



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Istituto di Genetica Molecolare – Consiglio Nazionale delle
Ricerche

Ripristino dei livelli proteici di CHK1 mediato da SINEUP
come approccio terapeutico per la SLA

Relatore:

prof.ssa Elena Maria Clotilde Raimondi

Correlatore:

dott.ssa Sofia Francia

Tesi Sperimentale di
Giuseppe Aurnia

Anno Accademico 2025/2026

| | |
|---|----|
| 1. Introduzione | 1 |
| 1.1 Danno al DNA | 1 |
| 1.1.1 Danno al DNA nella neurodegenerazione | 2 |
| 1.2 Differenti tipologie di danno al DNA e relativi meccanismi di riparazione | 3 |
| 1.2.1 Mismatch repair (MMR) | 5 |
| 1.2.2 Base Excision Repair (BER) | 5 |
| 1.2.3 Nucleotide Excision Repair (NER) | 6 |
| 1.2.4 SSB repair (Single Strand Breaks) | 7 |
| 1.3 Focus sulla segnalazione e sui meccanismi di riparazione delle rotture a doppio filamento (DSB)..... | 7 |
| 1.3.1 Panoramica generale della risposta al danno del DNA | 7 |
| 1.3.2 Checkpoint del ciclo cellulare e risposta al danno al DNA | 9 |
| 1.3.3 Meccanismi di riconoscimento e segnalazione delle DSB nel ciclo cellulare | 11 |
| 1.3.4 Vie di riparazione delle DSB: focus su NHEJ | 13 |
| 1.3.5 Vie di riparazione delle DSB: focus su HR | 14 |
| 1.3.6 La separazione di fase liquido-liquido (LLPS)..... | 17 |
| 1.4 Ruolo di CHK1 nella riparazione al danno al DNA..... | 19 |
| 1.4.1 CHK1: custode dell'integrità genomica e della sopravvivenza neuronale | 19 |
| 1.4.2 L'asse ATM/CHK1/ASF1A nella riparazione delle rotture a doppio filamento..... | 20 |
| 1.4.3 Regolazione dell'espressione e della stabilità di CHK1 | 21 |
| 1.4.4 Regolazione di CHK1 tramite splicing alternativo | 21 |
| 1.4.5 CHK1 e sopravvivenza neuronale | 22 |
| 1.5 La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)..... | 23 |
| 1.5.1 SLA come proteinopatia..... | 23 |
| 1.5.2 FUS e TDP-43: funzioni biologiche nel metabolismo dell'RNA e DNA e loro coinvolgimento nella SLA | 24 |
| 1.6 La tecnologia SINEUP | 27 |
| 1.6.1 Potenziale terapeutico dei SINEUP nella neurodegenerazione | 29 |
| 2. Scopo del Lavoro | 30 |
| 3. Materiali e Metodi | 32 |
| 4. Risultati | 43 |
| 5. Discussione e Conclusioni | 72 |
| 6. Bibliografia | 77 |

Elenco delle abbreviazioni

53BP1= p53 binding protein 1

AD = Alzheimer's Disease

ALS = amyotrophic lateral sclerosis

Ap = apurinic/apyrimidinic

APE1 = AP endonuclease 1

APLF = aprataxin and PNK-like factor

ASF1A = Anti-Silencing Function 1A histone chaperone

ATM = ataxia telangiectasia-mutated

ATR = ATM and Rad3-related

BD = Binding Domain

BER = Base excision repair

BIR = break-induced replication

BLM = Bloom syndrome helicase

bp = base pairs

BRCA1 = BReast CAncer gene 1

BRCA2 = BReast CAncer gene 2

CAF-1 = Chromatin Assembly Factor 1.

CDKs = cyclin-dependent kinases

CHK1/2 = Checkpoint Kinase 1/2

CI = cytoplasmic inclusions

CLIP-seq = Cross-Linking ImmunoPrecipitation high-throughput sequencing

cNHEJ = classical non-homologous end joining

CtIP = CtBP-interacting protein

D-loop = displacement loop

DDR = DNA damage response

DNA-PK = DNA-dependent protein kinase

DNA-PKcs = DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

DSB = double strand breaks

DSCs= DNA structure checkpoints

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

EV= empty vector

EXO1= Exonuclease 1

FRAP = fluorescence recovery after photobleaching

fSLA = Sclerosi Laterale Amiotrofica familiare

FUS = Fused in Sarcoma

GAPDH = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GFP = Green Fluorescent Protein

H2AK15ub = monoubiquitylated H2A at lysin15

H4K20me2 = dimethylated histone 4 at Lys20

HD = Huntington's Disease

hMNP = human Motor Neuron Progenitors

hnRNP = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

HR = homologous recombination

IDR = intrinsically disordered region

IF = immunofluorescence

iPSCs = induced pluripotent stem cells

IR = ionizing radiation

LCD = Low-Complexity Domain

LIG4 = DNA ligase IV

LLPS = liquid-liquid phase separation

lncRNAs = long non coding RNAs

LTGC = long-tract gene conversion

mCer = mCerulean

MDC1 = Mediator of DNA Damage Checkpoint 1

miRNA = small non-coding microRNA

MMEJ = microhomology mediated end joining

mMNs / mMN = mouse Motor Neurons

MMR = Mismatch repair

MMS = methyl methanesulphonate

MRE11 = meiotic recombination 11

MRN = MRE11-RAD50-NBS1 complex

MRNIP = MRN-interacting protein

MtSUVR2 = *Medicago truncatula* SUVR2

mVen = mVenus

NBS1 = Nijmegen breakage syndrome 1

NCS = Neocarzinostatin

NER = Nucleotide excision repair

NHEJ = non-homologous end joining

NLS = nuclear localization signal

NONO = non-POU domain-containing octamer-binding

OE = Overexpression

PARG = PAR glycohydrolase

PARP 1/2 = poly(ADP-ribose) polymerase 1/2

PARPi = PARP inhibitors

PAXX = paralogue of XRCC4 and XLF

PBG = Phosphate-Buffered Saline with Bovine serum albumin and Glycine

PBS = Phosphate-Buffered Saline

PD = Parkinson's diseases

PFA = Paraformaldehyde

PIKKs = phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases

PSI = Percent Spliced In

PTMs = post-translational modifications

RBM14 = RNA binding motif protein 14

RBPs/RBP = RNA binding proteins

RFP = Red Fluorescent Protein

RNF8 = Ring finger protein 8

RNP = ribonucleoprotein

ROS = reactive oxygen species

RPA = replication protein A

SACs = Spindle Assembly Checkpoints

SCR H = Scramble High

SDSA = synthesis-dependent strand annealing

SFPQ = splicing factor proline- and glutamine-rich

RT = Room Temperature

RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

siCTRL / siCNTRL = small interfering Control RNA

SINEUP = SINE element-containing antisense long non-coding RNA-UPregulators

siRNA = small interfering RNA

SNC = Sistema Nervoso Centrale

SOD1 = Superoxide Dismutase 1

SSA = single strand annealing

SSBs = single-strand breaks

SSBR = Single-Strand Break Repair

ssDNA = short single-strand DNA

sSLA / sALS = Sclerosi Laterale Amiotrofica sporadica / sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis

TARDBP = TAR DNA-Binding Protein gene

TDP-43 = TAR-DNA binding protein 43

TFIIH = Transcription Factor II Human

TIA-1 = TIA-1 Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein

TRA2 = Transformer 2 (regolatore di splicing)

UPS = Ubiquitin-Proteasome System

UV = ultraviolet

WASH = WASH complex (WASP Alternative protein Family)

WEE1 = Wee1 G2 Checkpoint Kinase

WT = Wild-Type

XLF = XRCC4-like factor

γ H2AX= phospho-H2AX (pSer139) histone

1. Introduzione

1.1 Danno al DNA

Il DNA (Acido Desossiribonucleico) rappresenta il polimero fondamentale in cui è codificata l'intera informazione genetica di un organismo. Strutturalmente organizzato in una doppia elica di nucleotidi, esso funge da matrice informativa per la sintesi di RNA codificanti o non codificanti proteine, la regolazione del differenziamento e della funzione cellulare. Tuttavia, il DNA non è un archivio statico. È una molecola chimicamente reattiva, costantemente esposta ad agenti che ne possono alterare la struttura. All'interno di ogni singola cellula umana, si stima che avvengano tra le 10^4 e le 10^5 lesioni al giorno a carico del genoma. Pertanto, il mantenimento dell'integrità genomica è una condizione indispensabile per la sopravvivenza biologica. L'integrità non riguarda solo l'assenza di mutazioni nella sequenza nucleotidica ma anche la stabilità delle modificazioni della cromatina che regolano l'espressione e la struttura epigenetica e conformazionale. Per contrastare il frequente danno al DNA le cellule hanno evoluto un complesso sistema di sorveglianza noto come DNA Damage Response (DDR). Il DDR è una rete di segnalazione cellulare che rileva il danno, blocca temporaneamente il ciclo cellulare per evitare la propagazione dell'errore e recluta enzimi specifici per la riparazione (Jackson & Bartek, 2009). Quando i sistemi di riparazione falliscono ed i danni al DNA si accumulano, la cellula va incontro a due destini principali: la senescenza, che è uno stato di arresto replicativo permanente della cellula pur restando metabolicamente attiva, e l'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata, un evento fondamentale per prevenire il cancro ma dannoso nel caso in cui le cellule di un tessuto non possono essere facilmente rimpiazzate come nel caso dei neuroni. Quest'ultima comporta un progressivo accumulo di mutazioni che, attraverso l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di oncosoppressori, può guidare la trasformazione neoplastica e l'oncogenesi in un'ampia varietà di tessuti. Tuttavia, nei neuroni maturi, essendo cellule permanentemente post-mitotiche l'accumulo di lesioni possono condurre alla perdita di funzionalità e alla degenerazione cellulare (Hoeijmakers, 2009).

1.1.1 Danno al DNA nella neurodegenerazione

Mentre la formazione di mutazioni che portano all'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di oncosoppressori spingono le cellule differenziate a trasformare in cellule neoplastiche ad acquisire una capacità iper replicativa, i nei sani neuroni maturi ma non trasformati l'accumulo di danno al DNA porta principalmente alla morte cellulare programmata tramite apoptosi. Lo dimostra il fatto che nella SLA tessuti post mortem mostrano positività al fattore della DDR p53 attivato che è a monte della segnalazione dell' apoptosi. In tali cellule quindi il DNA non riparato può rappresentare un driver primario della morte cellulare alla base della neurodegenerazione. I neuroni sono cellule post-mitotiche con un elevatissimo consumo di ossigeno e questa combinazione li espone a un massiccio e costante stress ossidativo, mediato dalla sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido o il perossido di idrogeno. Queste molecole generano lesioni al DNA sotto forma di basi ossidate (come la 8-oxoguanina), rotture del singolo filamento (SSBs) e, le più letali, rotture del doppio filamento (DSBs) (Cooke et al., 2003). L'incapacità di gestire questo carico genotossico porta ad anche uno stress trascrizionale: il macchinario della RNA polimerasi si arresta nei siti di danno riducendo l'espressione delle regioni genomiche danneggiate. Tale condizione compromette anche l'espressione del trascrittoma, non solo riducendo a valle la sintesi proteica, ma favorendo anche l'accumulo di ibridi DNA:RNA, strutture che possono essere genotossiche e interferiscono con il corretto splicing dei messaggeri sinaptici (Aguilera & Garcia-Muse, 2012). Per fronteggiare l'assalto costante delle specie reattive dell'ossigeno, i neuroni hanno evoluto una sofisticata rete di sorveglianza che permette di riparare la rottura della doppia elica. Essendo cellule post-mitotiche, permanentemente in fase G0, sono incapaci di utilizzare la Homologous Recombination (HR), il meccanismo di riparazione più accurato che utilizza un cromatidio fratello integro come stampo per ripristinare la sequenza originale. Le cellule neuronali invece devono ricorrere ad un altro metodo: Non-Homologous End Joining (NHEJ). A differenza dell'HR, l'NHEJ non richiede uno stampo omologo e agisce riavvicinando e saldando direttamente le estremità del DNA rotto. Sebbene sia estremamente rapido ed efficiente, l'NHEJ è intrinsecamente propenso all'errore ("error-prone"), potendo

causare piccole inserzioni o delezioni (in/del) nel sito di giunzione (Iyama & Wilson III, 2013). Numerosi studi hanno evidenziato l'accumulo di rotture a singolo e a doppio filamento nei pazienti affetti da patologie neurodegenerative come malattia di Alzheimer (AD), malattia di Huntington (HD), malattia di Parkinson (PD) e Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) con una correlazione tra il loro accumulo e le fasi di progressione della malattia (Welch & Tsai, 2022). Pertanto, la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la DDR e delle condizioni che ne determinano il mal funzionamento risulta cruciale per la comprensione dei meccanismi alla base della neurodegenerazione contribuendo allo sviluppo di terapie mirate e strumenti diagnostici per la rilevazione precoce dell'insorgenza di tali patologie.

1.2 Differenti tipologie di danno al DNA e relativi meccanismi di riparazione

L'integrità genomica è costantemente minacciata da un duplice fronte di insulti: fattori esogeni ed endogeni (**Fig. 1**). Senza l'intervento tempestivo di complessi sistemi di sorveglianza e riparazione, come il DDR, l'accumulo di lesioni porterebbe inevitabilmente al collasso delle funzioni cellulari (Tubbs & Nussenzweig, 2017; Torgovnick & Schumacher, 2015).

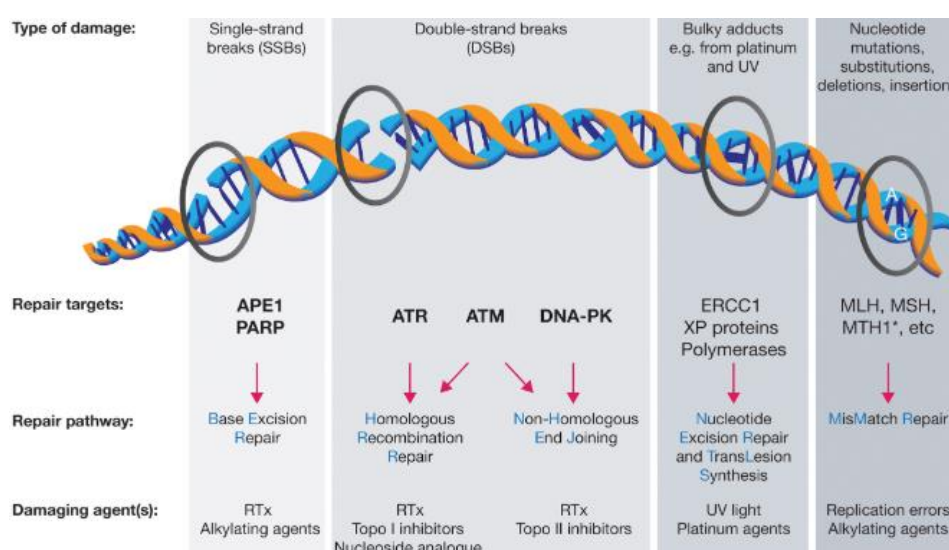


Figura 1: Rappresentazione dei fattori endogeni ed esogeni che causano danno al DNA. (O'Connor, 2015)

Tra le fonti esterne, le radiazioni ultraviolette (UV) rivestono un ruolo predominante, essendo in grado di indurre la formazione di dimeri di pirimidina e addotti voluminosi (bulky adducts). Tali lesioni distorcono localmente la doppia elica, ostacolando l'avanzamento delle DNA e RNA polimerasi e compromettendo così la fedeltà della replicazione e della trascrizione (Lagerwerf et al., 2011). Mutazioni nei geni coinvolti nella riparazione delle Bulky Lesions hanno un fenotipo neurodegenerativo. Le radiazioni ionizzanti (IR), invece, agiscono sia direttamente, causando rotture del singolo o del doppio filamento, grazie alla loro elevata energia, e sia indirettamente, promuovendo la radiolisi dell'acqua e la conseguente generazione dei ROS. Il panorama degli agenti esterni include anche una vasta gamma di composti chimici, molti dei quali sfruttati in ambito chemioterapico per la loro capacità di indurre genotossicità nelle cellule ad alta proliferazione. Esempi chiave sono il Cisplatino che induce cross-link e addotti voluminosi, agenti intercalanti (es. benzopireni) che si legano covalentemente al DNA, agenti alchilanti (es. MMS e mostarde azotate) che modificano chimicamente le basi azotate e infine abbiamo gli inibitori delle topoisomerasi (es. etoposide e camptotecina) che bloccano appunto questi enzimi durante la generazione transitoria di rotture del filamento, impedendo la successiva ligazione e convertendo un processo fisiologico in una lesione persistente. Parallelamente, la cellula deve gestire insulti derivanti dal proprio metabolismo. I ROS, sottoprodotti fisiologici della respirazione mitocondriale, possono causare l'ossidazione delle basi (come la formazione della 8-oxo-guanina) e indurre SSB. Un altro evento critico è l'instabilità chimica dei legami beta-N-glicosidici, la cui idrolisi spontanea porta alla formazione di siti apurinici (siti AP), un fenomeno noto come depurinazione che si riscontra con frequenza in condizioni fisiologiche (Lindahl & Barnes, 2000). Infine, l'integrità del genoma è messa a rischio durante la fase S. Nonostante l'efficacia dell'attività di proofreading delle DNA polimerasi δ ed ϵ , possono verificarsi errori di appaiamento (mismatch) o fenomeni di polymerase slippage nelle sequenze microsatelliti. La stabilità della forca replicativa può inoltre essere compromessa dalla collisione con complessi di trascrizione o strutture secondarie non

canoniche, come i G-quadruplex. Tali ostacoli possono causare il collasso della forca, generando rotture del doppio filamento (Zeman & Cimprich, 2014).

