswas e Rather 2019 e, agendo su ulteriori parametri, potrebbe essere possibile aumentare la resa del protocollo.

Vista la difficoltà nell'ottenere un protocollo di trasformazione funzionale in *A. baumannii* ATCC19606 e la poca disponibilità di risorse in letteratura, si sottolinea nuovamente la necessità di sviluppare protocolli efficienti e facilmente adattabili a ceppi non modello.

I dati ottenuti in questo elaborato hanno portato alla formazione di un plasmide, conforme allo Standard Assembly BioBrick BBF RFC 10, che viene espresso in *Acinetobacter baumannii*. Sono necessari ulteriori studi riguardo alla variabilità fenotipica riscontrata per ca-

pirne meglio l'andamento, un interessante approccio per analizzare l'espressione variabile di questo plasmide in *A. baumannii* potrebbe coinvolgere un esperimento di RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) in modo da poter confrontare i livelli di trascrizione del gene RFP nelle diverse colonie. Nel caso del campione 1.2B che presentava una crescita maggiore rispetto agli altri campioni trasformati la variazione potrebbe essere data da una minore formazione di mRNA che spiegherebbe sia la poca fluorescenza che la maggiore crescita; nel caso delle colonie che presentano poca fluorescenza e minore crescita i livelli di mRNA aspettati sarebbero più alti indicando che il problema potrebbe essere la non completa traduzione della proteina RFP o la formazione di una proteina non perfettamente funzionale anche a causa del troppo carico metabolico richiesto.

Una volta inserito il sistema CRISPRi all'interno del plasmide sarà necessario indagarne la tossicità e in caso optare per l'utilizzo di una combinazione promotore-RBS più o meno forte a seconda dei risultati. Durante il lavoro sono state disegnate le sgRNA che andranno successivamente testate in vitro. I geni che sono stati presi in considerazione sono riportati in Zanin 2023.

Bibliografia

- Jinek, Martin et al. (ago. 2012). “A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”. en. In: *Science* 337.6096, pp. 816–821. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1225829. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829> (visitato il 25/07/2023).
- Jacobs, Anna C. et al. (nov. 2014). “Genetic Manipulation of *Acinetobacter baumannii*”. en. In: *Current Protocols in Microbiology* 35.1. ISSN: 1934-8525, 1934-8533. DOI: 10.1002/9780471729259.mc06g02s35. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc06g02s35> (visitato il 06/08/2023).
- Røkke, Gunvor et al. (2014). “BioBrick Assembly Standards and Techniques and Associated Software Tools”. en. In: *DNA Cloning and Assembly Methods*. A cura di Svein Valla e Rahmi Lale. Vol. 1116. Series Title: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 1–24. ISBN: 978-1-62703-763-1 978-1-62703-764-8. DOI: 10.1007/978-1-62703-764-8_1. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-764-8_1 (visitato il 24/07/2023).
- Yildirim, Suleyman et al. (feb. 2016). “Evaluation of Parameters for High Efficiency Transformation of *Acinetobacter baumannii*”. en. In: *Scientific Reports* 6.1, p. 22110. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep22110. URL: <https://www.nature.com/articles/srep22110> (visitato il 16/08/2023).
- Hryhorowicz, Magdalena et al. (giu. 2017). “CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering”. en. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 65.3, pp. 233–240. ISSN: 0004-069X, 1661-4917. DOI: 10.1007/s00005-016-0427-5. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-016-0427-5> (visitato il 24/07/2023).
- Mahas, Ahmed, C. Neal Stewart e Magdy M. Mahfouz (gen. 2018). “Harnessing CRISPR/Cas systems for programmable transcriptional and post-transcriptional regulation”. en. In: *Biotechnology Advances* 36.1, pp. 295–310. ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.008. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301507> (visitato il 20/07/2023).
- Biswas, Indranil e Philip N. Rather, cur. (2019). *Acinetobacter baumannii: Methods and Protocols*. en. Vol. 1946. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4939-9117-4 978-1-4939-9118-1. DOI: 10.1007/978-1-4939-9118-1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9118-1> (visitato il 30/07/2023).

-
- Wang, Yu et al. (dic. 2019). “A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Genome Engineering Platform in *Acinetobacter baumannii* to Understand the H₂O₂-Sensing Mechanism of OxyR”. en. In: *Cell Chemical Biology* 26.12, 1732–1742.e5. ISSN: 24519456. DOI: 10.1016/j.chembiol.2019.09.003. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451945619302776> (visitato il 10/08/2023).
- Denissen, Julia et al. (lug. 2022). “Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health”. en. In: *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 244, p. 114006. ISSN: 14384639. DOI: 10.1016/j.ijheh.2022.114006. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S143846392200089X> (visitato il 29/07/2023).
- Iacchini, Simone et al. (2022). *AR-ISS: National Antibiotic-Resistance Surveillance. Data 2021*. Rapp. tecn. Istituto Superiore di Sanità.
- León-Buitimea, Angel et al. (mag. 2022). “Synthetic Biology Tools for Engineering Microbial Cells to Fight Superbugs”. en. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10, p. 869206. ISSN: 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2022.869206. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.869206/full> (visitato il 13/07/2023).
- Murray, Christopher J L et al. (feb. 2022). “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis”. en. In: *The Lancet* 399.10325, pp. 629–655. ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621027240> (visitato il 12/08/2023).
- Cavallo, Ilaria et al. (giu. 2023). “*Acinetobacter baumannii* in the critically ill: complex infections get complicated”. en. In: *Frontiers in Microbiology* 14, p. 1196774. ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1196774. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1196774/full> (visitato il 13/07/2023).
- Osservatorio Nazionale sull’impiego dei Medicinali. *L’uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2021* (2023). Rapp. tecn. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco.
- Zanin, Chiara (2023). *Assembly of genetic parts for CRISPR interference against antimicrobial resistance*. Scuola di Scienze, Università degli studi di Padova a.a. 2022/23.
- Gene Pulser Xcell Electroporation System - Instruction Manual* (n.d.). Bio-Rad Laboratories, Inc.
- Knight, Tom (n.d.). “Standard Sequence Assembly of Biobricks”. en. In: ()