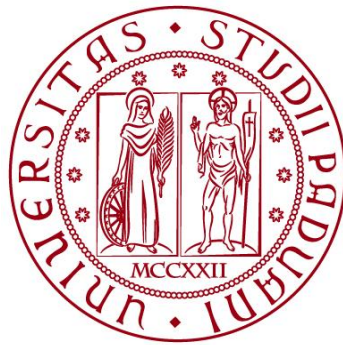


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DI MUTANTI DEL GENE
RRM2B NELLO ZEBRAFISH OTTENUTI MEDIANTE
TECNOLOGIA CRISPR/CAS9**

Tutor: Prof.ssa Giovanna Pontarin

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Silvia Graziani

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Ester Zamarian

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1. Malattie da deplezione del DNA mitocondriale	2
1.2. La ribonucleotide reduttasi e la subunità RRM2B	3
1.3. Editing genetico mediante CRISPR/Cas9.....	5
2. MATERIALI E METODI	6
2.1. Allevamento di <i>Danio rerio</i>	6
2.2. Estrazione rapida del DNA genomico mediante lisi alcalina	7
2.3. Amplificazione del DNA mediante PCR	7
2.4. Elettroforesi su gel di agarosio	9
2.5. Sequenziamento Sanger	9
3. RISULTATI	12
3.1. Genotipizzazione della generazione F1 e identificazione degli eterozigoti	12
3.2. Genotipizzazione della generazione F2 e identificazione degli omozigoti	13
3.3. Caratterizzazione molecolare e analisi bioinformatica della variante di <i>rrm2b</i>	14
3.3.1. Identificazione della delezione mediante sequenziamento Sanger....	14
3.3.2. Conseguenze della delezione sul frame di lettura	15
3.3.3. Predizione dell'impatto funzionale della mutazione	16
4. CONCLUSIONI.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	20

ABSTRACT

La ribonucleotide reductasi (RNR) è un enzima essenziale per la sintesi *de novo* dei precursori del DNA, poiché catalizza la riduzione dei ribonucleotidi difosfato (NDP) nei corrispondenti deossiribonucleotidi difosfato (dNDP). Tra le sue subunità, RRM2B svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento del numero di copie del DNA mitocondriale (mtDNA). Mutazioni nel gene *RRM2B* sono associate a una grave encefalomiopatia caratterizzata da un ridotto numero di copie del mtDNA in diversi tessuti. L'obiettivo di questa tesi è stato identificare e caratterizzare mutanti del gene *rrm2b* nello zebrafish (*Danio rerio*), utilizzato come organismo modello, mediante la tecnologia di *genome editing* CRISPR/Cas9. Le linee mutanti erano state precedentemente generate attraverso la microiniezione del sistema CRISPR/Cas9 in uova fecondate (generazione F0), successivamente incrociate con esemplari *wild type* per ottenere la generazione F1. Il lavoro di tesi ha previsto lo screening molecolare degli individui eterozigoti portatori della mutazione e il loro successivo accoppiamento per ottenere animali omozigoti, necessari per la caratterizzazione della mutazione nel gene *rrm2b*. Lo sviluppo di questo modello sperimentale rappresenta uno strumento utile per approfondire i meccanismi patogenetici alla base delle sindromi da deplezione del DNA mitocondriale e per favorire l'identificazione di potenziali strategie terapeutiche.

1. INTRODUZIONE

1.1. Malattie da deplezione del DNA mitocondriale

Le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS, *Mitochondrial DNA Depletion Syndrome*) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie umane accomunate da un ridotto numero di copie di DNA mitocondriale (mtDNA) in specifici tessuti. Poiché l'mtDNA codifica per 13 subunità essenziali dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, una caratteristica comune di questo gruppo di patologie è un deficit della produzione di ATP. Si tratta di malattie che coinvolgono mutazioni a carico di geni appartenenti al DNA nucleare trasmesse prevalentemente con ereditarietà autosomica recessiva. Nella maggior parte dei casi esordiscono nell'infanzia e presentano un decorso severo e spesso letale.

Ad oggi sono stati identificati diversi geni nucleari le cui alterazioni sono responsabili dello sviluppo delle MDS. Questi comprendono sia geni che codificano per proteine coinvolte nei processi di replicazione e riparazione del DNA mitocondriale (mtDNA), sia geni implicati nel mantenimento di un pool adeguato e bilanciato di desossiribonucleosidi trifosfato (dNTP).

Nel primo gruppo rientrano geni quali *TWINK*, che codifica per l'elicasi mitocondriale Twinkle, e *POLG*, che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi γ , il principale enzima responsabile della replicazione e della riparazione del mtDNA. Mutazioni a carico di questi geni possono compromettere l'efficienza dei processi di sintesi e mantenimento del genoma mitocondriale, impedendo di compensare adeguatamente il fisiologico turnover e la segregazione mitotica del mtDNA e determinando, di conseguenza, una marcata riduzione del numero di copie di mtDNA.

Un secondo gruppo di MDS è invece associato ad alterazioni del pool mitocondriale di dNTP, generalmente conseguenti a difetti nei geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi. Tra questi figurano le deossinucleoside chinasi mitocondriali timidina chinasi 2 (TK2) e deossiguanosina chinasi (dGK), nonché enzimi citosolici quali la timidina fosforilasi (TP) e la subunità p53-inducibile della ribonucleotide reduttasi (RRM2B). Mutazioni nei geni che codificano per queste proteine possono compromettere profondamente l'omeostasi dei dNTP, determinandone una ridotta disponibilità oppure un accumulo sbilanciato di specifiche specie nucleotidiche, come avviene nei difetti della timidina fosforilasi. In entrambi i casi, lo squilibrio delle concentrazioni dei nucleotidi può alterare la cinetica e la fedeltà degli enzimi coinvolti nel processamento del DNA, in particolare della DNA polimerasi γ , compromettendo la corretta replicazione e il mantenimento del genoma mitocondriale.

Le MDS vennero inizialmente individuate come causa solamente di miopatie ed epatopatie, ma attualmente la loro caratterizzazione clinica ha

portato all'individuazione di tre spettri fenotipici principali: la forma miopatica, l'encefalomiopatica e l'epatocerebrale. I sintomi clinici presentano però un'elevata variabilità e sono in costante fase di definizione. È frequente, inoltre, un'evoluzione sistemica di queste patologie, dove i difetti inizialmente limitati a un singolo tessuto tendono a diffondersi gradualmente ad altri distretti dell'organismo.