1.2.1 Mismatch repair (MMR)

Il sistema di Mismatch Repair (MMR) è un meccanismo altamente conservato che garantisce la fedeltà della replicazione genomica, riducendo il tasso di errore della DNA polimerasi di circa 100-1000 volte. Nell'uomo, il processo è orchestrato da complessi proteici noti come MutS e MutL. Il dimero MutS- α (composto da MSH2 e MSH6) riconosce i mismatch di singola base, mentre MutS- β (MSH2 e MSH3) identifica le piccole inserzioni o delezioni. Una volta legato il primo dimero, il secondo complesso MutL- α (MLH1 e PMS2) viene reclutato sul sito e, grazie alla sua attività endonucleasica, crea dei tagli che permettono all'esonucleasi EXO1 di rimuovere il tratto di DNA errato. Infine, la DNA polimerasi δ sintetizza il nuovo segmento e la ligasi I sigilla l'elica (**Fig. 2**) (Goldstein & Kastan, 2015).

1.2.2 Base Excision Repair (BER)

Il Base Excision Repair (BER) costituisce la via metabolica primaria per la riparazione di lesioni del DNA che non alterano drasticamente la struttura a doppia elica, come quelle prodotte dai radicali liberi dell'ossigeno, dagli agenti alchilanti o dalle deaminazioni spontanee. Il meccanismo è avviato dalle DNA glicosilasi, enzimi che riconoscono e idrolizzano il legame N-glicosidico della base danneggiata, creando un sito apurinico/apirimidinico (sito Ap). L'integrità del filamento viene successivamente ripristinata attraverso l'azione coordinata di AP-endonucleasi 1 (APE1), DNA polimerasi- β e ligasi (**Fig. 2**). Questo sistema è vitale per contrastare l'instabilità genomica derivante dal metabolismo ossidativo cellulare (Krokan & Bjørås, 2013).

1.2.3 Nucleotide Excision Repair (NER)

Il Nucleotide Excision Repair (NER) è un meccanismo di riparazione estremamente versatile, deputato alla rimozione di lesioni "bulky" che distorcono la geometria del DNA, tra cui i fotoprodotti indotti dai raggi UV (come i dimeri di pirimidina) e gli addotti chimici voluminosi. A differenza del BER, il NER opera attraverso l'escissione di un breve frammento di oligonucleotide contenente la lesione. Questo processo si distingue in due branche operative: il Global Genome NER (GG-NER), che scansiona l'intero genoma alla ricerca di distorsioni, e il Transcription-Coupled NER (TC-NER), che interviene durante la trascrizione. Nello specifico, il riconoscimento del danno avviene tramite il complesso XPC nel GG-NER o dall'arresto della RNA polimerasi nel TC-NER. Successivamente, il fattore di trascrizione TFIIH, contenente le elicasi XPB e XPD, svolge la doppia elica. Le endonucleasi XPF e XPG eseguono, quindi, dei tagli rispettivamente al 5' e al 3' della lesione, permettendo l'asportazione dell'oligonucleotide danneggiato (Fig. 2). Difetti in questo pathway sono clinicamente associati a gravi sindromi di instabilità genomica, come lo Xeroderma Pigmentosum (Schärer, 2013).

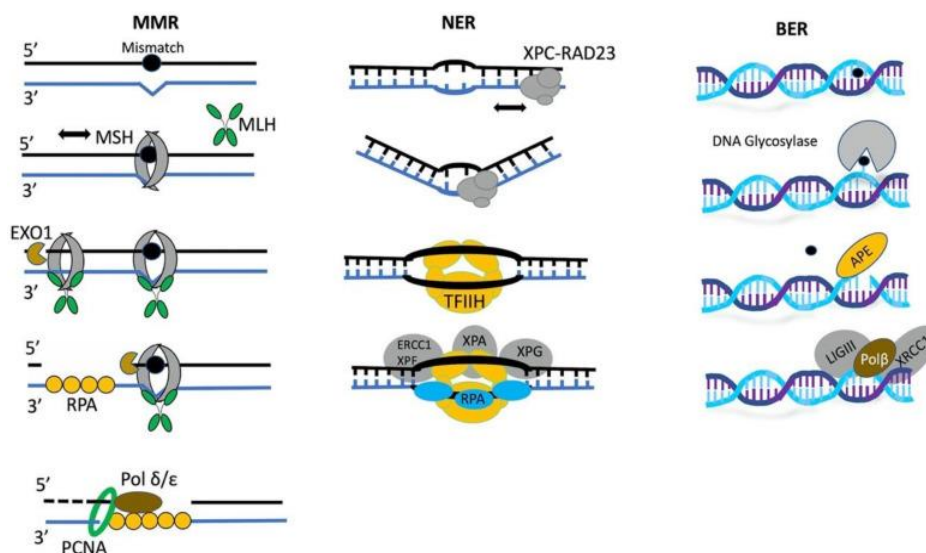


Figura 2: Rappresentazione delle vie di riparazione MMR, NER, BER (Karakaidos et al., 2020)

1.2.4 SSB repair (Single Strand Breaks)

La riparazione delle rotture del singolo filamento (SSBR) è un processo essenziale per rimediare alle interruzioni dello scheletro fosfodiesterico causate da stress ossidativo, attacco di specie reattive dell'ossigeno o come intermedi derivanti dall'attività di enzimi come la topoisomerasi I (Caldecott, 2008). Il sensore principale di queste lesioni è la poli(ADP-ribosio) polimerasi 1 (PARP-1), che legandosi all'estremità del DNA recluta la proteina scaffold XRCC1. Quest'ultima funge da piattaforma per l'assemblaggio di un complesso di processamento che include la polinucleotide chinasi fosfatasi (PNKP), necessaria per "ripulire" le estremità del DNA e renderle idonee alla polimerizzazione. Infine, la DNA polimerasi- β sintetizza il nucleotide mancante e la DNA ligasi III sigilla il nick, ripristinando la continuità del filamento. Un'efficace coordinazione dello SSBR è cruciale per prevenire la conversione di queste lesioni in più pericolose rotture del doppio filamento durante la replicazione (Abbas et al., 2013).

1.3 Focus sulla segnalazione e sui meccanismi di riparazione delle rotture a doppio filamento (DSB)

1.3.1 Panoramica generale della risposta al danno del DNA

Sebbene le rotture a doppio filamento del DNA, vengano indotte in modo controllato in specifiche condizioni fisiologiche, come durante la ricombinazione V(D)J del sistema immunitario o nei processi di modulazione della topologia del DNA (Khan & Ali, 2017), esse sono generalmente classificate come "danni complessi" (complex DNA damage) a causa dell'elevata minaccia che pongono alla stabilità del genoma. Le DSB possono originare quando due rotture a singolo filamento si trovano in stretta prossimità su filamenti opposti, oppure attraverso la conversione enzimatica di lesioni minori che collidono con una forza replicativa o una SSB preesistente. Indipendentemente dalla loro eziologia (esogena o endogena), queste lesioni interrompono la continuità della doppia elica. L'assenza di un filamento complementare integro che funga da stampo rende la loro risoluzione particolarmente critica: un errore in questa fase può esitare in traslocazioni cromosomiche, perdita di informazione genetica o morte cellulare.

Per coordinare la riparazione, come già introdotto, la cellula attiva un sofisticato network di segnalazione noto come DDR. Questo sistema è governato da tre protein-chinasi della famiglia delle phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases (PIKKs): la DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) e ATM and Rad3-related (ATR), coadiuvate dall'azione delle poli(ADP-ribosio) polimerasi, PARP1 e PARP2 (Ciccia & Elledge, 2010). Mentre le PARP agiscono come sensori molecolari legandosi direttamente alle estremità del DNA e innescando la "PARilazione" (PARylation) per rimodellare la cromatina (Posavec Marjanović et al., 2017), le chinasi PIKK necessitano di complessi mediatori per il riconoscimento del danno: il complesso MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) agisce come sensore primario per ATM, ATRIP media il reclutamento di ATR sui tratti di DNA a singolo filamento protetti da RPA e l'eterodimero KU70/KU80 recluta DNA-PK per avviare la riparazione non omologa. Una volta reclutate e attivate, queste chinasi iniziano una massiccia cascata di fosforilazione su centinaia di substrati contenenti il motivo consenso S/TQ (Serina o Treonina seguite da Glutammina) (Traven & Heierhorst, 2005). Una delle prime modifiche è la fosforilazione dell'istone H2AX (γ H2AX), che delimita la regione di cromatina danneggiata e funge da piattaforma per l'amplificazione del segnale. La propagazione di questa informazione dal sito della lesione all'intero nucleoplasma è fondamentale per orchestrare una risposta cellulare sistemica. Tale diffusione dipende da risposte trascrizionali e biochimiche regolate dalle chinasi checkpoint a valle, CHK1 (Checkpoint Kinase 1, attivata principalmente da ATR) e CHK2 (Checkpoint Kinase 2, attivata principalmente da ATM) (**Fig. 3**). Questo asse di segnalazione, interagendo con regolatori chiave come p53, permette alla cellula di decidere se arrestare temporaneamente il ciclo cellulare per tentare la riparazione o, in caso di danno irreparabile, intraprendere la via dell'apoptosi (Polo & Jackson, 2011; Sirbu & Cortez, 2013).

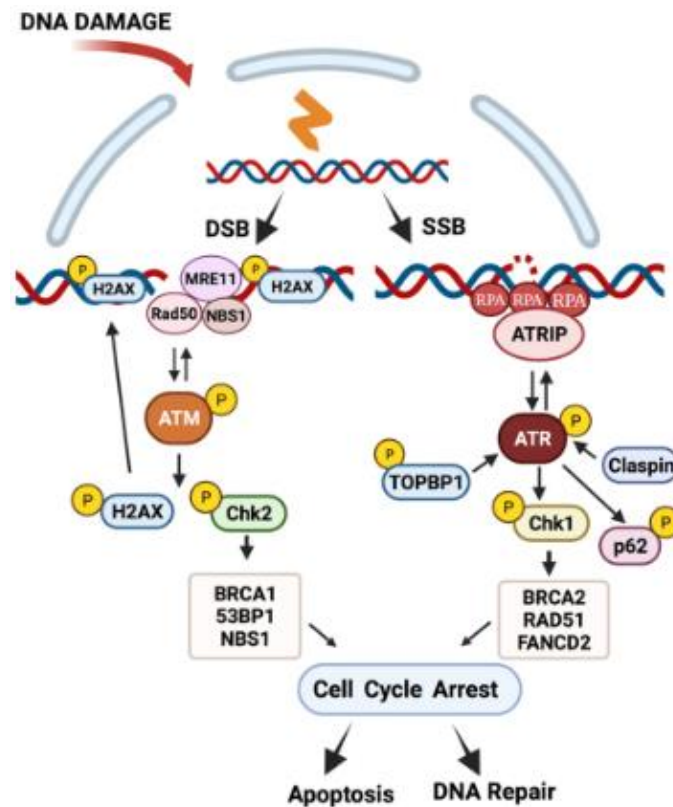


Figura 3: Vie mediate da ATM e ATR in presenza di DNA danneggiato (Gusho et al., 2021)

1.3.2 Checkpoint del ciclo cellulare e risposta al danno al DNA

Il mantenimento della stabilità del genoma è affidato a una rete di sorveglianza molecolare che coordina la progressione del ciclo cellulare con l'integrità strutturale del DNA. Questi sistemi, definiti checkpoint del ciclo cellulare, sono classificati in due categorie principali: i DNA structure checkpoints (DSCs), che monitorano la presenza di lesioni o errori di replicazione, e gli spindle assembly checkpoints (SACs), che garantiscono la corretta segregazione cromosomica (Huang & Zhou, 2020). Le DSB rappresentano uno dei segnali più potenti per l'attivazione dei DSCs, innescando la cascata di eventi del DDR. Questo network è orchestrato dalle chinasi sensori ATM e ATR, che attivano per fosforilazione le chinasi effettrici CHK1 e CHK2 (Fig. 4). Queste ultime trasducono il segnale verso bersagli molecolari specifici che convergono sulla modulazione delle

chinasi ciclina-dipendenti (CDKs), i motori proteici responsabili della transizione tra le diverse fasi del ciclo (Huang & Zhou, 2020). Esistono tre punti di controllo critici attivati in risposta al danno: i checkpoint G1/S, intra-S e G2/M (Branzei & Foiani, 2008).

Il Checkpoint G1/S funge da barriera, impedendo l'ingresso nella fase di sintesi (fase S) di cellule con DNA danneggiato. In condizioni fisiologiche, il complesso ciclina D-CDK4/6 fosforila la proteina del retinoblastoma (pRB), permettendo il rilascio del fattore di trascrizione E2F e la successiva espressione della ciclina E, necessaria per l'attivazione di CDK2 e la progressione del ciclo. Tuttavia, in presenza di DSBs, CHK1 e CHK2 mediano la fosforilazione della fosfatasi Cdc25A, causandone l'esclusione nucleare e la degradazione proteasomica (Jin et al., 2003). Parallelamente, le chinasi effettrici stabilizzano la proteina p53 tramite fosforilazione in Ser20 e inibizione dell'ubiquitina ligasi MDM2. L'accumulo di p53 promuove la trascrizione di CDKN1A (che codifica per p21), un potente inibitore di CDK2 che blocca efficacemente la transizione G1/S, fornendo il tempo necessario alla riparazione (Abuetabh et al., 2022). Qualora il danno si verifichi durante la replicazione, il checkpoint intra-S interviene per rallentare la sintesi del DNA. Questo processo è regolato da diverse vie, tra cui l'asse ATM/ATR-CHK2/CHK1-Cdc25A-CDK2, che impedisce il caricamento della proteina Cdc45 sulla cromatina, ritardando la progressione delle forche replicative (Huang & Zhou, 2020). Inoltre, la fosforilazione di NBS1 da parte di ATM e CHK2 non solo contribuisce all'arresto del ciclo, ma favorisce il reclutamento dei macchinari di riparazione direttamente sui siti di danno durante la replicazione. Il Checkpoint G2/M invece impedisce alle cellule di entrare in mitosi in presenza di DSB non riparate, regolando negativamente il complesso Ciclina B-Cdc2 (CDK1). In risposta al danno, CHK1 e CHK2 inattivano Cdc25 (che normalmente attiverebbe Cdc2) e potenziano l'attività della chinasi Wee1, che mantiene il complesso mitotico in uno stato inibito. Sebbene p53 contribuisca a questo arresto tramite l'induzione di geni come 14-3-3 σ e GADD45, il checkpoint G2/M è parzialmente indipendente da p53, rappresentando un meccanismo di salvaguardia cruciale anche in contesti cellulari dove la via di p53 è compromessa (O'Connell et al., 1997). L'attivazione persistente di questi checkpoint, qualora il danno risulti

irreparabile, determina l'uscita definitiva dal ciclo cellulare tramite l'ingresso in senescenza o l'induzione dell'apoptosi. Pertanto, la corretta integrità di CHK1, oggetto centrale di questo studio, risulta indispensabile affinché la cellula possa decidere correttamente tra riparazione e morte programmata, evitando la propagazione di instabilità genomica.

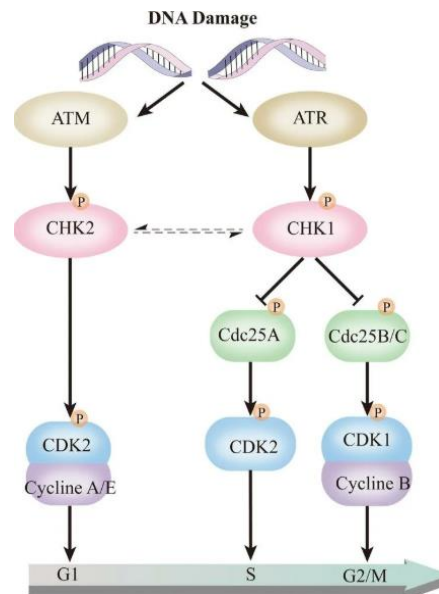


Figura 4: Checkpoint del ciclo cellulare (Wu et al., 2020)

1.3.3 Meccanismi di riconoscimento e segnalazione delle DSB nel ciclo cellulare

Il riconoscimento delle rotture a doppio filamento è un processo dinamico che inizia immediatamente dopo la formazione della lesione con il reclutamento di PARP1. Questa proteina funge da sensore precoce e interagisce con il complesso MRN (MRE11–RAD50–NBS1), facilitando un'identificazione efficiente del danno durante tutte le fasi del ciclo cellulare (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). Nonostante la costante attività di questi sensori, la scelta del pathway di riparazione e la successiva cascata di segnalazione sono strettamente regolate dal contesto temporale della cellula.

Nella fase G1, il riparo è prevalentemente affidato all' NHEJ. In questa fase, il complesso MRN recluta la chinasi apicale ATM, che innesca la segnalazione

mediante la fosforilazione dell'istone H2AX in Ser139. Tale modificazione, coordinata con la defosforilazione del residuo Tyr142, permette il legame della proteina scaffold MDC1, fondamentale per l'amplificazione del segnale e il reclutamento di 53BP1 (53 binding protein 1) (Kinner et al., 2008). Recenti evidenze hanno arricchito questo scenario evidenziando il coinvolgimento di numerose proteine leganti l'RNA (RBPs) nelle fasi precoci della DDR. Tra queste, spiccano FUS (Fused in Sarcoma) e TDP-43, proteine note per il loro ruolo in patologie come la SLA. TDP-43 contribuisce attivamente alla riparazione via NHEJ e previene la formazione di ibridi DNA:RNA deleteri, mentre FUS è essenziale per il corretto posizionamento di fattori chiave come KU80, NBS1 che permettono di reclutare 53BP1 sui siti di danno (Levone et al., 2021) suggerendo quindi che FUS intervenga nelle fasi molto precoci della DDR, contribuendo all'inizio dei processi di riparazioni. Altre proteine come RBM14, SFPQ e l'elicasi DDX17 partecipano a questo complesso network di riconoscimento, suggerendo un legame funzionale tra metabolismo dell'RNA e stabilità genomica.

Nelle fasi S e G2, la disponibilità del cromatidio fratello permette l'attivazione dell'HR, un processo che richiede la generazione di tratti di DNA a singolo filamento attraverso la resezione delle estremità 5'-3'. Questo evento è orchestrato dalla cooperazione tra il complesso MRN e la proteina CtBP-interacting protein (CtIP), la cui attività è regolata dalle CDKs. La fosforilazione di CtIP da parte delle CDKs è il sensore molecolare che promuove l'inizio della resezione attraverso l'interazione con la subunità MRE11 del complesso MRN. (Stinson & Loparo, 2021). L'ampiezza della resezione determina la scelta del meccanismo di riparo: una resezione a corto raggio può indirizzare la cellula verso la Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ). Una resezione estesa invece favorisce l'HR o il Single-Strand Annealing (SSA) che verrà discussa in seguito. La resezione a lungo raggio coinvolge EXO1, una delle esonucleasi responsabili dell'estensione del segmento resected, e l'elicasi BLM (Bloom syndrome helicase) con attività 3'-5', implicata nella dissoluzione delle giunzioni di Holliday, strutture a quattro bracci generate durante l'HR (Ferretti et al., 2013). Al contrario, la bassa attività delle CDKs in G1 limita sia la resezione sia la riparazione tramite HR, favorendo la riparazione tramite NHEJ. La produzione di

ssDNA consente infine il caricamento della proteina RPA (Replication Protein A), che a sua volta attiva la chinasi ATR, spostando il baricentro della risposta cellulare verso l'attivazione di CHK1 e il coordinamento della riparazione con la replicazione del DNA.

1.3.4 Vie di riparazione delle DSB: focus su NHEJ

La via della giunzione delle estremità non omologhe classica (cNHEJ) è il meccanismo prevalente per la riparazione delle rotture a doppio filamento nelle cellule di mammifero. Il processo è innescato dal legame dell'eterodimero Ku70–Ku80 (noto anche come XRCC6–XRCC5) con le estremità del DNA. Sebbene studi *in vitro* suggerissero l'associazione di più molecole di Ku, analisi di live imaging hanno confermato che un singolo dimero Ku si lega a ciascuna estremità di una DSB cromosomica (Britton et al., 2013). Il complesso Ku70–Ku80 è altamente abbondante nel nucleo e mostra un'affinità specifica per estremità tronche o con brevi sequenze protrudenti a singolo filamento; al contrario, estremità con code ssDNA più lunghe risultano meno efficientemente indirizzate verso questa via (Scully et al., 2019).

Il dimero Ku funge da piattaforma per il reclutamento dei componenti fondamentali della cNHEJ tra cui la subunità catalitica della proteina chinasi dipendente dal DNA (DNA-PKcs), la DNA ligasi IV (LIG4), la proteina XRCC4, essenziale per la stabilità e la funzionalità della ligasi stessa, e i fattori scaffold XLF (XRCC4-like factor) e PAXX (paralogue of XRCC4 and XLF), che ricoprono ruoli strutturali in parte sovrapponibili (Ochi et al., 2015). L'analisi a singola molecola ha rivelato che la sinapsi delle estremità avviene in due fasi dinamiche. Inizialmente, Ku70–Ku80 e DNA-PKcs mediano una sinapsi a lungo raggio, che evolve successivamente in una sinapsi a corto raggio dove le estremità del DNA vengono strettamente allineate. Questo passaggio critico richiede XLF, le funzioni non catalitiche del complesso XRCC4–LIG4 e l'attività chinasi di DNA-PKcs (Scully et al., 2019). All'interno di questo complesso sinaptico, le estremità vengono elaborate per renderle compatibili alla ligazione tramite l'azione della nucleasi Artemis (capace di processare overhang o estremità

modificate) e delle DNA polimerasi specializzate λ e μ (**Fig. 5**) (Stinson et al., 2020).

Il sistema è regolato da diversi fattori accessori e modificazioni post-traduzionali. Il complesso MRN favorisce l'incontro tra le estremità, mentre l'aprataxina e il PNK-like factor (APLF) interagiscono con Ku80 in prossimità della DSB (Scully et al., 2019). Molte di queste proteine interagenti condividono un motivo specifico di legame, il Ku-binding motif (Grundy et al., 2016). Tra i regolatori emergenti, il fattore promotore della nucleazione dell'actina WASH interagisce con il dimero Ku, suggerendo un legame tra la riparazione del DNA e le dinamiche del citoscheletro. Infine, l'autofosforilazione di DNA-PKcs e la sua fosforilazione via ATM controllano la stabilità del complesso e il suo disassemblaggio finale una volta completata la riparazione (Scully et al., 2019).

1.3.5 Vie di riparazione delle DSB: focus su HR

La ricombinazione omologa rappresenta la seconda principale via di riparazione delle DSB e si articola in una serie di passaggi sequenziali. Come detto in precedenza, mentre la cNHEJ può operare durante tutto il ciclo cellulare, l'HR avviene prevalentemente nelle fasi S e G2. Si tratta di un processo conservativo e potenzialmente privo di errori, che comporta la ricombinazione tra cromatidi fratelli, favorita dalla complementarità della sequenza, dall'allineamento spaziale e dalla coesione fisica tra i cromatidi (Scully et al., 2019). Una HR non controllata però può anche portare a traslocazioni.

Negli eucarioti, anche l'HR è avviata dal complesso MRN, che promuove sia la resezione delle estremità del DNA sia l'attivazione di ATM. L'attività endonucleasica di MRE11 genera un nick nel filamento con estremità 5' libera in prossimità della DSB, mentre l'attività esonucleasica 3'-5' di MRE11 estende tale incisione verso l'estremità del DNA. Questa attività è potenziata da RAD50, la cui idrolisi di ATP induce un cambiamento conformazionale di MRE11 da uno stato chiuso inattivo a uno stato aperto cataliticamente competente. La subunità NBS1 è inoltre fondamentale per il reclutamento di CtIP fosforilata, necessaria per la resezione a corto raggio dipendente da MRE11. Questo evento è stimolato dalla

presenza di proteine che proteggono le estremità del DNA, quali Ku70–Ku80, RPA o i nucleosomi (Scully et al., 2019). Il processamento iniziale determina il distacco di Ku70–Ku80 e consente la resezione a lungo raggio mediata da EXO1, Dna2 e dall’elicasi BLM, che estendono la coda 3’ di DNA a singolo filamento. L’ssDNA generato viene rivestito dal complesso RPA, che impedisce l’appaiamento tra molecole di ssDNA e la formazione di strutture secondarie. RPA deve quindi essere sostituita dai monomeri del mediatore RAD51. BRCA2 interagisce con l’ssDNA associato a RAD51, mentre il complesso BRCA1–BARD1, tramite PALB2, facilita la rimozione di RPA dall’ssDNA (Chen et al., 2018). L’associazione di BRCA1 sia con proteine coinvolte nella resezione sia nel caricamento di RAD51 suggerisce un suo ruolo in plurime fasi dell’HR.

Il filamento nucleoproteico RAD51–ssDNA costituisce una struttura dinamica regolata da attività antagoniste. La proteina legante ssDNA RADX inibisce l’attività di RAD51 interagendo con la forma legata ad ATP e promuovendo l’idrolisi dell’ATP, destabilizzando i nucleofilamenti. Al contrario, il paralog SWSAP1 promuove la stabilità del filamento antagonizzando FIGNL1, fattore responsabile del disassemblaggio. Il filamento RAD51–ssDNA media la ricerca di omologia invadendo il duplex di DNA e appaiandosi con sequenze complementari, evento facilitato anche dal complesso BRCA1–BARD1 (Scully et al., 2019). I complessi sinaptici mediati da RAD51 generano intermedi a tripla elica, favorendo la formazione di DNA eteroduplex. Se l’appaiamento è sufficiente, la sinapsi si stabilizza e il filamento non appaiato forma un displacement loop (D-loop). L’estremità 3’ libera del filamento invasore recluta quindi una DNA polimerasi, principalmente la DNA polimerasi δ , sebbene possano contribuire anche polimerasi translesione (Adolph et al., 2021). Alcune elicasi/translocasi come FANCM, BLM e RTEL1 possono disassemblare i D-loop, limitando l’estensione della conversione genica. Dopo la formazione del D-loop, nelle cellule somatiche la via predominante è la synthesis-dependent strand annealing (SDSA), meccanismo conservativo senza crossing-over. Nelle cellule meiotiche, il crossing-over deriva solitamente da un doppio intermedio di giunzione di Holliday. Se il filamento neosintetizzato non viene dislocato, possono essere favorite vie potenzialmente error-prone come la long-tract gene

conversion (LTGC) o la break-induced replication (BIR) (Fig. 5) (Scully et al., 2019).

L' HR è strettamente associata al rischio oncologico, con mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 frequenti nei tumori ereditari (Kuchenbaecker et al., 2017). Difetti nella HR rendono le cellule sensibili agli inibitori di PARP, sfruttando la letalità sintetica (Lord & Ashworth, 2017). In mancanza di BRCA1/2, le cellule diventano dipendenti da vie come MMEJ, dove PARP promuove il reclutamento di POLθ (Chen et al., 2018). I tumori BRCA-deficienti mostrano letalità sintetica anche in seguito alla perdita di POLθ o di RAD52. Recentemente, l'inibizione di POLθ con PARP o RAD52 ha mostrato risultati promettenti in cellule leucemiche HR-deficienti. Al contrario, l'inibizione di DNA-PKs (NHEJ) può ridurre la sensibilità ai PARPi, probabilmente stimolando il ripristino dell' HR (Patel et al., 2011).

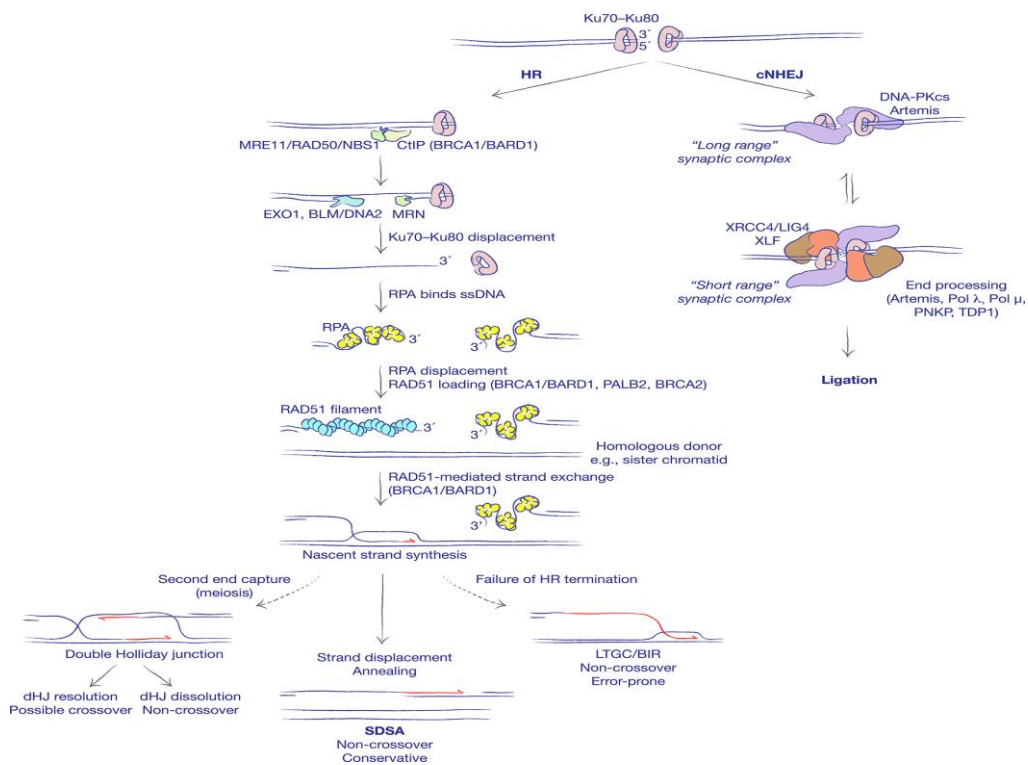


Figura 5: Vie di riparazione della doppia elica del DNA: HR e cNHEJ (Scully et al., 2019)

1.3.6 La separazione di fase liquido-liquido (LLPS)

Negli ultimi anni, la separazione di fase liquido-liquido (liquid-liquid phase separation, LLPS) è emersa come un meccanismo chiave mediante il quale le cellule eucariote e procariote compartimentalizzano e coordinano diversi processi biochimici, tra cui la trascrizione, l'organizzazione della cromatina e la riparazione delle lesioni del DNA. La LLPS è caratterizzata principalmente da due proprietà: diffusione dinamica all'interno del biocondensato e compartimentalizzazione reversibile. In virtù di tali caratteristiche, la tecnica del fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) risulta funzionale per identificare nelle cellule viventi condensati biomolecolari con proprietà liquide. Quando una proteina marcata con un fluoroforo forma strutture sferiche e recupera la fluorescenza dopo fotobleaching con una determinata cinetica (inferiore alla diffusione semplice ma superiore al non recupero di strutture solide statiche come gli aggregati fibrillari), ciò è indicativo di un comportamento compatibile con la LLPS. Inoltre, proprietà tipiche dei condensati a goccia, quali la capacità di fondersi o dividersi, consentono di distinguerli da strutture in stato solido o gel-like (Wang et al., 2023).

Sia le proteine sia gli acidi nucleici in soluzione possono andare incontro spontaneamente a LLPS in condizioni specifiche, sebbene in contesti fisiologici tale processo sia attivamente regolato. Per separarsi in fase, le macromolecole devono generalmente possedere una multivalenza, ossia la capacità di stabilire molteplici interazioni deboli. In questo contesto, le molecole multivalenti definite scaffold sono essenziali per la formazione dei condensati, mentre i cosiddetti client si legano agli scaffold e ne vengono regolati (Banani et al., 2017). Una propensione elevata alla LLPS è mostrata dalle proteine contenenti regioni intrinsecamente disordinate (IDRs), prive di una struttura secondaria e terziaria stabile e rigide e ricche di sequenze ripetitive a bassa complessità. Diversi fattori modulano questo processo: molecole di RNA (mRNA, rRNA e lncRNA) possono fungere da nucleanti, mentre le modificazioni post-traduzionali (PTMs), come fosforilazione e metilazione, possono alterare le interazioni multivalenti favorendo o escludendo specifiche biomolecole. Anche l'ATP gioca un ruolo

duale, agendo sia come fonte energetica sia come idrotropo per influenzare la solubilità proteica (Wang et al., 2023).

Un ruolo centrale nel guidare queste transizioni di fase è svolto dalla poli(ADP-ribosil)azione. In seguito a danno, PARP1 sintetizza catene di poli(ADP-ribosio) (PAR) che agiscono come scaffold per il reclutamento delle RBP contenenti IDRs (Altmeyer et al., 2015). Questo processo è finemente regolato dalla PAR glycohydrolase (PARG), che disassemblando i compartimenti favorisce il turnover proteico nucleo-citoplasmatico. Tra le RBP coinvolte, la più studiata è FUS, un fattore precoce della DDR reclutato ai siti delle DSB in modo dipendente da PARP (Mastrocola et al., 2013). La LLPS consente a FUS di formare condensati che concentrano altri fattori essenziali della riparazione, quali KU80, NBS1 e SFPQ, promuovendo sia l'NHEJ che l'HR (Levone et al., 2021). Analogamente a FUS, altre proteine sfruttano la LLPS indotta dal PAR per potenziare la riparazione: NONO recluta EGFR nucleare e DNA-PK per favorire l'NHEJ, l'elicasi DDX3X contribuisce al mantenimento dell'integrità genomica e MRNIP forma condensati che concentrano il complesso MRN, potenziando l'attivazione di ATM e la resezione delle estremità del DNA (Wang et al., 2022). La conservazione evolutiva di tali meccanismi è testimoniata da studi su Rad52 nel lievito e MtSUVR2 nelle piante. Tuttavia, alterazioni aberranti della LLPS o mutazioni nelle proteine coinvolte possono spingere questi condensati verso una transizione patologica "liquido-solido", portando alla formazione di aggregati insolubili tipici di malattie neurodegenerative come la SLA e l'Alzheimer, compromettendo irrimediabilmente l'omeostasi cellulare e la stabilità del genoma.

Nel contesto del danno al DNA, la LLPS agisce come regolatore chiave a monte degli eventi di riparazione. Una delle proteine reclutate al DSB che sono state recentemente dimostrate avere la capacità di formare condensati dinamici ai siti di danno è 53BP1 (Kilic et al., 2019). Questa proteina utilizza i suoi numerosi domini funzionali (siti fosforilabili Ser/Thr-Gln, domini di oligomerizzazione e motivi di legame per gli istoni modificati come H4K20me2 e H2AK15ub) per orchestrare la formazione di compartimenti che stabilizzano fattori cruciali come p53, potenziando la risposta trascrizionale di geni bersaglio come p21. Al

contrario, la proteina scaffold AHNAK può inibire tale processo prevenendo la multimerizzazione di 53BP1 (Ghodke et al., 2021).