A differenza delle altre patologie della catena respiratoria, le MDS presentano la peculiarità di dare manifestazione organo-specifica. Questa caratteristica è dovuta probabilmente a una questione quantitativa: i tessuti maggiormente colpiti esprimono concentrazioni fisiologicamente inferiori delle proteine coinvolte, risultando di conseguenza più vulnerabili al difetto genetico. L'esordio della patologia è inoltre esclusivamente postnatale e ciò suggerisce che, malgrado l'intensa proliferazione cellulare, l'embrione è tutelato da meccanismi protettivi, quali il metabolismo glicolitico, vie metaboliche alternative, l'apporto materno di dNTP o una maggiore espressione proteica [1].

Come nel caso di molte altre malattie mitocondriali, le opzioni terapeutiche per le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale sono attualmente piuttosto limitate. Sono stati utilizzati trattamenti palliativi/di supporto con vitamine, cofattori e substrati della respirazione cellulare (come ubiquinone e carnitina), ma con scarsa efficacia. In alcuni casi si utilizzano interventi sistemici come il trapianto di fegato o il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. Per alcuni geni specifici sono state impiegate tecniche di rimozione dei metaboliti tossici attraverso dialisi o terapia enzimatica sostitutiva (ad esempio per mutazioni del gene *TYMP* codificante per la proteina TP), somministrazione diretta di deossiribonucleosidi per ripristinare l'equilibrio del pool nucleotidico cellulare (come per mutazioni del gene *TK2*) e la terapia genica con impiego di vettori virali quali lentivirus e virus adeno-associati [2].

1.2. La ribonucleotide reduttasi e la subunità RRM2B

I dNTP sono i precursori del DNA e vengono quindi utilizzati sia durante la replicazione che durante la riparazione del genoma. Il corretto mantenimento dei pool di dNTP è un requisito fondamentale per la stabilità sia del genoma nucleare che di quello mitocondriale. È noto infatti che alterazioni quantitative o sbilanciamenti nei pool di dNTP portano a un incremento del tasso di mutazione. Nella cellula i dNTP vengono prodotti da due vie metaboliche distinte: la via di recupero (detta anche *salvage pathway*) e la via di sintesi *de novo*. La ribonucleotide reduttasi (RNR) è l'enzima chiave della *via de novo*, catalizzando la riduzione dei ribonucleosidi difosfato nei corrispondenti desossiribonucleotidi.

Strutturalmente, la RNR è un eterotetramero costituito da due omodimeri: la subunità maggiore R1 (detta anche RRM1) e la subunità minore R2 (detta anche RRM2). La subunità R1 contiene i siti catalitici e allosterici e un sistema redox a ponti disolfuro coinvolto nella riduzione dei substrati. La subunità R2, invece, possiede un centro diferrico, due residui tirosinici in grado di generare radicali liberi essenziali per la catalisi e un canale idrofobico che permette il trasporto dell'ossigeno molecolare fino al centro metallico. La presenza di queste subunità è regolata sia a livello trascrizionale che post-traduzionale. All'ingresso in fase S, l'espressione di R1 e R2 viene indotta per soddisfare la richiesta di dNTP necessari per sintetizzare nuove molecole di DNA. Al termine della replicazione del DNA, la trascrizione di R1 e R2 viene arrestata e la subunità R2 viene rapidamente degradata. Tale degradazione avviene tramite la via dell'ubiquitina-proteasoma, grazie alla presenza di segnali di riconoscimento nella sua regione N-terminale. Ne consegue che, nelle cellule post-mitotiche, l'attività di R2 viene completamente persa. Per tale motivo, si riteneva che la sintesi di dNTP, al di fuori della fase S del ciclo cellulare, avvenisse principalmente attraverso la *via di salvage* [3-4].

Nel 2000 è stata scoperta una subunità alternativa della RNR, chiamata RRM2B, che a differenza di R2, è priva di segnali di degradazione associati al ciclo cellulare e risulta quindi sempre presente durante l'intero ciclo cellulare [5]. Inizialmente, questa subunità venne chiamata p53R2, in quanto il suo gene è inducibile dal fattore oncosoppressore p53 in risposta al danno al DNA. L'induzione da parte di p53 aveva inizialmente suggerito che la funzione principale di RRM2B fosse quella di fornire dNTP per la riparazione del DNA nelle cellule proliferanti. A sostegno di tale ipotesi era stata ipotizzata la sua traslocazione all'interno del nucleo per una sintesi di dNTP localizzata in prossimità del danno. Tale ipotesi è stata però messa in discussione perché non è mai stata dimostrata la traslocazione nucleare di R1 [3].

Studi successivi hanno dimostrato come RRM2B sia fondamentale nei contesti cellulari dove la richiesta di dNTP è bassa ma costante, come nelle cellule quiescenti o post-mitotiche. In queste condizioni, RRM2B fornisce una fonte stabile di dNTP per la riparazione del DNA nucleare e per la sintesi dell'mtDNA. L'importanza di RRM2B per la sintesi e il mantenimento dell'mtDNA è sostenuta dal fatto che le mutazioni in RRM2B sono state riconosciute come la causa di una sindrome da deplezione mitocondriale che può causare encefalomiopatie gravi che si manifestano nelle prime settimane di vita o fenotipi più lievi come oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) [1].

Per studiare il ruolo di RRM2B nella riparazione del DNA nucleare e nel mantenimento dell'mtDNA, sono stati generati modelli murini *knock-out* per

Rrm2b (*Rrm2b*^{-/-}). Questi animali sviluppano, dopo lo svezzamento, un progressivo ritardo della crescita e una grave insufficienza renale che determina mortalità precoce. A livello molecolare, l'assenza di p53R2 determina una riduzione dei pool di dNTP, compromettendo in particolare la sintesi e il mantenimento del DNA mitocondriale. La conseguente disfunzione mitocondriale, associata a deficit energetico e aumento dello stress ossidativo, risulta particolarmente dannosa negli organi ad elevato fabbisogno energetico, come il rene [6].

1.3. Editing genetico mediante CRISPR/Cas9

Il sistema CRISPR/Cas9 è una tecnologia di *genome editing* che consente di modificare il DNA in modo mirato e permanente, introducendo mutazioni quali inserzioni, delezioni o sostituzioni, al fine di studiare la funzione di specifici geni o correggere alterazioni genetiche. Questo sistema deriva da un meccanismo di difesa adattativa utilizzato dai batteri contro i batteriofagi. Nel genoma batterico sono infatti presenti loci CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), costituiti da sequenze ripetute intervallate da *spacer*, brevi sequenze derivate da precedenti infezioni virali che costituiscono una sorta di memoria immunologica. La trascrizione dei loci CRISPR porta alla formazione di crRNA, ciascuno contenente una sequenza complementare a uno specifico DNA bersaglio e quindi in grado di guidarne il riconoscimento.

Nel sistema CRISPR/Cas9, il crRNA si associa al *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA), formando un complesso che interagisce con la nucleasi Cas9. Nelle applicazioni di *genome editing*, crRNA e tracrRNA vengono generalmente fusi in un'unica molecola, definita *single-guide RNA* (sgRNA). Il complesso Cas9-sgRNA riconosce la sequenza bersaglio in presenza di uno specifico motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). L'appaiamento tra sgRNA e DNA determina l'attivazione di Cas9, che induce una rottura a doppio filamento (*double-strand break*, DSB) in una posizione definita.

Il DSB viene successivamente riparato dai meccanismi cellulari principalmente attraverso due vie: il *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) e l'*Homology-Directed Repair* (HDR). Il NHEJ ricongiunge direttamente le estremità del DNA senza utilizzare una sequenza stampo ed è considerato un meccanismo *error-prone*, poiché può introdurre inserzioni o delezioni (*indel*) in grado di determinare *frameshift* o codoni di stop prematuri, portando potenzialmente all'inattivazione del gene. Al contrario, l'HDR utilizza una sequenza di DNA omologa come stampo per riparare la rottura, consentendo l'introduzione, la correzione o la sostituzione mirata di specifiche sequenze di DNA [7].

2. MATERIALI E METODI

2.1. Allevamento di *Danio rerio*

Gli adulti e gli embrioni di zebrafish (*Danio rerio*) sono allevati presso la Zebrafish Facility del Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, secondo le procedure standard descritte nello *Zebrafish Book* (Westerfield, 4^a edizione).

I pesci sono tenuti in vasche di allevamento di diverse dimensioni, da 1 a 3.5 L di volume a seconda dello stadio di sviluppo. Queste vasche sono dotate di filtri meccanici e di un sistema di ricircolo dell'acqua che garantiscono il mantenimento delle condizioni necessarie al corretto sviluppo degli animali. L'allevamento avviene in una particolare acqua, la *fish water*, preparata sciogliendo in 150 L di acqua, priva di cloro e con una concentrazione di nitrati inferiore a 30 mg/L, 23,5 g di CaSO₄, 3 g di NaHCO₃ e 15 g di sale sintetico Instant Ocean. Il pH dell'acqua è mantenuto tra 6,8 e 7,5, mentre la temperatura è compresa tra 26 e 28,5 °C.

Gli animali sono allevati secondo un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio, per simulare le condizioni naturali. Tale rapporto e alternanza delle fasi di luce e di buio sono fondamentali per la sincronizzazione dei cicli circadiani, per la regolazione del rilascio di ormoni e la riproduzione. L'alimentazione viene somministrata tre volte al giorno: mangime secco in scaglie (AZ300) nelle prime ore del mattino e naupli di *Artemia salina* in due successive somministrazioni, una in mattinata e una nel pomeriggio. Oltre a rappresentare una fonte di nutrimento, i naupli di *Artemia salina* costituiscono una forma di arricchimento ambientale, in quanto stimolano il naturale comportamento predatorio della specie.

Per ottenere individui omozigoti per la mutazione nel gene *rrm2b*, sono stati allestiti accoppiamenti controllati tra individui eterozigoti portatori della stessa mutazione. Il pomeriggio precedente all'accoppiamento, maschi e femmine sono stati trasferiti in vasche da riproduzione da 1 L e mantenuti separati mediante un divisorio verticale rimovibile. La mattina seguente il divisorio è stato rimosso per consentire l'accoppiamento. Poiché fenomeni di cannibalismo delle uova sono comuni nei pesci tenuti in cattività, le vasche sono dotate anche di una grata, che permette alle uova deposte di depositarsi sul fondo, evitando che vengano consumate dagli adulti. Al termine dell'accoppiamento, le uova sono state raccolte facendo passare l'acqua della vasca attraverso un colino a rete e successivamente trasferite in capsule Petri mediante lavaggio con *fish water*. Gli embrioni sono stati mantenuti in *fish water* addizionata con blu di metilene, utilizzato per limitare la proliferazione fungina, e incubati a 28,5 °C. A 4 giorni dalla fecondazione (*days post fertilization*, dpf), le larve sono state lisate per l'estrazione del DNA genomico, successivamente utilizzato per l'identificazione degli individui omozigoti e per il sequenziamento.

2.2. Estrazione rapida del DNA genomico mediante lisi alcalina

Il DNA genomico utilizzato per determinare la presenza di mutazioni nel gene *rrm2b* è stato estratto da frammenti di pinna caudale di pesci adulti e da larve intere.

Nel caso dei pesci adulti, il DNA è stato isolato da individui ottenuti da incroci tra pesci portatori di mutazioni a mosaico nel gene *rrm2b* e pesci *wild type*, al fine di identificare gli individui eterozigoti da utilizzare per i successivi incroci. Le larve analizzate provenivano invece da incroci tra individui eterozigoti per una mutazione nel gene *rrm2b* e sono state sottoposte a genotipizzazione per identificare gli individui omozigoti mutanti. In entrambi i casi, il DNA genomico è stato estratto mediante lisi alcalina con idrossido di sodio (NaOH), una metodica rapida sviluppata per ottenere DNA idoneo all'amplificazione mediante PCR in zebrafish.

Il prelievo di frammenti dalla pinna caudale è stato effettuato mediante il taglio di una piccola porzione della pinna (3-4 mm) da individui precedentemente anestetizzati con tricaina metansolfonato (MS-222, Sigma Aldrich) alla concentrazione di 0,16 mg/mL per 5 minuti a temperatura ambiente. L'anestesia è stata utilizzata per ridurre la motilità degli animali e facilitarne la manipolazione durante la procedura sperimentale. Nel caso di larve (4 dpf) intere, queste sono state sottoposte allo stesso trattamento anestetico e successivamente trasferite direttamente nella soluzione di NaOH per la lisi del campione.