1.4 Ruolo di CHK1 nella riparazione al danno al DNA

1.4.1 CHK1: custode dell'integrità genomica e della sopravvivenza neuronale

La risposta al danno al DNA rappresenta un network di segnalazione finemente coordinato, essenziale per contrastare le lesioni genomiche che minacciano la stabilità cellulare. Al centro di questo sistema operano le chinasi effettrici CHK1 e CHK2. Sebbene storicamente descritte come mediatori dell'arresto del ciclo cellulare, evidenze recenti attribuiscono a CHK1 (**Fig. 6**) un ruolo centrale e multifasico, che spazia dalla gestione dello stress replicativo alla regolazione della riparazione del DNA in cellule post-mitotiche come i neuroni.

In risposta allo stress replicativo o alla formazione di DNA a singolo filamento, la chinasi ATR recluta e attiva CHK1. Una volta attivata, CHK1 fosforila le fosfatasi della famiglia CDC25, promuovendone la degradazione proteasomiale o l'esclusione nucleare. Questo evento inibisce l'attivazione dei complessi chinasi-ciclina dipendenti CDK1 e CDK2, imponendo un blocco ai checkpoint del ciclo cellulare e fornendo la finestra temporale necessaria per il completamento dei processi di riparazione (Smits e Gillespie, 2015). Oltre a questo ruolo canonico, la proteina CHK1 lavora attivamente per proteggere l'integrità del DNA mentre viene copiato. Essa garantisce che le forche replicative (i punti dove il DNA si duplica) rimangano stabili e non si rompano, ed evita pure che la cellula inizi a copiare il DNA in troppi punti contemporaneamente o nel momento sbagliato; lo fa bloccando la proteina CDC45, che funge da interruttore per l'avvio della copia. In questo modo, CHK1 mantiene l'ordine durante la sintesi del genoma, impedendo che si accumulino errori o danni genetici (Iyer e Rhind, 2017).

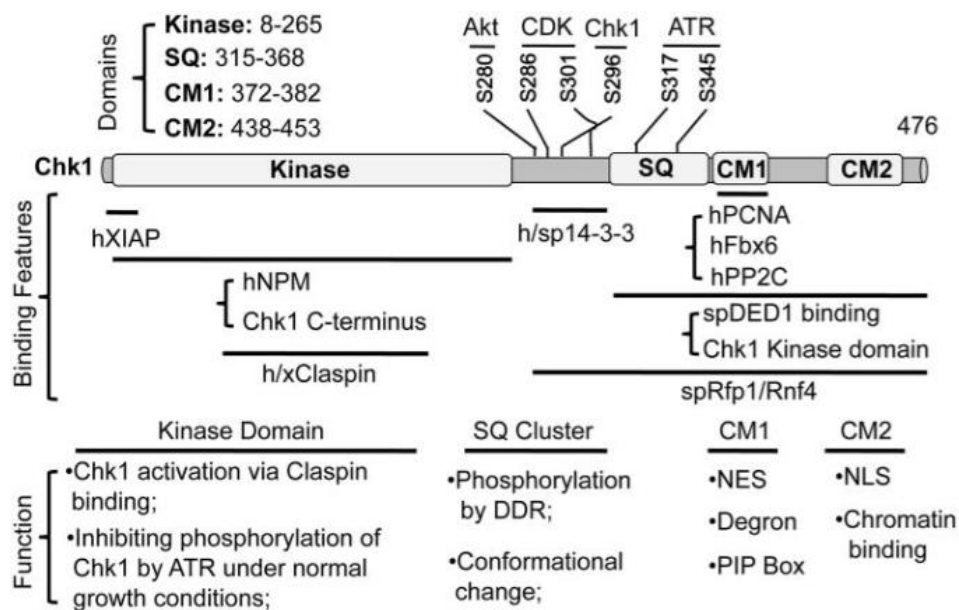


Figura 6: Rappresentazione della struttura molecolare della chinasi CHK1 (Zhang et al., 2014)

1.4.2 L'asse ATM/CHK1/ASF1A nella riparazione delle rotture a doppio filamento

Un aspetto cruciale per la fisiopatologia neuronale è il coinvolgimento di CHK1 nella riparazione delle rotture a doppio filamento. CHK1 non agisce solo come trasduttore di segnale, ma partecipa attivamente al reclutamento dei fattori di riparazione. In particolare, CHK1 collabora funzionalmente con ASF1A. Negli eucarioti, ASF1A svolge un ruolo insostituibile nel veicolare gli istoni (H3-H4) verso il complesso CAF-1, il principale responsabile dell'inserimento dei nuovi istonici durante la sintesi e la riparazione del DNA. In fase G1 e nei neuroni differenziati, l'attivazione di CHK1 dipendente da ATM porta alla fosforilazione di ASF1A sul residuo Serina-166 (S166). Questa modifica è determinante per potenziare l'interazione tra ASF1A e la proteina scaffold MDC1, facilitando la cascata di segnalazione ATM-H2AX-MDC1-RNF8. Tale complesso promuove l'ubiquitinazione degli istoni e il successivo reclutamento di 53BP1, indirizzando efficacemente la cellula verso l'NHEJ. Parallelamente, sempre in risposta al danno, l'attivazione di CHK1 mediata da ATM porta alla fosforilazione della chinasi TLK (Tousled-like kinase) sul residuo Serina-695. Questo passaggio è vitale perché CHK1, attraverso questa modifica inibitoria, modula

temporaneamente l'attività di TLK per regolare l'assemblaggio dei nucleosomi in coordinazione con i tempi di riparazione del DNA (Lee & Dutta, 2021). La corretta espressione di CHK1 è dunque un prerequisito fondamentale affinché il neurone possa proteggere i propri "siti fragili" genomici.

1.4.3 Regolazione dell'espressione e della stabilità di CHK1

Dato il suo ruolo pivotale, la concentrazione intracellulare di CHK1 è regolata con estrema precisione attraverso meccanismi post-traduzionali e post-trascrizionali. Il turnover di CHK1 è governato da un equilibrio dinamico tra ubiquitinazione e deubiquitinazione. In condizioni di omeostasi, l'autofosforilazione sul sito S296 stabilizza la proteina, mentre la fosforilazione indotta da ATR (S345) funge da segnale per la sua degradazione, garantendo la terminazione del segnale di checkpoint. Le E3 ligasi CUL4A/DDB1 e CUL1/FBXO6 mediano la poliubiquitinazione di CHK1, mentre deubiquitinasi come USP1, USP7 e l'Atassina-3 (ATX3) ne contrastano la degradazione (Zhang et al., 2009). In scenari di stress proteotossico, CHK1 può inoltre essere degradata via autofagia mediata da chaperone (CMA), evidenziando come la sua stabilità sia sensibile allo stato metabolico e proteostatico della cellula.

1.4.4 Regolazione di CHK1 tramite splicing alternativo

Il controllo dell'espressione di CHK1 trova un punto di regolazione critico nel processamento dell'RNA messaggero. In particolare, la produzione del trascritto funzionale è modulata dal meccanismo dello splicing alternativo, un processo orchestrato da una complessa rete di RBPs. Tra queste, un ruolo di primo piano è ricoperto da TRA2 (Transformer-2), che agisce riconoscendo e legandosi a specifiche sequenze ESE (Exonic Splicing Enhancers). L'interazione tra TRA2 e queste sequenze favorisce il corretto assemblaggio dello spliceosoma, garantendo l'inclusione degli esoni necessari alla sintesi della proteina full-length (CHK1-L). Tuttavia, alterazioni nella disponibilità di fattori di splicing o mutazioni nelle sequenze regolatorie possono deviare questo equilibrio, portando alla generazione dell'isoforma CHK1-S. Questa variante, priva dell'esone 3, si caratterizza per una troncatura all'N-terminale che ne altera profondamente la funzione. CHK1-S,

infatti, non solo perde l'attività chinasi canonica, ma agisce come un potente repressore dominante-negativo. Competendo con la forma full-length o interferendo con i suoi partner molecolari, CHK1-S ne annulla l'efficacia biologica. Senza la supervisione di CHK1 funzionale, la cellula perde la capacità di arrestare il ciclo in risposta al danno al DNA e tale difetto accelera l'accumulo di instabilità genomica (Pabla et al., 2012).

1.4.5 CHK1 e sopravvivenza neuronale

Sebbene CHK1 sia stata storicamente studiata in cellule in proliferazione, il suo ruolo nei neuroni post-mitotici è emerso come un pilastro della neuroprotezione. I neuroni corticali e i motoneuroni richiedono un'attività basale di CHK1 per mantenere l'integrità del DNA. L'inibizione chimica o genetica di questa chinasi induce infatti un accumulo spontaneo di danni come la fosforilazione di H2AX e l'attivazione della via apoptotica intrinseca (Ye & Blain, 2011). Nel contesto delle patologie neurodegenerative, la via ATR/CHK1 appare particolarmente vulnerabile. Proteine patologiche come FUS mutato, note per alterare il metabolismo dell'RNA e la risposta al danno al DNA, interferiscono pesantemente con l'omeostasi di CHK1. La sottoregolazione di CHK1, sia essa dovuta a difetti di splicing, ridotta stabilità proteica o alterata trascrizione, priva i motoneuroni di un meccanismo essenziale di difesa contro le lesioni del genoma. A differenza di quanto osservato in altre patologie neurodegenerative come l'Alzheimer, dove l'iperattivazione cronica di CHK1 può risultare tossica, nella SLA il deficit di CHK1 rappresenta un fattore critico di "perdita di funzione" (Modafferi et al., 2025). Senza livelli adeguati di CHK1, i motoneuroni perdono la capacità di coordinare efficacemente la riparazione NHEJ e di gestire lo stress replicativo residuo, accelerando il processo di neurodegenerazione e la perdita della funzione motoria.

1.5 La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)

1.5.1 SLA come proteinopatia

La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una patologia neurodegenerativa progressiva e fatale, la cui caratteristica distintiva è la perdita selettiva dei motoneuroni. Il processo degenerativo coinvolge sia i motoneuroni superiori, localizzati nella corteccia cerebrale, sia i motoneuroni inferiori, situati nel tronco encefalico e nelle corna anteriori del midollo spinale (**Fig. 7**) (Cleveland & Rothstein, 2001).

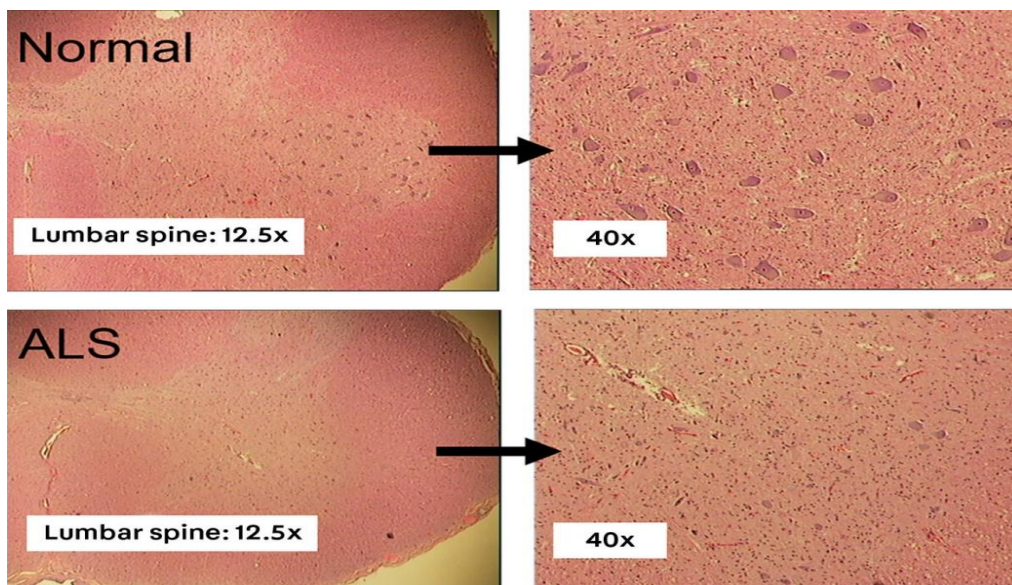


Figura 7: SLA: degenerazione dei corpi cellulari dei motoneuroni nel midollo spinale (Quinn & Elman, 2020).

Dal punto di vista clinico, questa compromissione si manifesta con una paralisi muscolare che, partendo spesso dai distretti distali degli arti, progredisce fino a colpire le funzioni vitali della deglutizione e della respirazione (Hardiman et al., 2017). Sul piano epidemiologico, la SLA viene classicamente suddivisa in due forme principali: la SLA sporadica (sSLA), che costituisce circa il 90-95% dei casi e si manifesta in assenza di una storia familiare nota, e la SLA familiare (fSLA), che riguarda il restante 5-10% dei pazienti ed è legata a mutazioni genetiche ereditarie (Taylor et al., 2016). Nonostante l'etiologia della forma sporadica resti ancora oggetto di intensi studi, l'ipotesi prevalente suggerisce che la patogenesi derivi da una complessa interazione tra predisposizione genetica e fattori di rischio ambientali (Brown & Al-Chalabi, 2017). La SLA presenta

un'estrema eterogeneità molecolare che include lo stress ossidativo, l'eccitotossicità mediata dal glutammato e i difetti nel metabolismo dell'RNA. Inoltre, l'instabilità genomica derivante dall'accumulo di danni al DNA sta emergendo come un fattore critico nella vulnerabilità neuronale, agendo spesso in sinergia con il fallimento della proteostasi. Infatti, un pilastro fondamentale nella comprensione della SLA è la sua natura di proteiopatia. La malattia è infatti caratterizzata da un catastrofico fallimento dell'omeostasi proteica, che culmina nell'accumulo di aggregati proteici insolubili all'interno del citoplasma neuronale. La formazione di questi aggregati proteici è direttamente riconducibile a mutazioni nei geni che codificano per proteine chiave (Blokhuys et al., 2013). Fra quelle più importanti dal punto di vista clinico ricordiamo le mutazioni nei geni SOD1, TARDBP (che codifica per TDP-43) e FUS. Tali mutazioni alterano la struttura primaria di queste proteine, rendendole inclini al misfolding e alla successiva aggregazione insolubile. Queste inclusioni non solo sottraggono proteine essenziali alle loro normali funzioni fisiologiche, ma esercitano spesso un effetto citotossico diretto, interferendo con i sistemi di degradazione cellulare e contribuendo alla degenerazione del motoneurone. In condizioni fisiologiche, la cellula dispone di sofisticati meccanismi di sorveglianza per prevenire l'accumulo di proteine aberranti, basati sull'azione dei chaperone molecolari e sui sistemi di degradazione, quali la via ubiquitina-proteasoma (UPS) e l'autofagia (Ciechanover & Kwon, 2015). Tuttavia, nel contesto della malattia, questi sistemi di controllo qualità risultano gravemente compromessi o saturati per cui gli aggregati proteici continuano a persistere e accumularsi nel citoplasma.

1.5.2 FUS e TDP-43: funzioni biologiche nel metabolismo dell'RNA e DNA e loro coinvolgimento nella SLA

Le proteine TDP-43 (prodotta dal gene TARDBP) e FUS appartengono alla famiglia delle ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP). Caratterizzate da un'alta conservazione evolutiva e un'espressione ubiquitaria, queste proteine risiedono fisiologicamente nel nucleo, dove coordinano la complessa architettura del trascrittoma cellulare. Come evidenziato da recenti analisi CLIP-seq, TDP-43 interagisce con oltre 6000 bersagli di RNA, mostrando un'affinità specifica per le regioni ricche in sequenze UG; attraverso questo vasto network, la proteina regola

processi cruciali che spaziano dallo splicing alternativo alla modulazione della stabilità dei trascritti (Polymenidou et al., 2011; Ayala et al., 2011). In modo analogo, FUS supervisiona l'espressione di geni fondamentali per l'omeostasi cellulare, inclusi SOD1 (Superossido Dismutasi 1), enzima cardine nella difesa dallo stress ossidativo tramite la dismutazione dei radicali superossido, e i membri della famiglia delle ubiquiline (UBQLN1/2). Queste ultime svolgono un ruolo insostituibile nel sistema proteostatico, agendo come scivoli molecolari che indirizzano le proteine danneggiate o mal ripiegate verso il proteasoma per la loro degradazione. Sotto il profilo strutturale, sia TDP-43 che FUS presentano domini a bassa complessità (LCD) intrinsecamente disordinati con proprietà prioniche (**Fig. 8**). Sebbene tali domini siano necessari per le funzioni fisiologiche, essi conferiscono alle proteine un'intrinseca propensione all'auto-aggregazione. La patogenesi della SLA è spesso innescata da mutazioni localizzate nel dominio C-terminale di TDP-43 o nel segnale di localizzazione nucleare (NLS) di FUS, che ne alterano la corretta compartimentalizzazione nucleo-citoplasmatica. Questo squilibrio determina un progressivo sequestro delle proteine in inclusioni citoplasmatiche insolubili, un fenomeno riscontrato nel 97% dei casi di SLA per quanto concerne TDP-43 (Neumann et al., 2006) e nelle varianti familiari precoci per FUS (Nedelsky & Taylor, 2022).