I frammenti di pinna caudale e le larve sono stati trasferiti singolarmente in provette da 1,5 mL opportunamente numerate e contenenti NaOH 50 mM. Il volume di NaOH è stato adattato alla tipologia di campione per garantire una copertura completa del materiale biologico: sono stati utilizzati 50 µL per i frammenti di pinna caudale e 30 µL per le larve intere.

I campioni sono stati quindi incubati a 95 °C per 15-20 minuti in un termoblocco, successivamente omogeneizzati mediante vortex per alcuni secondi e centrifugati brevemente. Dopo il raffreddamento è stata aggiunta una soluzione di Tris-HCl 1 M a pH 8 in un volume pari a un decimo del volume iniziale di NaOH, al fine di neutralizzare la soluzione alcalina e ottenere un lisato idoneo alle successive analisi di PCR.

2.3. Amplificazione del DNA mediante PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione selettiva di specifiche sequenze di DNA. Il processo si basa su cicli successivi di denaturazione del DNA, appaiamento dei primer (*annealing*) ed estensione. Durante quest'ultima fase, una DNA polimerasi termostabile sintetizza nuovi filamenti a partire da primer

complementari alle regioni che delimitano la sequenza bersaglio. La ripetizione dei cicli determina un progressivo aumento della quantità della regione di interesse. Dopo l'estrazione del DNA genomico, una regione comprendente l'esone 3 del gene *rrm2b* è stata amplificata mediante PCR per discriminare i campioni omozigoti *wild type* dagli eterozigoti sulla base della diversa dimensione dei prodotti di amplificazione. I primer utilizzati per l'amplificazione sono riportati nella **Tabella 1**.

Primer	Sequenza (5'-3')
<i>rrm2b ex3 forward</i>	TGCTATTCAAACCTGGCTTGTG
<i>rrm2b ex3 reverse:</i>	AGATGCACTTACCAGGTTCTCA

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione dell'esone 3 di *rrm2b* mediante PCR.

Il frammento amplificato ha una lunghezza di 261 paia di basi (pb). Nella sequenza riportata di seguito, le regioni di appaiamento dei primer *forward* e *reverse* sono evidenziate rispettivamente in verde e rosa, mentre le lettere minuscole e maiuscole indicano rispettivamente le regioni introniche ed esoniche.

tgctattcaaactggcttgttcatatcacagtatttatcacagaaataaatatcacaatatcaaattttcc
aatttcattgcagtcctactgctgagtcacaaactcaaaacactgtatgggttttcttagGTGGATTTAT
CAAAGGATTTAACTCACTGGGACGGCCTGAAGTCTGAAGAGAAACAC
TTCATATCACATGTATTGGCTTTCTTTGCGGCAAGTGATGGGATAGTC
AATGAGAACCTGgtaagtgcatt

Per ciascun campione è stata allestita una reazione di PCR in un volume finale di 10 µL, costituita da 2 µL di Hot FIREPol® Blend Master Mix 5X (Solis BioDyne), contenente FIREPol DNA polimerasi, MgCl₂ (12,5 mM), dNTP e buffer di reazione, 0,2 µL di primer forward 10 µM, 0,2 µL di primer reverse 10 µM, 2 µL di DNA genomico e acqua DNase/RNase free (Invitrogen) fino al raggiungimento del volume finale.

L'amplificazione è stata eseguita mediante termociclature utilizzando il programma riportato nella **Tabella 2**.

FASI	TEMPERATURA	DURATA	CICLI
Attivazione polimerasi	95°C	15 min	X1
Denaturazione	95°C	20 s	
Annealing	59°C	20 s	X30
Estensione	72°C	15 s	
Estensione finale	72°C	10 min	X1

Tabella 2. Condizioni della reazione di PCR utilizzate per l'amplificazione dell'esone 3 del gene *rrm2b*.

2.4. Elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Questa tecnica consente di separare i frammenti di DNA principalmente in base alle loro dimensioni, sfruttando la migrazione delle molecole, cariche negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, attraverso una matrice di agarosio sottoposta a un campo elettrico. I frammenti di dimensioni minori migrano più rapidamente rispetto a quelli di dimensioni maggiori, consentendo la separazione di prodotti di amplificazione che differiscono anche di poche paia di basi. Il gel è stato preparato a una concentrazione del 3,5% p/V di agarosio in buffer TBE (Tris base 89 mM, acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). Tale concentrazione è stata scelta per garantire un'elevata risoluzione di frammenti di DNA con dimensioni molto simili. Dopo il completo scioglimento dell'agarosio, alla soluzione sono stati aggiunti 8 µL di Midori Green Xtra (NIPPON Genetics Europe), un intercalante fluorescente utilizzato per la visualizzazione del DNA. La soluzione è stata quindi versata in un'apposita vaschetta per elettroforesi, precedentemente sigillata alle estremità e dotata di pettini per la formazione dei pozzetti destinati al caricamento dei campioni. Dopo la completa solidificazione del gel, i pettini sono stati rimossi e il gel è stato trasferito nella camera elettroforetica contenente buffer TBE come tampone di corsa.

Nei pozzetti sono stati caricati i prodotti di amplificazione insieme a: un controllo positivo, costituito dal campione *wild type*, utilizzato come riferimento per il confronto con gli altri campioni, un controllo negativo, nel quale il template è stato sostituito con acqua, e a un marcatore di peso molecolare (FastGene 100 bp DNA Marker, NIPPON Genetics Europe).

La corsa elettroforetica è stata effettuata applicando una differenza di potenziale di 85 V per 2 h. Al termine della corsa, i gel sono stati visualizzati mediante esposizione a luce LED blu utilizzando il sistema di acquisizione di immagini iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific).

2.5. Sequenziamento Sanger

Per confermare la mutazione presente nell'esone 3 del gene *rrm2b*, un campione *wild type* e un campione omozigote per la mutazione sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger.

Prima del sequenziamento, la regione di interesse è stata amplificata mediante PCR utilizzando le stesse condizioni di reazione e lo stesso programma di amplificazione descritti precedentemente, impiegando i primer riportati in **Tabella 3**.

Primer	Sequenza (5'-3')
<i>rrm2b forward</i>	TCCAATTTTCATGCAGTCCTAC
<i>rrm2b reverse</i>	CCTCCTGACTGAACCTCTGG

Tabella 3. Sequenze dei primer forward e reverse utilizzati per l'amplificazione della regione comprendente l'esone 3 del gene *rrm2b* destinata al sequenziamento Sanger.

Il frammento amplificato ha una lunghezza di 304 paia di basi (pb). Nella sequenza riportata di seguito, le regioni di appaiamento dei primer forward e reverse sono evidenziate rispettivamente in verde e rosa, mentre le lettere minuscole e maiuscole indicano rispettivamente le regioni introniche ed esoniche.

tccaatttcagtcagtcctactgctgagtc aaactcaaaacactgtatgggttttcttagGTGGATTT
ATCAAAGGATTTA ACTCACTGGGACGGCCTGAAGTCTGAAGAGAAAC
ACTTCATATCACATGTATTGGCTTTCTTTGCGGCAAGTGATGGGATAGT
CAATGAGAACCTGgtaagtgcattctcattctaaccttcattcatcaatgtgagacttcaggaattt
gattgtttaccaaatcaatgttattcggtaaacattcttctctgacagGTCCAGAGGTTTCAGT
CAGGAGG

L'avvenuta amplificazione dei campioni è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, controllando la presenza della banda corrispondente al prodotto di PCR atteso.

Successivamente, i prodotti di PCR sono stati purificati mediante trattamento con ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific), allo scopo di rimuovere i primer e i dNTP residui che avrebbero potuto interferire con la successiva reazione di sequenziamento. Per ciascun campione, 5 µL di prodotto di PCR sono stati miscelati con 2 µL di ExoSAP-IT™. Il trattamento è stato effettuato incubando i campioni per 15 min a 37°C, seguiti da 15 min a 80°C. L'incubazione a 37 °C consente l'attività degli enzimi responsabili della degradazione dei primer e dei nucleotidi non incorporati, mentre il successivo passaggio a 80 °C ne determina l'inattivazione.

Per il sequenziamento sono stati preparati campioni contenenti 7 µL di prodotto di PCR purificato, 2 µL di primer reverse e 8 µL di acqua DNase/RNase free. I campioni sono stati quindi inviati a Eurofins per il sequenziamento mediante metodo Sanger.

Il sequenziamento Sanger è una tecnica basata sulla sintesi enzimatica di un nuovo filamento di DNA a partire da uno stampo e da un primer specifico. Oltre ai normali deossinucleotidi (dNTP), la reazione contiene dideossinucleotidi (ddNTP) marcati, la cui incorporazione determina l'interruzione dell'allungamento del filamento, poiché privi del gruppo ossidrilico in posizione 3' necessario alla formazione del successivo legame fosfodiesterico. Si genera così una popolazione di frammenti di diversa

lunghezza, terminanti in corrispondenza delle diverse basi della sequenza. La separazione dei frammenti mediante elettroforesi capillare e la rilevazione dei marcatori fluorescenti permettono di ricostruire la sequenza nucleotidica del frammento analizzato.

Le sequenze ottenute sono state utilizzate per confrontare il campione *wild type* con quello omozigote e verificare la presenza della mutazione nell'esone 3 di *rrm2b*.

3. RISULTATI

Lo zebrafish rappresenta un buon modello per lo studio della funzione di *rrm2b*, gene ortologo di *RRM2B* umano, grazie all'elevata conservazione delle proteine nelle due specie. Queste condividono infatti il 72,8% di identità amminoacidica e conservano i domini funzionali e i residui essenziali per l'attività enzimatica. Un ulteriore vantaggio dell'utilizzo di zebrafish come modello sperimentale è rappresentato dalla possibilità di introdurre modificazioni mirate nel genoma mediante tecniche di editing genetico [8].

Lo **scopo di questa tesi** è stato quello di caratterizzare il tipo di mutazione per *rrm2b* del mutante *founder 27*, precedentemente ottenuto tramite tecnologia CRISPR/Cas9.

In breve, la generazione F0 è stata ottenuta microiniettando l'endonucleasi Cas9 e un sgRNA specifico per una regione target localizzata nell'esone 3 di *rrm2b* in zigoti *wild type* (WT). La riparazione delle rotture del DNA indotte da Cas9 avviene principalmente mediante il meccanismo di *non-homologous end joining* (NHEJ), che può determinare l'introduzione di inserzioni o delezioni differenti in corrispondenza del sito bersaglio. Di conseguenza, gli individui F0 così ottenuti possono risultare geneticamente a mosaico, presentando mutazioni diverse del gene *rrm2b* in differenti popolazioni cellulari. Per verificare la presenza di mutazioni trasmissibili attraverso la linea germinale, gli individui F0 sono stati poi incrociati con degli individui WT e la progenie F1 sottoposta a genotipizzazione. Gli individui F0 in grado di trasmettere una mutazione alla progenie sono stati identificati come *founder* e a ciascuna linea derivata è stato assegnato un numero identificativo.

A questo punto è iniziato il mio lavoro di tesi che ha previsto la genotipizzazione degli individui derivanti dalle generazioni F1 e F2 appartenenti al mutante *founder 27*, precedentemente identificato nella generazione F0. Gli individui F1 portatori della variante in eterozigosi sono stati quindi incrociati tra loro allo scopo di ottenere e identificare, nella generazione F2, individui omozigoti per l'allele mutato. Il DNA genomico estratto da tali individui è stato successivamente utilizzato per il sequenziamento e la caratterizzazione della mutazione.

3.1. Genotipizzazione della generazione F1 e identificazione degli eterozigoti

La generazione F1 è stata ottenuta incrociando il *founder 27* con individui WT. La progenie è stata sottoposta a genotipizzazione per identificare gli individui che avevano ereditato la variante di *rrm2b* in eterozigosi. Il DNA

genomico è stato estratto mediante lisi alcalina e la regione comprendente il sito bersaglio di CRISPR/Cas9, localizzato nell'esone 3 di *rrm2b*, è stata amplificata mediante PCR. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 20% (**Figura 1**).

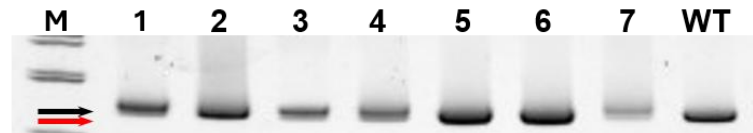


Figura 1. Genotipizzazione degli individui F1 mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. I prodotti ottenuti mediante amplificazione della regione bersaglio localizzata nell'esone 3 di *rrm2b* sono stati separati su gel di poliacrilammide al 20%. Gli individui F1 analizzati sono identificati mediante numeri. Le frecce nera e rossa indicano rispettivamente la posizione dell'amplicone WT e dell'amplicone di dimensioni inferiori, corrispondente all'allele contenente la mutazione. M: marcatore di peso molecolare, WT: controllo *wild type*.