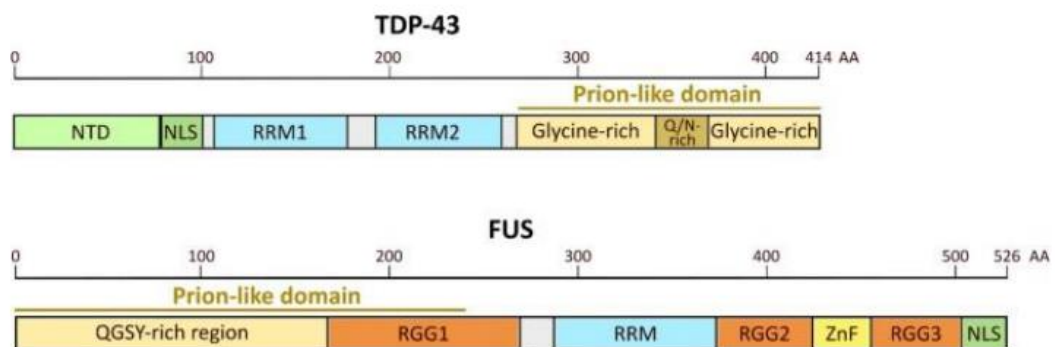


Figura 8: Rappresentazione schematica della struttura molecolare di TDP-43 e FUS. (Rummens e Da Cruz, 2025)

La perdita della funzione nucleare e il concomitante guadagno di tossicità citoplasmatica scatenano un disordine sistemico nel metabolismo dell'RNA, influenzando la trascrizione, lo splicing, il trasporto dei messaggeri e la maturazione di specie non codificanti come miRNA e lncRNA (Fig. 9).

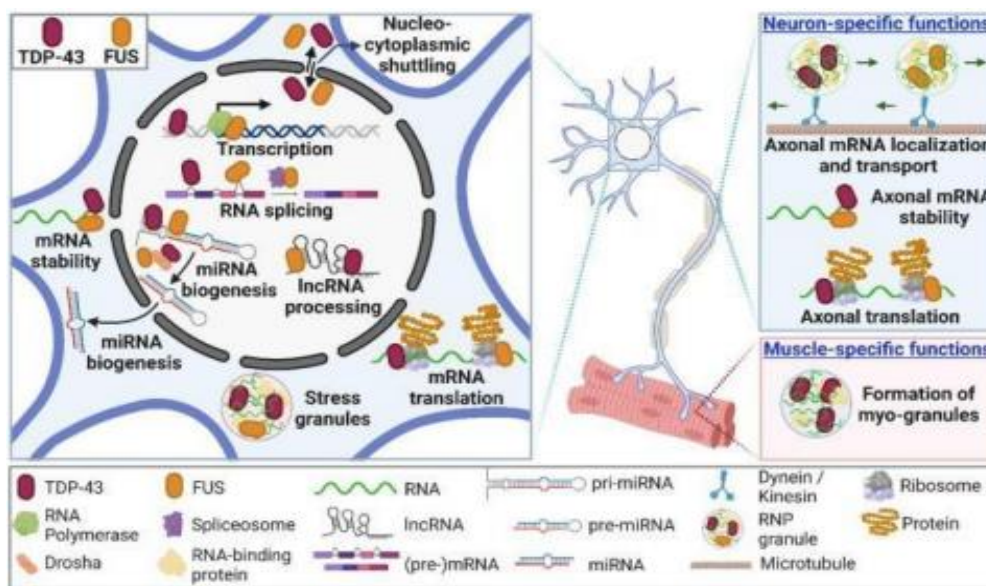


Figura 9: Funzioni fisiologiche di TDP-43 e FUS come regolatori del metabolismo dell'RNA in modo cellula-specifico e compartimento-specifico. (Rummens e Da Cruz, 2025)

Studi di proteomica hanno rivelato che questo network è estremamente interconnesso: TDP-43 e FUS interagiscono non solo con i macchinari di traduzione, ma anche tra loro, un'associazione che appare patologicamente intensificata in presenza di varianti mutate di TDP-43. Per contrastare potenziali sbilanciamenti, la cellula implementa rigorosi circuiti di autoregolazione: TDP-43 modula i propri livelli tramite un circuito negativo che coinvolge la regione 3'UTR del trascritto TARDBP, mentre FUS sfrutta meccanismi di ritenzione intronica (specificamente degli introni 6 e 7) per controllare la propria espressione. Oltre alle funzioni legate all'RNA, ricerche emergenti pongono l'accento sul ruolo di TDP-43 e FUS nella salvaguardia della stabilità genomica. È stato osservato che la loro aggregazione interferisce direttamente con la via di

risposta al danno del DNA, influenzando la stabilità di fattori chiave come la chinasi CHK1. In linea con queste evidenze, le indagini condotte presso il nostro laboratorio, confluite in uno studio recentemente accettato dalla rivista *Cell Death and Disease*, dimostrano che la formazione di inclusioni citoplasmatiche (CI) di FUS e TDP-43 induce un forte stress genotossico. Tale effetto è mediato da una drastica riduzione dei livelli nucleari di CHK1, proteina indispensabile per il riparo delle rotture del doppio filamento tramite il NHEJ e per la gestione dello stress replicativo, come verrà dettagliato nella sezione Risultati.

1.6 La tecnologia SINEUP

I SINEUP (SINE element-containing-antisense-long non-coding RNA-UPregulators) rappresentano una categoria innovativa di RNA lunghi non codificanti (lncRNA) sintetici, ingegnerizzati per aumentare i livelli proteici di geni target in modo altamente specifico. A differenza degli approcci basati sull'espressione genica tradizionale, i SINEUP non agiscono sulla trascrizione, ma potenziano l'efficienza della traduzione dell'mRNA endogeno già presente nella cellula. In realtà questi RNA non codificanti sono stati inizialmente identificati come regolatori naturali della traduzione e successivamente ingegnerizzati come strumenti sintetici modulari. I SINEUP sono stati scoperti studiando il gene murino *Uchl1*, gene che codifica per un enzima deubiquitinasi indispensabile per la sopravvivenza neuronale. I ricercatori notarono che esisteva un RNA antisenso naturale (AS-*Uchl1*) che, invece di spegnere il gene, come fanno molti antisenso, ne aumentava la traduzione in proteina. Questo RNA naturale conteneva una sequenza ripetitiva chiamata SINEB2, un elemento trasponibile (Carrieri et al., 2012).

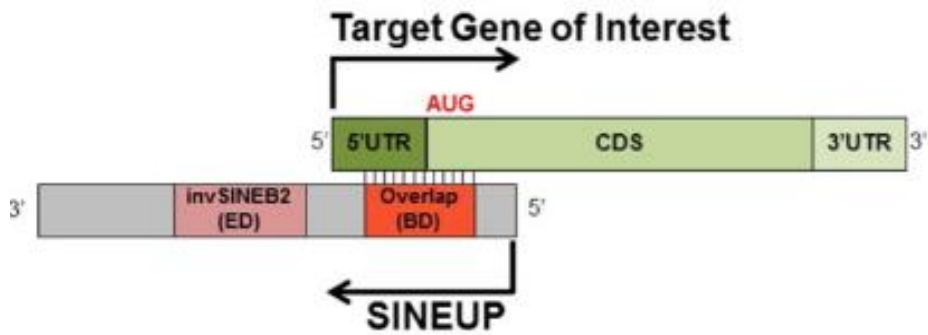


Figura 10: Rappresentazione schematica della struttura molecolare del SINEUP (Zucchelli et al., 2016)

La loro architettura molecolare è definita da una struttura modulare composta da due domini funzionali essenziali: Il primo è il Binding Domain (BD), rappresenta la porzione antisense del SINEUP, costituita da una sequenza specifica complementare alla regione iniziale dell'mRNA target che si appaia in corrispondenza del 5'UTR del RNA messaggero. Questa interazione garantisce l'estrema selettività della tecnologia verso il trascritto d'interesse. Il secondo dominio invece è l'Effector Domain (ED), che rappresenta il dominio funzionale e che deriva da una sequenza ripetitiva di tipo SINE (SINEB2). Una volta che il BD ha riconosciuto l'mRNA target, l'ED richiama i ribosomi e altri fattori di inizio della traduzione, forzandoli a leggere l'mRNA più velocemente o più frequentemente (**Fig. 10**) (Zucchelli et al., 2016). L'aspetto rivoluzionario di questa tecnologia risiede nel suo meccanismo post-trascrizionale: il SINEUP lavora solo sull'mRNA prodotto naturalmente dalla cellula, permettendo un potenziamento proteico più fisiologico e controllato rispetto alla sovraespressione genica classica (**Fig. 11**).

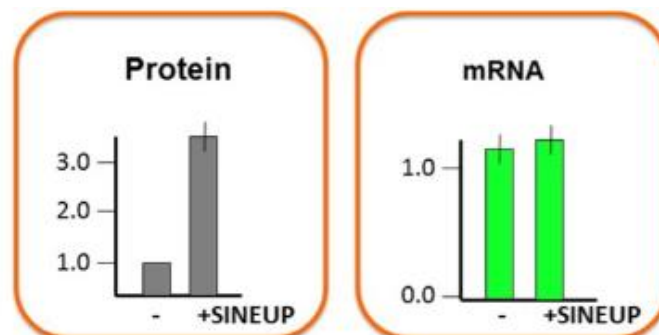


Figura 11: Incremento dei livelli di mRNA mediato da SINEUP (Zucchelli et al., 2016)

1.6.1 Potenziale terapeutico dei SINEUP nella neurodegenerazione

Abbiamo ipotizzato che l'impiego della tecnologia SINEUP potesse rappresentare una strategia estremamente promettente per affrontare uno dei nodi critici della patogenesi della SLA, da noi identificato e dimostrato in uno studio appena pubblicato nel laboratorio in cui ho svolto la tesi (Modafferi S. et al CellDeath&Dis 2026). Come descritto in dettaglio nella sezione Risultati, abbiamo dimostrato che la presenza di inclusioni citoplasmatiche di proteine mutate, quali FUS-P525L o di TDP-43 anche nella forma Wilde-Type, innesca una drastica riduzione dei livelli nucleari della proteina CHK1, privando i motoneuroni di una importante difesa contro lo stress genotossico indotto dalle inclusioni stesse. Abbiamo dimostrato che la riduzione dei livelli di CHK1 non dipende da una ridotta espressione genica né dà un alterato splicing alternativo della stessa (Modafferi S. et al CellDeath&Dis 2026). Nelle cellule colpite da inclusioni citoplasmatiche di FUS mutato infatti i livelli di mRNA per CHK1 non sono alterati così come le varianti di splicing. Abbiamo potuto dimostrare però i livelli di CHK1 si riducono progressivamente a causa della degradazione della proteina tramite il proteasoma. L'inibizione dell'attività del proteasoma, infatti, ripristina i normali livelli di CHK1. In questo scenario, i SINEUP offrono un vantaggio terapeutico unico rispetto ai metodi di gene-therapy tradizionali poiché agiscono esclusivamente sul pool di mRNA endogeno di CHK1. L'utilizzo di un SINEUP specifico per CHK1 potrebbe forzare il macchinario traduzionale solo su questo trascritto così da compensare la riduzione dei livelli proteici di CHK1, riportando i livelli di questa chinasi a livelli fisiologici sufficienti per garantire un efficace segnalazione e riparazione delle lesioni sul DNA.

2. Scopo del Lavoro

La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una patologia neurodegenerativa devastante, caratterizzata dalla perdita progressiva dei motoneuroni. Recenti evidenze scientifiche indicano che l'instabilità genomica, derivante da un accumulo di danni al DNA non riparati, gioca un ruolo determinante nella patogenesi della malattia. In particolare, i neuroni, essendo cellule post-mitotiche ad alto consumo metabolico, sono costantemente esposti a stress ossidativo e richiedono sistemi di riparazione del DNA estremamente efficienti per prevenire la morte cellulare. La SLA è caratterizzata, in una frazione significativa dei casi familiari, dalla mutazione del gene FUS causanti la formazione di aggregati citoplasmatici della proteina FUS mutata. Mentre nella maggior parte dei casi sporadici si riscontra l'aggregazione citoplasmatica della proteina TDP-43. FUS e TDP-43 sono proteine nucleari che legano sia RNA che DNA e svolgono molteplici funzioni che vanno dalla trascrizione, al regolamento dello splicing e al trasporto dei trascritti. La loro aggregazione nel citoplasma esercita un duplice effetto: da un lato determina il loro sequestro negli aggregati proteici, provocando una perdita di funzione nucleare, dall'altro un guadagno di funzione citoplasmatica che innesca una cascata di eventi tossici che compromettono l'omeostasi cellulare. Un nodo critico identificato in questo contesto nel nostro laboratorio, è la down-regolazione di CHK1, una chinasi essenziale del checkpoint da danno al DNA e richiesta per la riparazione del danno al DNA anche in cellule non proliferanti e in modo particolare nei neuroni. Infatti dati appena pubblicati dal nostro laboratorio (Modafferi S. et al CellDeath&Dis 2026) hanno evidenziato che i livelli proteici di CHK1 risultano ridotti nelle cellule contenenti aggregati citoplasmatici di FUS mutato o TDP-43. Questa correlazione è stata osservata anche in motoneuroni derivati da cellule iPSC di pazienti SLA, suggerendo che la riduzione di CHK1 possa aumentare la vulnerabilità dei neuroni al danno genomico. Tuttavia, i livelli di mRNA di CHK1 non risultano significativamente alterati nelle cellule con aggregati di FUS e TDP-43, suggerendo un possibile meccanismo di regolazione post-trascrizionale a livello di stabilità proteica. Poiché CHK1 è stato recentemente coinvolto nella riparazione delle lesioni a doppio filamento in cellule post mitotiche differenziate, la sua carenza ci porta all'ipotesi che tale

riduzione sia alla base della neurodegenerazione. Per contrastare questa down-regolazione, il presente progetto si avvale della tecnologia dei SINEUP. A differenza delle tecniche di sovra-espressione genica tradizionale, i SINEUP sono RNA non codificanti sintetici in grado di aumentare la traduzione del mRNA target endogeno senza alterarne i livelli di trascrizione. Questo approccio permette un potenziamento della traduzione più fisiologico e controllato, agendo direttamente sull'interazione tra RNA messaggero e macchinario traduzionale. L'obiettivo centrale di questa tesi è validare l'efficacia di diverse sequenze SINEUP disegnate con complementarità per il trascritto di CHK1 come strategia terapeutica per ripristinare i corretti livelli proteici di CHK1 e mitigare l'instabilità genomica in cellule umane con aggregati di FUS mutato, coltivate *in vitro*. A tal scopo ho eseguito una co-trasfezione con due plasmidi: uno esprime FUS mutato (FUS-P525L) per mimare il contesto patologico e indurre lo stress indotto dagli aggregati di FUS, e un altro esprime diversi SINEUP specifici per CHK1 per testare il recupero dei livelli fisiologici di CHK1 in cellule HeLa. Ho poi effettuato quantificazioni con l'impiego del software di imaging CellProfiler dei livelli nucleari di CHK1 tramite analisi automatizzate dell'intensità del segnale di CHK1 ottenuto tramite immunofluorescenza e microscopia wide-field in cellule con aggregati di FUS mutato. Il lavoro infine mira a verificare se il ripristino dei livelli proteici di CHK1 mediato dall'espressione dei SINEUP, produca una riduzione dei marcatori di danno al DNA, come γ H2AX, correlato ad un aumento del numero dei foci di riparazione positivi per 53BP1, rivelatori di un aumento della capacità delle cellule di riparare lesioni genomiche. L'originalità di questo approccio risiede nell'utilizzo di una tecnologia a RNA innovativa che stimola la traduzione della chinasi CHK1 ibridandosi al suo mRNA target endogeno. Se il nostro approccio terapeutico venisse validato anche *in vivo* in modelli preclinici di SLA, i risultati di questo lavoro fornirebbero una "proof-of-concept" per lo sviluppo di nuove terapie basate su RNA volte a preservare l'integrità del genoma nei pazienti affetti da SLA associata a mutazioni di FUS.

3. Materiali e Metodi

Coltura cellulare

Le linee cellulari sono state autenticate mediante profilazione STR (sistema GenePrint, Promega) e testate per la contaminazione da micoplasma. Le cellule HeLa (ATCC) e HT-22 sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) integrato con 1% L-glutamina, 1% penicillina/streptomina e 10% di siero bovino fetale (FBS). Dove indicato, le cellule sono state trattate con 50 ng/mL di neocarzinostatina (NCS) (Sigma, #N9162) per 20 minuti a 37°C per indurre la formazione di DSB. Per l'inibizione del proteasoma in cellule che sovraesprimono FUS mutante, le cellule sono state trattate con 5 μ M di MG132 (Millipore, #474787-10MG) dissolto in DMSO per 20 ore. Per l'inibizione del proteasoma in cellule HeLa non trasfettate, le cellule sono state trattate con 5 μ M di MG132 per 24 e 48 ore. Per inibire l'autofagia mediata da chaperone, le cellule sono state trattate con 20 μ M di VER-15508 (Sigma Aldrich, #SML0271-5MG) 48 ore prima della trasfezione plasmidica. L'inibitore è stato lasciato nel terreno di coltura fino alla fine dell'esperimento (per un totale di 72 ore di trattamento). Dove indicato, le cellule sono state trattate con 100 μ g/mL di cicloexamide per il punto temporale indicato dopo la trasfezione plasmidica. I progenitori dei motoneuroni umani (hMNP) sono stati derivati da un individuo di controllo o da un paziente sALS. In breve, le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state raccolte da un paziente sALS o da un individuo sano. Successivamente, sono state riprogrammate in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e differenziate prima in cellule staminali neurali (NSC) e poi in MNP (Scarian et al., 2022). Le cellule staminali embrionali di topo (mESC) sono state coltivate e differenziate in motoneuroni spinali (MN) come descritto in (D'Ambra et al., 2021).

Trasfezione con plasmidi

Per generare il sistema split di FUS, il FUS WT o P525L sono stati clonati in pCS2plus-mCerulean 156-239-GGGS (Addgene, #162616) e pCS2plus-mVenus1-155-GGGS (Addgene, #162610) (Don et al., 2021; Modafferi et al.,

2025). Quando sono stati trasfettati i vettori dei sistemi split di FUS, 0,7 µg di ogni vettore sono stati trasfettati utilizzando Lipofectamine TM 2000 (Invitrogen, #11668-019) secondo le 35 istruzioni del produttore. pCS2plus-mCerulean 156-239-GGGS e pCS2plusmVenus1-155-GGGS sono stati donati da Marco Morsch (Don et al., 2021). Per sovraesprimere CHK1, 0,5 µg di FUS P525L mVenus, 0,5 µg di FUS P525L mCerulean e 1 µg di pcDNA4-Chk1-Flag (Addgene, #22894, un dono del laboratorio di Aziz Sancar (Unsal-Kaçmaz et al., 2007)) o 1 µg di pcDNA3.1+ (Thermo Fisher Scientific) (usato come vettore vuoto (EV)) sono stati trasfettati in ogni pozzetto. Per il sorting, le cellule sono state piastrate in una piastra da 60 mm per condizione. Le reazioni di trasfezione sono state scalate raddoppiando ogni volume. In questo caso, pCS2plus-mCerulean 156-239-GGGS è stato usato come EV perché la trasfezione di entrambi pCS2plus-mCerulean 156-239-GGGS e pCS2plus-mVenus1-155-GGGS risulta in quasi tutte le cellule che diventano positive, impedendoci così di poter smistare le cellule. Per la sovraespressione di TDP-43 WT e mutante, 1 µg di ogni plasmide è stato trasfettato come descritto sopra. Il vettore codificante per TDP-43 WT è stato un gentile dono del Dr. Emanuele Buratti su concessione del Dr. Petrucelli Leonard (Mayo Clinic, Jacksonville, Florida), il plasmide che esprime TDP-43 M337V è stato gentilmente fornito dal Prof. Eran Hornstein su concessione del Prof. Dr. Markus Landthaler (Max Delbrück Center for Molecular Medicine-MDC, Berlino, Germania), mentre i plasmidi codificanti per A382T TDP-43 e I383V TDP-43 sono stati generati internamente tramite mutazione di un singolo nucleotide di un plasmide che esprime WT-TDP-43. Per la sovraespressione di CHK1 e WT TDP-43, 0,5 µg di WT TDP-43 e 0,5 µg di pcDNA4-Chk1-Flag o 0,5 µg di EV sono stati trasfettati in ogni pozzetto come descritto sopra. Per l'induzione di FUS P525L 1,5 µg di pcDNA4-FUS P525L-Flag in ogni pozzetto come descritto sopra. Per l'espressione dei SINEUP (disegnati e forniti dal gruppo di Stefano Gustincich, Istituto Italiano di Tecnologia) 1,5 µg di pLV_miniED_hSCRhigh, 1,5 µg di pLV_miniED_hCHK101, 1,5 µg di pLV_miniED_hCHK102, 1,5 µg di pLV_miniED_hCHK103 come descritto sopra.

| SINEUP | Binding Domain Sequence (5' → 3') | Target Gene |
|------------------------|--|--------------------|
| hSCR (Scramble) | AACGCGTCCCCCGTGCCGCCTAGTCACCGCCTTCCGAGCTCTAA | None (Control) |
| hCHK1_01 | CCATGACTCCACCGAGCACCTCGGCGGACTGTCCTTTGCCACC | hCHK1 (5'UTR) |
| hCHK1_02 | CCATTATTTACTGGAGAAAAGTCCAAATTGGAATGAATGTGCTT | hCHK1 (5'UTR) |
| hCHK1_03 | GCATACCGTAAATAGGTTCAAATAAATAAAACAGGTTTGAATTT | hCHK1 (5'UTR) |

Tabella 1: *Elenco dei SINEUP utilizzati*

Trasfezione siRNA

Gli siRNA sono stati trasfettati ad una concentrazione di 20 nM finale utilizzando Lipofectamine RNAiMax TM (Invitrogen, # 13778-075). I seguenti siRNA sono stati usati in questo studio: siControllo-siCTRL (ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1, Dharmacon, # D001810-01-20), siCHK1 (10 nM Hs_CHEK1_7 FlexiTube siRNA, Qiagen, # SI00299859; 10 nM Hs_CHEK1_8 FlexiTube siRNA, Qiagen, # SI00605094). siTRA2 (ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon),.

Immunofluorescenza (IF), acquisizione delle immagini al microscopio a fluorescenza e quantifica del segnale tramite CellProfiler

Nelle cellule HeLa e HT-22, l'IF è stata eseguita come precedentemente descritto in (Modafferi et al., 2025). Nelle human Motor Neuron Progenitor (hMNP), l'IF è stata eseguita come descritto in (Scarian et al., 2022). In breve, i vetrini coprioggetto sono stati fissati in 4% PFA per 15 minuti a RT (temperatura ambiente), lavati due volte in 1x PBS e permeabilizzati in 0,2% Triton per 10 minuti a RT. Per il bloccaggio, i vetrini sono stati incubati in 1x PBG (PBS, BSA 1%, gelatina di pesce 0.2%) per un'ora a RT. Le miscele di anticorpi primari sono state preparate in 1x PBG e incubate durante la notte a 4°C in camera umida. Il

giorno successivo l'IF è stata eseguita come descritto in (Modafferi et al., 2025). I progenitori dei moto neuroni murini murine Motor Neuron (mMN) sono state coltivate per 2 giorni dopo la dissociazione dei corpi embrioidi e sono state fissate in 4% PFA (Electron Microscopy Sciences), 4% saccarosio/5 mM MgCl₂/1x PBS per 30 min a 4°C. Le cellule sono state poi lavate due volte con 4% saccarosio/1x PBS. In seguito ai passaggi di deidratazione per la conservazione a breve termine con etanolo a temperatura ambiente (50%, 70%), le cellule sono state conservate a 4°C in 70% etanolo. Le cellule sono state reidratate con 50% etanolo seguito da un'incubazione di 10 min con 1x PBS. Le cellule sono state permeabilizzate con 0,25% Triton X-100/1x PBS per 20 min a RT. Per il bloccaggio i vetrini sono stati incubati in 2,5% siero di asino, 2,5% siero di capra in 1x PBS per 45 min a RT. Gli anticorpi primari anti-CHK1 (1:200) e anti-beta III tubulina (1:200) sono stati incubati durante la notte a 4°C. Gli anticorpi secondari donkey anti-mouse (generati in scimmia contro anticorpi murini) Alexa Fluor Plus 647 e donkey anti-chicken (generati in scimmia contro anticorpi di pollo) Alexa Fluor 488 sono stati diluiti 1:200 in 2,5% siero di asino, 2,5% siero di capra, 1x PBS e incubati per un'ora a RT. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio a scansione laser confocale lineare (Zeiss LSM 800) equipaggiato con quattro laser [laser a diodo 405 nm (5 mW), laser a diodo 488 nm (10 mW), laser a diodo 561 nm (10 mW) e laser a diodo 640 nm (5 mW)], due Master gain ad alta sensibilità e un obiettivo 63×/1.4NA. Questo microscopio era gestito dal software Zeiss Zen Blue 2.6. E' stato utilizzato anche il microscopio a fluorescenza Olympus, utilizzando l'obiettivo 63× e gestito tramite il software di acquisizione MetaMorph. Per quantificare il numero di foci per nucleo o l'intensità nucleare media per ogni marcatore, è stato utilizzato il software CellProfiler v2.1.1 (Carpenter et al., 2006). Questo software permette all'utente di impostare pipeline che consentono una quantificazione oggettiva, automatizzata e riproducibile dei quantitativi di proteine nucleare e la loro distribuzione diffusa o in complessi focalizzati sulla lesione (Foci di DNA damage response) e altri fenotipi morfologici cellulari. L'intensità nucleare media è stata normalizzata sulla condizione di controllo (EV o trattata con veicolo) utilizzando Microsoft Excel.

Cell sorting

I plasmidi codificanti per FUS WT o mutante P525L fusi con il frammento proteico N-terminale della YFP mVenus (mVen) o con il frammento proteico C-terminale della CFP mCerulean (mCer) sono stati co-trasfettati. In seguito all'interazione naturale tra due proteine FUS, la proteina fluorescente viene ricostituita, emettendo fluorescenza nel nucleo nelle cellule che sovraesprimono FUS WT o inclusioni citoplasmatiche (CI) fluorescenti nelle cellule che sovraesprimono la proteina mutante. Il giorno dopo la trasfezione plasmidica, le cellule sono state lavate due volte con 1x PBS, delicatamente staccate tramite raschiamento e raccolte in 1 mL di tampone di sorting (2 mM EDTA, 20 mM HEPES in acqua distillata pH 7,3 in 1x PBS) per condizione, raccolte in provette da 15 mL e poste in ghiaccio. Successivamente, i campioni sono stati trasferiti in una provetta Falcon da 5 mL dotata di una rete di nylon da 35 μm (Corning, #3532235) e vortexati accuratamente per dissociare eventuali cluster cellulari che potrebbero essersi formati. Infine, i campioni sono stati analizzati su un S3e Cell sorter (BioRad). Innanzitutto, sono state analizzate 30.000 cellule trasfettate con EV per impostare i gate. Successivamente, le cellule che sovraesprimevano FUS WT sono state selezionate in modalità "purity" per ottenere una popolazione pura di cellule con nuclei fluorescenti, seguite dal sorting delle cellule che sovraesprimevano FUS P525L in modalità "purity" per isolare una popolazione pura di cellule contenenti CI fluorescenti. Di conseguenza, l'analisi dei livelli di mRNA di CHK1 è stata condotta in popolazioni pure di cellule che sovraesprimevano o FUS WT (nel nucleo) o FUS mutante (CI nel citoplasma). Dopo il cell sorting, le cellule sono state centrifugate a 4°C per 1,5 minuti alla massima velocità e il surnatante è stato scartato. A questo punto, le cellule sono state lisate per l'estrazione dell'RNA o congelate a -80 °C per uso futuro.

Western Blotting

Le cellule sono state lisate in un volume appropriato di tampone Laemmli 1x (2% SDS, 5% glicerolo, 60 mM Tris-HCl pH 6,8 in acqua deionizzata) mediante raschiamento, bollite per 5 minuti a 95°C e passate con una siringa da 5 a 10 volte per rompere meccanicamente la cromatina finché non sono diventate liquide. Per

l'estrazione delle proteine da campioni di midollo spinale murino, circa 25 mg di tessuto sono stati lisati in 250 μ L di tampone Laemmli contenente inibitore delle proteasi 1x. Ogni campione è stato poi sminuzzato con un pestello (potter) e incubato 38 in ghiaccio per 30 minuti. Dopo l'incubazione, sono stati passati con una siringa e centrifugati a 1300 rpm per 10 minuti a 4°C. Successivamente, il surnatante è stato raccolto e quantificato. I lisati proteici ottenuti sono stati quantificati utilizzando il Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23227) secondo le istruzioni del produttore. Dopo la quantificazione, 25 μ g di lisato proteico sono stati miscelati con 0,1M DTT e 0,01% di blu di bromofenolo, bolliti per 5 minuti a 95°C e caricati su un gel mini-PROTEAN TGX stain-free (Biorad, #4568095), insieme a 10 μ L di Precision Plus Protein Standard (Biorad, #161-0374). La corsa del gel è stata effettuata a 60 V per lo stacking gel e a 100 V per il resolving gel in tampone 1x Tris/Glicina/SDS (TGS) (25 mM Tris, 250 mM glicina e 0,1% SDS). Successivamente, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Trans-Blot® Turbo Transfer Pack, Biorad, #1704158) utilizzando il Trans-Blot Turbo Transfer System v1.02 (Biorad) con un voltaggio di 25V per 12 minuti. Il bloccaggio è stato eseguito in 5% latte scremato in 1x TBS-T (tampone TBS (10 mM TRIS-HCl 1M pH 7,5, 150 mM NaCl) + 0,1% Tween-20) per un'ora a RT sotto agitazione. Gli anticorpi primari sono stati preparati in 5% latte scremato e incubati durante la notte a 4°C sotto agitazione. Il giorno seguente, le membrane sono state lavate tre volte in TBS-T per 5 minuti ciascuna e incubate con anticorpi secondari preparati in 5% latte scremato in 1x TBST per un'ora a RT sotto agitazione. Dopo l'incubazione con gli anticorpi secondari, le membrane sono state lavate tre volte in 1x TBS-T per 15 minuti ciascuna sotto agitazione e incubate con il substrato HRP (Luminata Classico (Millipore, #WBLUC0500) o Luminata Crescendo (Millipore, #WBLUR0500)) per due minuti a RT al buio. Le membrane sono state infine sviluppate utilizzando un ChemiDoc MP Imaging System (Biorad). Per una lista completa degli anticorpi usati in questo studio vedere tabella 1. L'analisi densitometrica è stata eseguita utilizzando il software ImageLab (Biorad).

| Target | Host | Dilution | Application | Manufacture | Cat. N. |
|-----------------------------|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Primary Antibodies | | | | | |
| 53BP1 | goat | 1:1000 | IF | Bethyl | A303-906° |
| 53BP1 | rabbit | 1:1000 | IF | Bethyl | A300-272° |
| CHK1 | mouse | 1:500 | IF | Cell Signaling | 2360 |
| CHK1 | mouse | 1:200 | IF mMNs | Cell Signaling | 2360 |
| CHK1 | rabbit | 1:10 000 | WB | Novus | NB100-464 |
| FK2 | mouse | 1:1000 | WB | Enzo-Life Sciences | ENZ ABS840 |
| FLAG | mouse | 1:800 | IF | Sigma | F1804 |
| FLAG | rabbit | 1:800 | IF | Cell Signaling | 14793S |
| FLAG | rabbit | 1:1000 | WB | Cell Signaling | 2368S |
| FUS | rabbit | 1:2000 | WB | Bethyl | A300-293° |
| GAPDH | mouse | 1:1000 | WB | Abcam | ab8245 |
| H3 | mouse | 1:2000 | WB | Active Motif | 39064 |
| TDP-43 | goat | 1:200 | IF | Arigo | ARG64788 |
| TDP-43 | mouse | 1:100 | IF | Abcam | ab57105 |
| TIA-1 | rabbit | 1:300 | IF | Abcam | ab40693 |
| VINCULIN | mouse | 1:2000 | WB | Millipore | MAB3574 |
| β-tubulin III | chicken | 1:200 | IF mMNs | Sigma Aldrich | AB9354 |
| γH2AX | mouse | 1:1000 | IF | Millipore | 05-636 |
| γH2AX | rabbit | 1:500 | IF | Cell Signaling | 9718 |
| Secondary Antibodies | | | | | |

| | | | | | |
|---|---------------|----------|---------|------------------|------------|
| anti-chicken Alexa Fluor 488 | IgY donkey | 1:200 | IF mMNs | Sigma Aldrich | SAB4600031 |
| Anti-goat Alexa Fluor 488 | IgG donkey | 1:400 | IF | Abcam | ab150129 |
| anti-goat Alexa Fluor 647 | IgG donkey | 1:400 | IF | Abcam | ab150131 |
| anti-goat Alexa Fluor 555 | IgG donkey | 1:400 | IF | Campi/Invitrogen | A21432 |
| anti-mouse Alexa Fluor 488 | IgG donkey | 1:400 | IF | Abcam | ab150105 |
| anti-mouse Alexa Fluor 555 | IgG donkey | 1:400 | IF | Invitrogen | A31570 |
| Anti-mouse Alexa Fluor 647 | IgG donkey | 1:200 | IF mMNs | Thermo Fisher | A32787 |
| Anti-mouse IgG HRP | donkey | 1:10 000 | WB | Abcam | ab97030 |
| Anti-rabbit Alexa Fluor 488 | IgG donkey | 1:400 | IF | Abcam | ab150073 |
| anti-rabbit Alexa Fluor 647 | IgG donkey | 1:400 | IF | Abcam | ab150075 |
| anti-rabbit Alexa Fluor 555 | IgG donkey | 1:400 | IF | Invitrogen | A31572 |
| Anti-rabbit IgG HRP | donkey | 1:10 000 | WB | Abcam | ab97064 |

Tabella 2: *Lista degli anticorpi primari e secondari usati*

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita impiegando il kit RNeasy Mini (Qiagen, #74106) in conformità alle direttive del produttore. Per eliminare eventuali contaminazioni da DNA genomico, i campioni sono stati trattati con il kit TURBO DNA-free (Invitrogen, #AM1907). La purezza e la concentrazione dell'RNA isolato sono state determinate mediante analisi spettrofotometrica Nanodrop (Thermo Scientific). Successivamente, 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando il sistema SuperScript IV First-Strand Synthesis (Invitrogen, #18091050). Per quanto concerne i progenitori dei motoneuroni umani (hMNP), l'estrazione dell'RNA è stata condotta come descritto da Scarian et al. (2022), procedendo alla retro-trascrizione di 500 ng di RNA.

Retro-trascrizione

Per la retro-trascrizione dell'RNA totale è stato utilizzato il SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, #18091050). È stata preparata una miscela contenente 1 µg di RNA, 2,5 ng/µL di random hexamers e 0,5 mM di dNTP, che è stata incubata per 5 minuti a 65°C. Nel frattempo è stata preparata una soluzione contenente 1x SSIV Buffer, 5 mM DTT, 2 U/µL di inibitore delle ribonucleasi e 10 U/µL di SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (SSIV RT). Al termine dell'incubazione, 7 µL della miscela contenente SSIV buffer, DTT, inibitore delle ribonucleasi e SuperScript IV reverse transcriptase sono stati aggiunti a ciascun campione. La retro-trascrizione è stata quindi eseguita secondo il seguente protocollo termico: 10 minuti a 23°C, 30 minuti a 50°C e 42, 10 minuti a 80°C. La quantificazione dell'espressione genica mediante RT-qPCR è stata effettuata utilizzando 15 ng di cDNA in combinazione con il reagente QuantiTect SYBR® Green (Qiagen, #204145) su piattaforma LightCycler® 480 II (Roche). Il profilo termico ha previsto una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti, seguita da 45 cicli di amplificazione (95°C per 15 secondi, 60°C per 20 secondi e 72°C per 30 secondi) e una curva di melting finale (40°C > 90°C > 40°C).