Come mostrato in **Figura 1**, i campioni 3, 4 e 7 presentavano due bande, corrispondenti all'allele WT e all'allele mutato, e sono stati quindi classificati come eterozigoti. I campioni 2, 5 e 6 mostravano invece una sola banda, associata all'allele WT, risultando omozigoti WT. Per il campione 1, il profilo elettroforetico non ha consentito di assegnare il genotipo in modo conclusivo.

Oltre al diverso numero di bande osservato nei campioni, sono emerse differenze anche nella loro intensità e mobilità elettroforetica. Nei campioni eterozigoti, la banda corrispondente all'allele mutato risultava meno intensa rispetto a quella dell'allele WT, probabilmente a causa di differenze nell'efficienza di amplificazione o di colorazione dei prodotti di PCR di diversa lunghezza. Inoltre, la maggiore mobilità elettroforetica dell'amplicone mutato indicava una dimensione inferiore rispetto a quella dell'amplicone WT, compatibile con la presenza di una delezione.

3.2. Genotipizzazione della generazione F2 e identificazione degli omozigoti

Per caratterizzare con precisione la delezione di *rrm2b* trasmessa dal *founder* 27, è stato necessario identificare individui mutanti omozigoti da sottoporre a sequenziamento genico. A tale scopo, gli esemplari eterozigoti della generazione F1 sono stati incrociati tra loro, ottenendo la progenie F2. Il DNA genomico è stato estratto analogamente a quello degli individui della generazione F2 e la corsa elettroforetica è avvenuta in gel di agarosio al 3.5%. Poiché gli ampliconi associati all'allele WT e a quello mutato differivano soltanto per poche paia di basi (pb), è stato necessario

ottimizzare il protocollo elettroforetico per migliorarne la separazione. Inizialmente è stata prolungata la migrazione in buffer TAE; in seguito, quest'ultimo è stato sostituito con TBE, caratterizzato da una maggiore capacità tamponante e quindi in grado di garantire condizioni di migrazione più stabili nel tempo. La migliore risoluzione è stata ottenuta utilizzando buffer TBE per 2 ore e 15 minuti a 85 V.

I risultati della genotipizzazione sono riportati in **Figura 2**. I campioni 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostravano due bande, corrispondenti agli ampliconi degli alleli WT e mutato, risultando pertanto eterozigoti. Il campione 2 presentava invece un unico prodotto con mobilità analoga a quella del controllo WT. Nel campione 9 è stata osservata una singola banda con maggiore mobilità elettroforetica rispetto al WT, sovrapponibile a quella dell'amplicone dell'allele mutato; tale individuo è stato quindi identificato come omozigote per l'allele di *rrm2b* contenente la delezione e selezionato per la successiva caratterizzazione mediante sequenziamento.

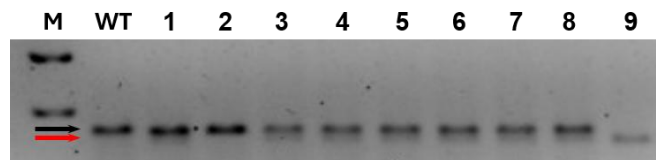


Figura 2. Genotipizzazione degli individui F1 mediante elettroforesi su gel di agarosio. I prodotti ottenuti mediante amplificazione della regione bersaglio localizzata nell'esone 3 di *rrm2b* sono stati separati su gel di agarosio al 3,5%. Gli individui F2 analizzati sono identificati mediante numeri crescenti. Le frecce nera e rossa indicano rispettivamente la posizione dell'amplicone WT e dell'amplicone di dimensioni inferiori, corrispondente all'allele contenente la mutazione. Il campione 9, che presentava solo l'amplicone mutato, è stato identificato come omozigote per la delezione. M: marcatore di peso molecolare, WT: controllo *wild type*.

3.3. Caratterizzazione molecolare e analisi bioinformatica della variante di *rrm2b*

3.3.1. Identificazione della delezione mediante sequenziamento Sanger

Al fine di caratterizzare a livello molecolare la variante rilevata e di definirne con precisione la posizione e l'estensione, l'amplicone ottenuto dal campione 9 è stato sottoposto a sequenziamento Sanger, parallelamente a quello di un campione *wild type* utilizzato come controllo.

Gli elettroferogrammi relativi alla regione dell'esone 3 contenente il sito bersaglio del sgRNA sono stati analizzati e le sequenze corrispondenti sono state allineate mediante il software DNASTAR Lasergene. Poiché la reazione di sequenziamento è stata condotta utilizzando il primer *reverse*, le letture ottenute risultavano reverse-complementari rispetto al filamento codificante di *rrm2b*. Come mostrato in **Figura 3**, sia il controllo *wild type*

(WT) sia il campione 9 omozigote mutante (*rrm2b*^{-/-}) presentavano picchi singoli e ben risolti. L'allineamento ha evidenziato nel campione mutato una delezione di 10 pb rispetto al WT. La medesima delezione è stata identificata anche mediante ICE Analysis (EditCo), confermando la caratterizzazione molecolare della variante.

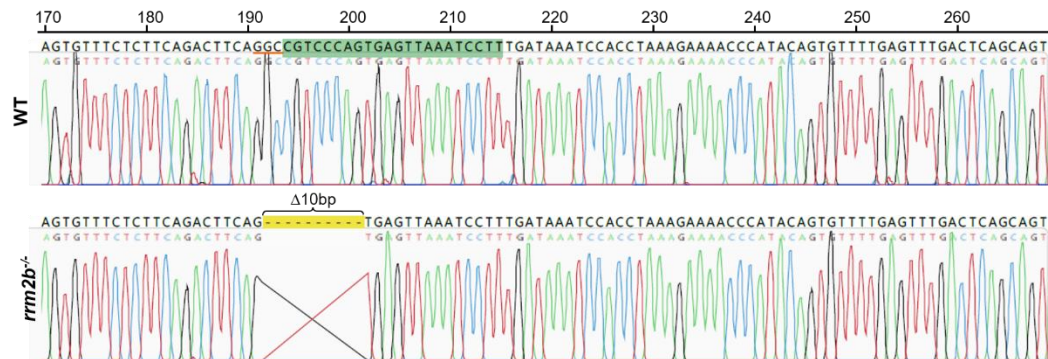


Figura 3. Allineamento degli elettroferogrammi di sequenziamento Sanger del *wild type* e dell'omozigote mutante. Gli elettroferogrammi relativi al *wild type* (WT) e al campione *rrm2b*^{-/-} sono stati analizzati e allineati mediante il software DNASTAR Lasergene. Nel WT la sequenza bersaglio dello sgRNA è evidenziata in verde, mentre la sequenza PAM è sottolineata in rosso. Nel campione mutante, la regione evidenziata in giallo e rappresentata mediante trattini corrisponde alla delezione di 10 pb. Le posizioni nucleotidiche indicate, comprese tra 170 e 269 pb, si riferiscono alla numerazione della lettura di sequenziamento.