Analisi dello Splicing Alternativo

L'analisi dello splicing alternativo nelle cellule HeLa (derivate da popolazioni pure ottenute tramite cell sorting) e negli hMNP è stata condotta utilizzando la DNA polimerasi GoTaq® G2 Flexi (Promega, #M7805) con una concentrazione di cDNA stampo pari a 1 ng/μL. Per lo studio dello splicing alternativo dell'esone 3 di CHK1, sono stati impiegati primer gene-specifici (0.2 μM) seguendo un protocollo termico di 35 cicli (denaturazione a 95°C per 15 secondi, annealing a 50°C per 20 secondi ed estensione a 74°C per 20 secondi). L'amplificazione del gene di riferimento GAPDH è stata eseguita con 1 μM di primer per 28 cicli (95°C per 15 secondi, 55°C per 15 secondi e 72°C per 10 secondi). I prodotti di PCR sono stati risolti mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% a 150V, caricando 8 μL di reazione addizionati con Blue/Orange Loading Dye 1x e utilizzando un DNA Ladder da 100 bp (Promega, #G210A) come riferimento dimensionale. La visualizzazione dei frammenti è stata effettuata tramite il sistema di acquisizione immagini GelDoc Go (Bio-Rad).

| Gene | 5'→3' sequence |
|------------------------|--------------------------|
| hCHK1_FW | CAACAAACCCCTCAAGAAAGG |
| hCHK1_REV | TGGATTGAATGTGCTTAGAAAATC |
| mChk1_FW | TTTCATGCAGAACCAGTTGATGT |
| mChk1_REV | CCTGACAGCTATCACTGGGC |
| hCHK1_exon3_FW | GACTGGGACTTGGTGCAAAC |
| hCHK1_exon3_REV | TGCCATGAGTTGATGGAAGA |
| GAPDH_FW | GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC |
| GAPDH_REV | TTACCAGAGTTAAAAGCAGCCC |

Tabella 3: *Lista dei primer utilizzati nello studio*

Modelli animali utilizzati nello studio

I topi sono stati stabulati presso lo Stabulario dell'Università di Tor Vergata (CIMETA) in conformità con le Raccomandazioni FELASA, le Linee Guida Europee per l'uso degli animali nella ricerca (2010/63/UE) e le Leggi Italiane (D.L. 26/2014). Sono stati mantenuti a una temperatura costante di 22 ± 1 °C, umidità relativa del 50% e un ciclo di luce di 12 ore (7:00–19:00), con libero accesso a cibo e acqua. Per garantire nutrizione e idratazione, è stato fornito cibo umido nelle gabbie in cui i topi mostravano segni di paralisi. Topi emizigoti Tg (Prnp-FUS) WT3Cshw/J che esprimono FUS wild-type umano (+/- hFUS, Jackson Laboratories), i quali non mostrano segni patologici, sono stati retroincrociati per ottenere topi omozigoti (+/+ hFUS), che mostrano fenotipi di SLA e morte precoce a 38-40 giorni di età. La genotipizzazione è stata eseguita come precedentemente descritto (Rossi et al., 2025). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in conformità con le linee guida ARRIVE, le Linee Guida Europee (2010/63/UE) e i requisiti delle leggi italiane (D.L. 26/2014), previa approvazione del Ministero della Salute italiano (numero di protocollo 383/2022 PR/G). È stato fatto ogni sforzo per minimizzare la sofferenza dei topi e ridurre il numero di animali utilizzati per ottenere risultati affidabili. Un totale di $n = 6$ topi è stato incluso nello studio.

Costruzione dei grafici e statistica dei dati

I grafici presentati in questo elaborato sono stati generati mediante il software GraphPad Prism 11, utilizzato anche per l'analisi statistica tramite il test One-way ANOVA. I grafici mostrati nelle figure 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28 e 39 sono super-plots in cui la media finale deriva dalle medie di esperimenti multipli indipendenti tra loro. Diversamente i dati dei grafici delle figure 32, 34 e 36 mostrano la statistica di 4 esperimenti indipendenti, in cui la media finale è stata calcolata sui valori delle singole cellule provenienti dalle 4 differenti repliche biologiche.

4. Risultati

Abbiamo recentemente pubblicato che la formazione di inclusioni citoplasmatiche di FUS e TDP-43 esercita un'azione genotossica, favorendo l'accumulo di rotture del doppio filamento del DNA attraverso una compromissione della cascata di trasduzione del segnale della risposta al danno al DNA o DDR (Modafferi et al., 2025). Tuttavia, i meccanismi molecolari specifici mediante i quali tali inclusioni interferiscono con la DDR impedendo una efficiente riparazione delle lesioni al DNA rimangono in gran parte da definire. Nel presente studio, abbiamo indagato nuovi pathway potenzialmente coinvolti in questo fenotipo, focalizzandoci sul ruolo della chinasi CHK1. Sebbene CHK1 sia principalmente riconosciuta per il suo ruolo nello stress da replicazione mediato da ATR (Smith et al., 2020), evidenze sperimentali indicano che la sua inibizione farmacologica induce danni al DNA e apoptosi in neuroni corticali post-mitotici (Ye e Blain, 2011) suggerendo che CHK1 gioca un ruolo chiave nella sopravvivenza dei neuroni post-mitotici differenziati. Inoltre, in un recente lavoro è stato dimostrato che CHK1 agisce localmente nella riparazione del DNA tramite NHEJ in cellule non replicanti stimolando l'interazione tra ATM e MDC1 (Lee e Dutta, 2021). Più in dettaglio, in fase G1, CHK1, attivata da ATM in risposta al danno al DNA, favorisce la riparazione NHEJ fosforilando lo chaperone per gli istoni ASF1A, sul residuo Ser-166. Questa modificazione consente ad ASF1A di interagire con MDC1, rafforzando il reclutamento e la stabilizzazione di ATM nei siti di danno. La carenza di Chk1 compromette gli eventi a valle di MDC1, inclusi l'ubiquitinazione degli istoni, il reclutamento di 53BP1 e la riparazione tramite NHEJ. La fosforilazione di ASF1A da parte di CHK11 risulta quindi essenziale per la riparazione del DNA tramite NHEJ in fase G1. Su queste basi, abbiamo indagato se la presenza di inclusioni citoplasmatiche (CI) di FUS e TDP-43 potesse alterare l'espressione genica, la stabilità proteica o l'attività di CHK1. Per verificare tale ipotesi, abbiamo impiegato un sistema split-GFP (Don et al., 2021; Modafferi et al., 2025) trasfettando cellule HeLa con due costrutti codificanti FUS WT o la variante mutata P525L, coniugati ai due fluorofori distinti mVenus, che emette nel giallo, o mCerulean che emette nel blu. In questo sistema, l'interazione tra due proteine FUS che normalmente esiste nella cellula come dimero emette nel

verde unendo la fluorescenza emessa nel giallo e nel blu. Questo permette di visualizzare una fluorescenza verde (488 nm) nucleare diffusa nel caso di espressione del FUS WT, o la formazione di brillanti CI fluorescenti verdi nel caso di espressione del mutante FUS P525L (Modafferi et al., 2025). La sovraespressione transitoria ha determinato un incremento di circa 4-5 volte dei livelli proteici totali di FUS sia in caso di espressione del WT che del mutante (**Fig. 12**). Le nostre analisi hanno rivelato che solo la sovraespressione del mutante P525L associato a forme gravi di SLA giovanile (Conte et al., 2012) induce la formazione di CI in circa il 40% delle cellule, mentre né la trasfezione del vettore vuoto né quella di FUS WT inducono la formazione di tali aggregati. Ciò indica che come precedentemente dimostrato da altri gruppi di ricerca, le CI si formano solo in seguito alla sovraespressione di FUS mutante, mentre né la trasfezione di per sé né la sovraespressione transitoria di FUS WT sono sufficienti a indurre le CI. È importante notare che l'induzione di un danno esogeno al DNA tramite trattamento con il farmaco radiomimetico neocarzinostatina (NCS) non aumenta la frequenza della formazione di CI indicando che le CI non sono una risposta allo stress genotossico ma al contrario tendono a formarsi prima e indipendentemente dall'accumulo di danni al DNA.

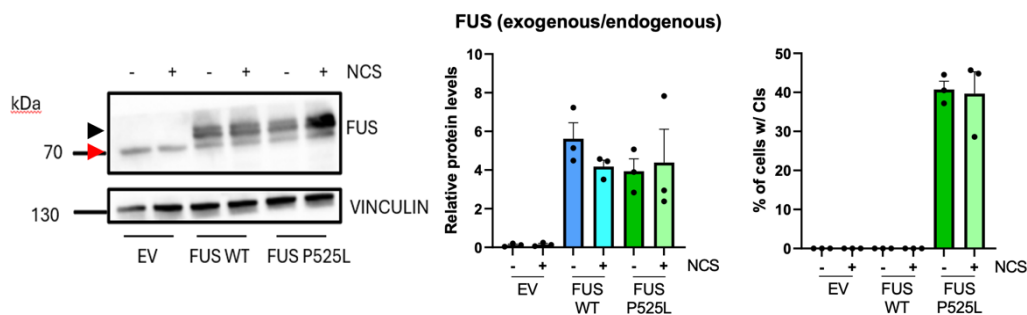


Figura 12: La OE di FUS mutante aumenta il numero di Cis.

Westren blot analisi dell'espressione di FUS nelle cellule trasfettate con FUS WT e mutato con o senza danno esogeno con NCS. Vinculina è stata utilizzata come controllo di caricamento. La sovraespressione del FUS WT è paragonabile a quella del mutato.

In linea con le nostre scoperte precedenti (Modafferi et al., 2025), le cellule che presentano CI di FUS mutante esibiscono un segnale di γ H2AX pan-nucleare diffuso e intenso (**Fig. 13**) indicando l'accumulo di danno al DNA e l'attivazione

della DDR. Nelle stesse cellule si osserva una completa assenza della formazione di foci di 53BP1 anche in seguito al trattamento con NCS. Al contrario le cellule circostanti ugualmente trasfettate ma prive di CI formano dei brillanti e ben distinguibili foci di riparazione di 53BP1 indicando che il fenotipo difettivo è specifico per le cellule che formano le CI. Ci siamo quindi chiesti se la perdita di foci di 53BP1 in queste cellule potesse essere dovuta ad una alterazione dei livelli di espressione di CHK1. Pertanto, abbiamo eseguito esperimenti RTqPCR contro il messaggero in popolazioni cellulari isolate tramite cell-sorting esprimenti FUS WT o FUS mutato in confronto a cellule trasfettate con EV. Il risultato ottenuto indica che le cellule esprimenti FUS mutato P525L non hanno livelli di espressione inferiore a cellule esprimenti FUS-WT (**Fig. 13**). L'unica variazione significativa che si osserva è legata alla sovraespressione di FUS-WT in accordo con l'osservazione che FUS può avere un ruolo di regolatore negativa della fosforilazione della S2 del C-terminal domain della unità catalitica RNA polimerasi II rallentandone la processività trascrizionale (Schwartz et al., 2012). In conclusione, vediamo che l'aumentato livello di danno al DNA in cellule con CI indotte da FUS mutato non dipende dalla riduzione dell'espressione genica di CHK1.

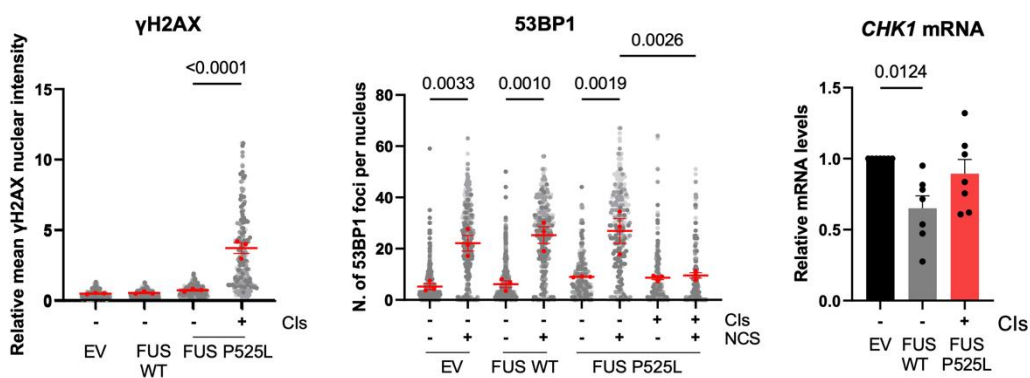


Figura 13: IF per marcatori del DDR in HeLa. Esperimenti con FUS WT o mutato per γ H2AX. Immunofluorescenza per 53BP1 in cellule esposte o meno a danno esogeno con NCS. Quantificazione dei foci nelle diverse popolazioni cellulari con o senza CI tramite CellProfiler. Significatività statistica tramite One-Way Anova con il software GraphPad-Prism.

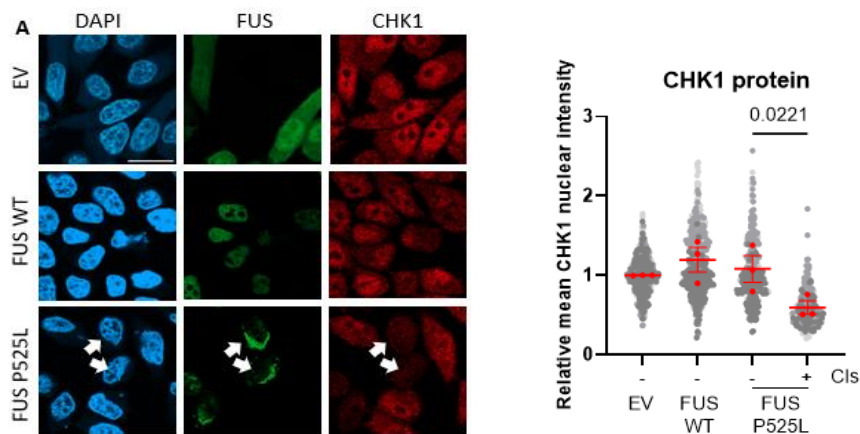


Figure 14: *IF indiretta per CHK1 in HeLa trasfettate con FUS WT o P525L split GFP. La quantifica dell'intensità di CHK1 è statisticamente significativa considerando le medie di tre esperimenti indipendenti che sono indicate dai puntini rossi per distinguerla dai punti a diverse gradazioni di grigio che indicano singole cellule di 3 esperimenti indipendenti. Questa statistica viene da noi indicata come statistica a super-plots.*

Tramite di immunofluorescenza indiretta con anticorpi contro la proteina CHK1 in cellule trasfettate con un EV o con FUS WT o con FUS-P525L abbiamo anche analizzato i livelli di proteina presenti nel nucleo delle cellule con o senza CI (**Fig. 14**). Come previsto, il sistema split di FUS WT produce un segnale GFP nucleare diffuso, mentre l'espressione di FUS P525L fuso con mVen o mCer dà origine a aggregati fluorescenti GFP nel citoplasma delle cellule. E' importante notare come questa analisi dei livelli proteici ha rivelato che cellule con CI hanno una ridotta quantità di queste proteina. L'osservazione ad occhio è stata confermata da differenze statisticamente significative tramite super plots di 3 esperimenti biologicamente indipendenti (**Fig. 14**). Abbiamo quindi ipotizzato che la deplezione di una quota significativa di CHK1 potesse essere alla base dell'accumulo di danni al DNA in presenza di CI di FUS mutato e gli esperimenti a seguire volgono a dimostrare questa relazione di causa-effetto.

CHK1 down-regolata in cellule con inclusioni di TDP-43

Come conferma della nostra ipotesi abbiamo voluto testare se la riduzione proteica di CHK1 fosse osservabile anche in cellule interessate da CI di TDP-43 sia nella forma WT che nella forma mutata, anch'esse caratterizzate da alti livelli di γ H2AX e assenza di foci di 53BP1 come pubblicato in (Modafferi et al., 2025). Attraverso esperimenti di immunofluorescenza su cellule trasfettate con TDP-43 WT, abbiamo evidenziato che la formazione di inclusioni citoplasmatiche di TDP-43 WT e di varianti mutanti di TDP-43 associate alla SLA familiare (TDP-43 A382T, TDP-43 I383V e TDP-43 M337V), correla con una riduzione dei livelli nucleari della proteina CHK1, riproducendo un fenomeno analogo a quanto precedentemente osservato per le CI di FUS. Nelle cellule HeLa, abbiamo ottenuto livelli di sovraespressione di circa 8 volte sia della versione WT che di tre diverse versioni mutanti associate alla SLA di TDP-43 (A382T TDP-43, I383V TDP-43 e M337V TDP-43) e abbiamo scoperto che anche la formazione di CI costituite da mutanti di TDP-43 porta alla down regolazione di CHK1. Questa importante osservazione indica che la riduzione dei livelli di CHK1 è alla base dell'accumulo di danno anche in modelli cellulari di SLA associata a inclusioni di TDP-43 sia sporadici nella forma WT che familiari, nelle forme mutate. Nelle cellule HeLa, abbiamo ottenuto livelli di sovraespressione di circa 8 volte sia della versione WT che di tre diverse versioni mutanti associate alla SLA di TDP-43 (A382T TDP-43, I383V TDP-43 e M337V TDP-43) e abbiamo scoperto che anche la formazione di CI costituite da mutanti di TDP-43 porta alla down regolazione di CHK1 (**Fig. 15**).