3.3.2. Conseguenze della delezione sul frame di lettura

Per valutare le conseguenze della delezione sulla sequenza codificante di *rrm2b*, le sequenze del WT e del campione *rrm2b*^{-/-} sono state orientate in direzione 5'→3' rispetto al filamento codificante e sottoposte a traduzione *in silico*. La delezione di 10 pb, non essendo costituita da un numero di nucleotidi multiplo di tre, ha determinato uno slittamento del frame di lettura (*frameshift*) a partire dal sito della variante (**Figura 4A-B**). Nell'allele mutato, l'alterazione della cornice ha generato un codone di stop prematuro TGA in corrispondenza del decimo codone dell'esone 3, equivalente al codone 76 della sequenza codificante complessiva. La traduzione *in silico* dell'allele mutato si è pertanto interrotta dopo il residuo amminoacidico in posizione 75 (**Figura 4B**).

A)		WT	
199	GTGGATTTATCAAAGGATTAACTCACTGGGACGGCCTGAAGTCTGAAGAGAAACAC	256	
67	-V--D--L--S--K--D--L--T--H--W--D--G--L--K--S--E--E--K--H-	86	
257	TTCATATCACATGTATTGGCTTTCTTTGCGGCAAGTGATGGGATAGTCAATGAGAACCTG	315	
87	-F--I--S--H--V--L--A--F--F--A--A--S--D--G--I--V--N--E--N--L-	105	
B)		<i>rrm2b</i>^{-/-}	
199	GTGGATTTATCAAAGGATTAACTCAC TGA AGTCTGAAGAGAAACACTTCATATCAC	256	
67	-V--D--L--S--K--D--L--T--H--Stop	75	
257	ATGTATTGGCTTTCTTTGCGGCAAGTGATGGGATAGTCAATGAGAACCTG	305	

Figura 4. Confronto del frame di lettura dell'esone 3 di *rrm2b* nel *wild type* e nel campione omozigote mutante. Sono riportate la sequenza nucleotidica e la traduzione *in silico* corrispondente nel controllo *wild type* (A) e nel campione *rrm2b*^{-/-} (B). Le sequenze nucleotidiche sono rappresentate in nero e quelle amminoacidiche in blu; il codone di stop prematuro TGA identificato nel campione mutante è evidenziato in rosso. I numeri indicano le posizioni dei nucleotidi e dei residui amminoacidici nelle rispettive sequenze di riferimento.

3.3.3. Predizione dell'impatto funzionale della mutazione

La delezione identificata nell'esone 3 di *rrm2b* è compatibile con un marcato effetto sulla funzionalità del gene. La conseguenza biologica della variante dipenderebbe, in primo luogo, dal destino del trascritto mutato. Il codone di stop prematuro si trova a più di 50–55 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione esone-esone e rispetta quindi il principale criterio posizionale associato all'attivazione del *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Questo meccanismo di sorveglianza cellulare promuove la degradazione degli mRNA contenenti codoni di stop prematuri, limitando la produzione di proteine tronche. La posizione del codone di stop suggerisce pertanto che il trascritto mutato di *rrm2b* possa essere degradato mediante NMD [9].

Qualora la degradazione fosse incompleta, la quota residua di trascritto potrebbe essere tradotta in un polipeptide di 75 amminoacidi. Per valutare le conseguenze dell'eventuale troncamento, la sequenza amminoacidica predetta è stata analizzata mediante UniProt, Ensembl e NCBI. L'analisi ha indicato la perdita della maggior parte del dominio conservato di Rrm2b, compresi i residui coinvolti nella coordinazione del ferro, il sito del radicale tirosinico e le regioni necessarie al trasferimento del radicale e all'interazione con la subunità Rrm1. L'assenza di questi elementi impedirebbe la formazione del centro ferro–radicale tirosinico e il

trasferimento del radicale alla subunità catalitica Rrm1, compromettendo la funzione della ribonucleotide reduttasi [4].

Per esaminare l'impatto del troncamento sull'organizzazione tridimensionale della proteina, sono stati generati mediante AlphaFold i modelli predittivi delle sequenze WT e mutata. Il modello di Rrm2b WT mostrava una conformazione globulare compatta, costituita prevalentemente da α -eliche organizzate in un fascio centrale, coerente con il ripiegamento di tipo *ferritin-like* caratteristico delle subunità Rrm2b e Rrm2 della ribonucleotide reduttasi (**Figura 5A**). Il modello della sequenza mutata mostrava invece una conformazione estesa, priva di un nucleo globulare compatto e costituita soltanto da pochi e brevi tratti ad α -elica; una parte rilevante del modello presentava inoltre una bassa confidenza di predizione (**Figura 5B**). Il prodotto tronco non sembrerebbe quindi in grado di mantenere l'architettura caratteristica di Rrm2b. La predizione strutturale non consente tuttavia di stabilire se tale polipeptide venga effettivamente prodotto né quale struttura assuma *in vivo*.

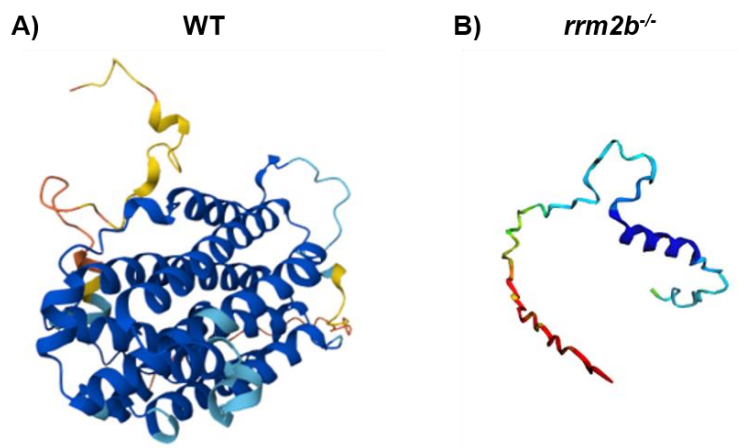


Figure 5. Predizione della struttura tridimensionale della proteina Rrm2b *wild type* e del prodotto mutante tronco mediante AlphaFold. Struttura tridimensionale della proteina Rrm2b WT (349 amminoacidi) (**A**) e mutata (peptide tronco con 75 amminoacidi) (**B**). L'affidabilità della predizione è indicata dalla colorazione: il blu scuro indica una molto alta confidenza e stabilità strutturale; l'azzurro corrisponde ad alta confidenza e stabilità; il verde indica un livello buono; in giallo sono rappresentate le regioni a bassa confidenza e infine in rosso quella a molto bassa confidenza e stabilità strutturale.

4. CONCLUSIONI

Questo progetto di tesi ha consentito di caratterizzare una mutazione indotta mediante tecnologia CRISPR/Cas9 nell'esone 3 del gene *rrm2b* di *Danio rerio*. In particolare, è stata analizzata la mutazione trasmessa dal *founder* 27 alla progenie, al fine di definirne le caratteristiche molecolari.

La delezione di 10 pb identificata ha determinato uno slittamento del frame di lettura e l'introduzione di un codone di stop prematuro, che predice l'interruzione anticipata della traduzione. Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che la mutazione determina verosimilmente una perdita di funzione di *rrm2b*. Rimane tuttavia da chiarire se tale effetto dipenda dalla degradazione del trascritto mutato, dalla produzione di un polipeptide tronco non funzionale o dal contributo di entrambi i processi.

Per verificare l'eventuale degradazione del trascritto mediante NMD, sarà necessario confrontare i livelli di mRNA di *rrm2b* tra individui *wild type* e omozigoti mutanti mediante RT-qPCR. Una riduzione dell'abbondanza del trascritto nei mutanti sarebbe coerente con l'intervento dell'NMD, ma non permetterebbe di attribuirlo specificamente a questo meccanismo. L'analisi potrebbe pertanto essere ripetuta in seguito all'inibizione della via NMD: un conseguente aumento dei livelli del trascritto mutato fornirebbe un'ulteriore evidenza del coinvolgimento di questo meccanismo.

Qualora una quota del trascritto mutato sfuggisse alla degradazione, sarebbe necessario verificare l'eventuale produzione del polipeptide tronco. Questa analisi potrebbe essere condotta mediante Western blot, utilizzando un anticorpo diretto contro la porzione N-terminale conservata di Rrm2b, in modo da rilevare sia la proteina completa sia un eventuale prodotto di minore peso molecolare. L'indisponibilità di anticorpi validati per Rrm2b di zebrafish costituisce attualmente un limite all'applicazione di questo approccio.

La linea mutante potrà inoltre essere sottoposta a una caratterizzazione fenotipica e funzionale. Poiché le mutazioni di *RRM2B* sono associate a forme di sindrome da deplezione del DNA mitocondriale, la quantificazione del rapporto tra mtDNA e DNA nucleare consentirà di verificare se il modello riproduca una delle principali caratteristiche molecolari della patologia. A questa analisi potranno essere affiancate misure della funzionalità mitocondriale, quali la capacità respiratoria, i livelli di ATP e l'attività dei complessi della catena respiratoria, insieme alla valutazione della sopravvivenza, della crescita e della motilità degli individui mutanti durante lo sviluppo.

L'incrocio della linea mutante con specifiche linee transgeniche reporter permetterà di esaminare gli effetti della mutazione *in vivo*. La linea *Tg(SCAC69-mls:EGFP)* consentirà di visualizzare la morfologia e la distribuzione dei mitocondri nei diversi tessuti. Incroci separati con le linee

Tg(actc1b:GFP) e *Tg(neuroD:GFP)^{ia50}* permetteranno invece di approfondire, rispettivamente, le alterazioni del muscolo scheletrico e delle popolazioni neuronali.

Nel complesso, queste analisi consentiranno di stabilire se la perdita di funzione di *rrm2b* determini deplezione del mtDNA, disfunzione mitocondriale e alterazioni tessuto-specifiche. La linea ottenuta potrà quindi rappresentare un modello utile per approfondire i meccanismi molecolari alla base delle forme di sindrome da deplezione del DNA mitocondriale associate a mutazioni di *RRM2B* e, successivamente, per valutare strategie genetiche o farmacologiche capaci di attenuare o recuperare il fenotipo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Suomalainen e P. Isohanni, "Mitochondrial DNA depletion syndromes - Many genes, common mechanisms," *Neuromuscular Disorders*, vol. 20, pp. 429–437, 2010
- [2] J. Ramón, F. Vila-Julià, D. Molina-Granada, M. Molina-Berenguer, M. J. Melià, E. García-Arumí, J. Torres-Torronteras, Y. Cámara, e R. Martí, "Therapy prospects for mitochondrial DNA maintenance disorders," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 12, Art. no. 6447, Jun. 2021
- [3] G. Pontarin, P. Ferraro, P. Reichard, e V. Bianchi, "Out of S-phase: Shift of subunits for ribonucleotide reduction," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 22, pp. 1-2, Nov. 2012
- [4] P. Nordlund e P. Reichard, "Ribonucleotide reductases" *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, pp. 681–706, 2006
- [5] H. Tanaka *et al.*, "A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage," *Nature*, vol. 404, no. 6773, pp. 42–49, 2000
- [6] T. Kimura, S. Takeda, Y. Sagiya, M. Gotoh, Y. Nakamura, e H. Arakawa, "Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools," *Nat. Genet.*, vol. 34, no. 4, pp. 440–445, Aug. 2003
- [7] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. H. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science*, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, 2012
- [8] S. L. Steele, S. V. Prykhodzhiy, e J. N. Berman, "Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases," *Translational Research*, vol. 163, no. 2, pp. 79–98, Feb. 2014
- [9] T. Strachan and A. P. Read, "Molecular pathology: Connecting phenotypes to genotypes," in *Human Molecular Genetics*, 5th ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, ch. 16, 2019