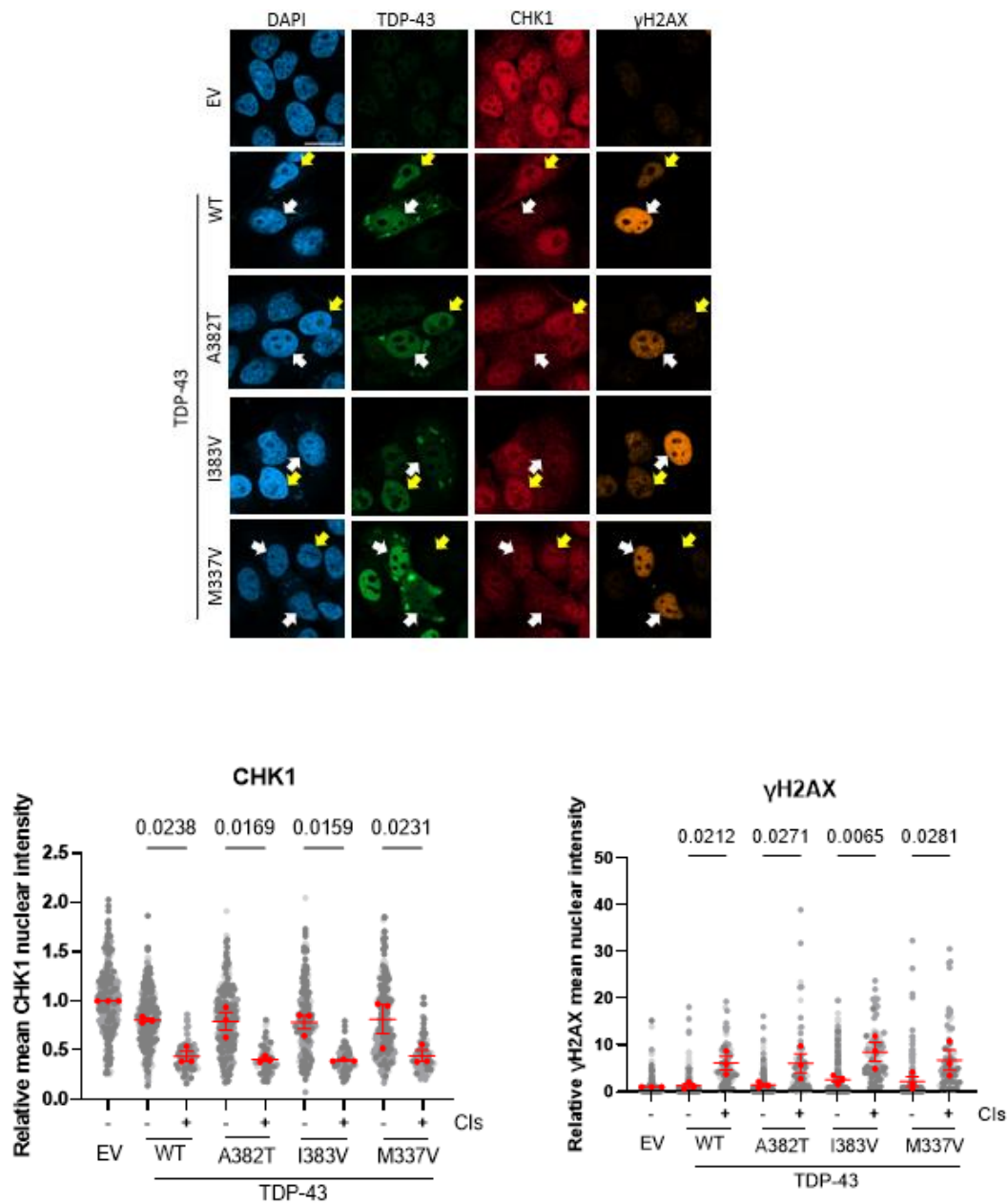


Figura 15: Down-regolazione di CHK1 in cellule con CIs di TDP-43 sia WT che mutato A382T, I383V, M337V analizzato tramite IF contro CHK1 e TDP-43 in cellule strasfettate con diversi plasmidi esprimenti diverse isoforme di TDP-43. Livelli nucleari di γ H2AX in cellule con CIs di TDP-43. La quantifica dell'intensità di CHK1 è statisticamente significativa con una statistica super plot.

La quantificazione dell'intensità di fluorescenza di CHK1 ha rivelato che la mutazione di TDP43 non aumenta ulteriormente la down-regolazione di CHK1 osservata nelle cellule che contengono CI di TDP-43 WT. Inoltre, abbiamo

monitorato gli effetti della sovraespressione dei mutanti di TDP-43 sull'integrità del genoma mediante colorazione per il marcatore di danno al DNA γ H2AX. Similmente ai livelli di CHK1, abbiamo scoperto che i livelli di γ H2AX nelle cellule che contengono CI di TDP-43 mutante sono comparabili all'intensità nucleare di γ H2AX delle cellule che contengono CI di TDP43 WT (**Fig. 15**). Questo dato indica che a differenza di FUS, gli aggregati associati alla sovraespressione di TDP-43 ha lo stesso impatto genotossico delle forme mutate. Al contrario, le cellule che sovraesprimevano le varianti mutanti ma risultavano prive di inclusioni citoplasmatiche non hanno mostrato né una riduzione di CHK1 né un accumulo di lesioni al DNA, confermando l'andamento osservato per la TDP-43 WT. Questi dati si integrano coerentemente con le precedenti evidenze del nostro gruppo, le quali indicano che le mutazioni di TDP-43 non esacerbano gli effetti genotossici legati alla formazione delle CI, né modificano la co-localizzazione tra la proteina e i marcatori dei granuli da stress (*stress granules* SG) all'interno degli aggregati stessi (Modafferi et al., 2025). Questo conferma che la genotossicità indotta della formazione delle CI è rilevante sia per le forme familiari che per le forme sporadiche di SLA caratterizzate dalla formazione di aggregati proteici di TDP-43-WT. In conclusione, abbiamo constatato che la sovraespressione di TDP-43, sia WT che nelle varianti mutanti, più frequentemente identificate nei pazienti affetti da SLA familiare, determina una riduzione sovrapponibile dei livelli di CHK1 e un analogo incremento di γ H2AX, un marker patologico tipico della quasi totalità dei casi di SLA. Poiché la TDP-43 WT va incontro a aggregazione nella maggior parte dei pazienti con SLA sporadica e dato che l'over espressione dei mutanti genera un fenotipo del tutto equivalente, in perfetto accordo con le nostre precedenti pubblicazioni (Modafferi et al., 2025), per il prosieguo dello studio abbiamo scelto di focalizzare l'attenzione esclusivamente sulla variante TDP-43 WT.

CHK1 è down-regolata nelle linee cellulari neuronali e in un modello murino di FUS-linked ALS

Per estendere le evidenze precedentemente ottenute nella linea cellulare HeLa e valutarne la rilevanza nei sistemi neuronali, abbiamo analizzato l'impatto della proteinopatia delle inclusioni di FUS nella linea di ippocampo murino

immortalizzate, le HT-22. In queste cellule, la sovraespressione di FUS WT o della variante mutata FUS-P525L ha indotto livelli di espressione e una formazione di CI del tutto sovrapponibili a quanto osservato nelle HeLa.

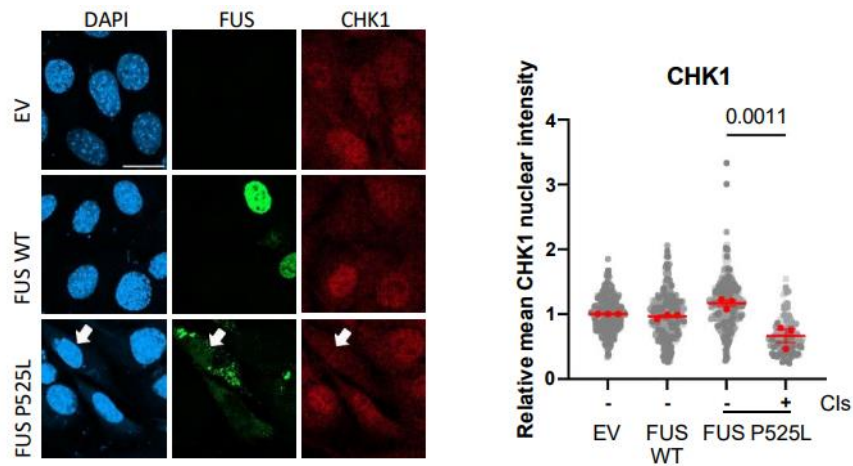


Figura 14: *Down-regolazione di CHK1 in linee cellulari di ippocampo di topo, le HT-22 con CI di FUS GFP split. La quantifica dell'intensità di CHK1 è statisticamente significativa con una statistica super plot.*

Coerentemente con i dati precedenti, la presenza di CI di FUS nelle cellule HT-22 ha determinato una marcata riduzione dei livelli nucleari di CHK1 (**Fig. 16**). Tale decremento è associato a un incremento di circa tre volte del segnale di γ H2AX e a un difetto marcato nell'assemblaggio dei foci di 53BP1 come mostrato in (Modafferi S et al CellDeath&Dis2026). Questa osservazione conferma che l'impatto genotossico delle CI di FUS è conservato tra cellule umane e murine e tra cellule trasformate come le HeLa e cellule primarie non trasformate come le HT-22. Abbiamo poi voluto indagare se anche l'aggregazione di TDP-43 potesse influenzare i livelli nucleari di CHK1 nei neuroni ippocampali murini. A tal fine, la sovraespressione di TDP-43 nella linea HT-22, seguita da analisi in IF, ha confermato che la formazione di CI di TDP-43 induce una riduzione della proteina CHK1 (**Fig. 17**), analogamente a quanto precedentemente osservato nelle cellule HeLa. Anche in questo contesto la riduzione dei livelli di espressione di CHK1 è associata ad un aumento significativo dei livelli nucleari di γ H2AX e ad una quasi completa incapacità della cellula di formare foci di 53BP1 come pubblicato in (Modafferi S. et al CellDeath&Dis 2026).

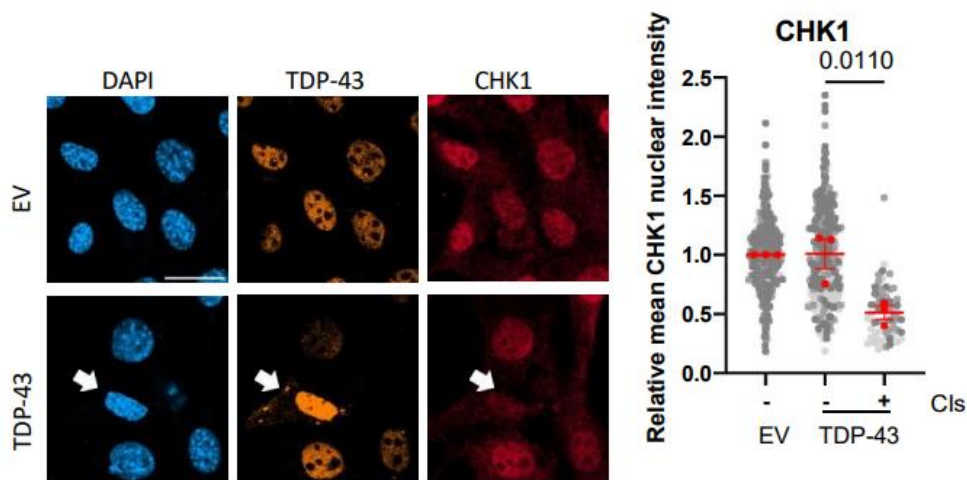


Figura 17: La proteina *Chk1* è down-regolata anche in cellule di ippocampo murino immortalizzato HT-22 in cui la formazione di CIs di TDP-43 è stata indotta tramite overespressione della proteina WT umana tramite trasfezione transiente.

Successivamente, abbiamo verificato la veridicità di questo fenomeno in contesti sperimentali più strettamente legati alla SLA. Abbiamo quindi condotto analisi di immunofluorescenza (**Fig. 18**) su motoneuroni murini maturi, differenziati da cellule staminali embrionali esprimenti o mFus WT o la forma mutata mFus P517L, corrispondente alla mutazione umana usata finora P525L.

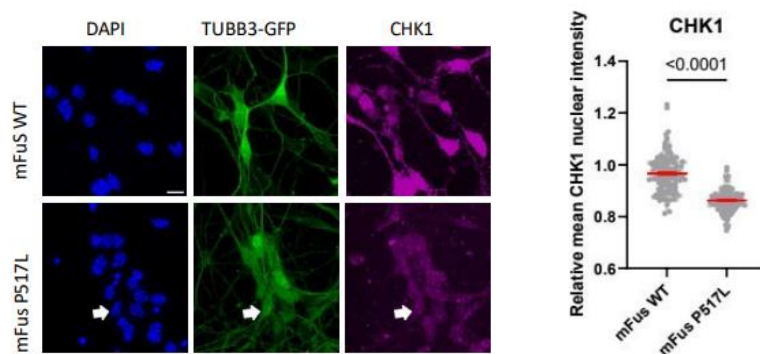


Figura 18: Immunofluorescenza per la proteina *Chk1* murina in motoneuroni murini terminalmente differenziati (mMN) WT o mutati nel gene endogeno di *FUS* con una sostituzione amminoacidica P517L corrispondente alla mutazione umana P525L. Quantificazione dell'intensità di segnale nucleare di *Chk1* tramite analisi CellProfiler sui nuclei di mMNs. La statistica è stata eseguita tra tre esperimenti indipendenti tramite approccio super plot.

Lavori precedenti del nostro laboratorio, hanno dimostrato che le cellule accumulano γ H2AX e mostrano una formazione difettosa dei foci di 53BP1

(Modafferi S. et al., CellDeath&Diff 2025). Coerentemente a tutti i risultati finora ottenuti in linee cellulari, abbiamo riscontrato ridotti livelli nucleari di CHK1 anche in motoneuroni murini mutati per FUS (**Fig. 18**). Pertanto, concludiamo che la down-regolazione di CHK1 è riprodotta in tutti i tipi cellulari testati, inclusi i mMNs. Infine, abbiamo riscontrato un'aumentata percentuale di cellule γ H2AX-positive e una diminuita percentuale di cellule 53BP1-positive anche in campioni di tessuto dal midollo spinale di un modello murino di FUS-SLA (Modafferi et al. CellDeath&Diff 2025). Pertanto, ci siamo chiesti se la perdita di Chk1 potesse spiegare anche l'accumulo di danni al DNA in questo sistema modello preclinico. Per testare questa ipotesi, abbiamo eseguito analisi di Western Blotting in campioni derivati dal midollo spinale lombare di animali hFUS eterozigoti non-sintomatici, e omozigoti sintomatici (Rossi et al., 2025). È stato entusiasmante scoprire che anche i campioni derivati da animali omozigoti sintomatici mostrano livelli ridotti di CHK1 nel loro midollo spinale (**Fig. 19**). Questo dato conferma *in vivo* per la prima volta che la riduzione di Chk1 è associata alla sintomatologia SLA in modelli animali preclinici di malattia.

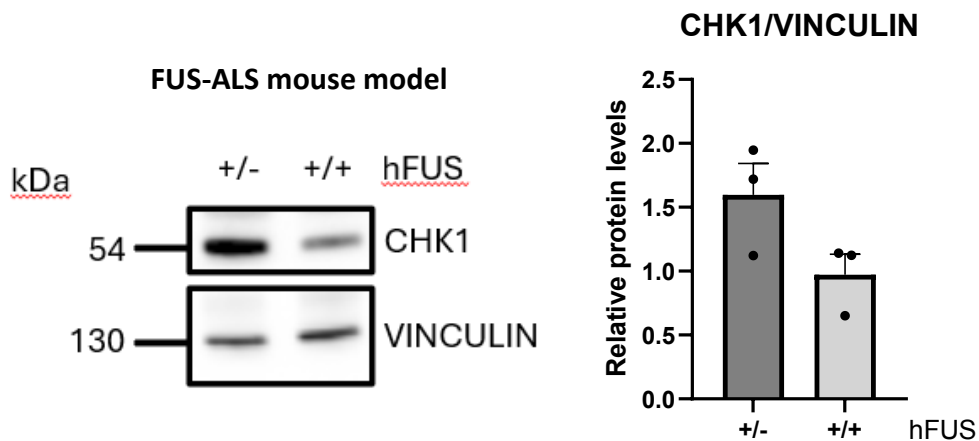


Figura 19: Down-regolazione di CHK1 in midollo spinale di animali ingegnerizzati per esprimere la proteina umana FUS in eterozigosi (+/- asintomatici) e in omozigosi (+/+) sintomatici e che rappresentano un modello ampiamente utilizzato murino di FUS linked-SLA. Western Blotting analisi con anticorpi contro Chk1 murino e Vinculina per controllo di caricamento della stessa quantità di estratto proteico totale. La quantifica mostra il rapporto tra l'intensità della banda di Chk1 e la banda della Vinculina.

Infine, abbiamo esteso l'analisi a un modello cellulare di SLA sporadica, valutando i livelli nucleari di CHK1 in progenitori di motoneuroni umani (hMNP) derivati da un paziente affetto o da un controllo sano comparabile per sesso ed età (Scarian et al., 2022). In questo specifico modello è già stata documentata la delocalizzazione citoplasmatica di TDP-43 associata a danno al DNA tramite accumulo di foci di γ H2AX (Modafferi et al., 2025). Le nostre analisi di IF hanno confermato la compartimentalizzazione citoplasmatica di TDP-43 nelle cellule sSLA (**Fig. 20**), con la comparsa di piccoli aggregati puntiformi (puncta) co-localizzanti con il marcatore dei granuli da stress (stress granules SG) TIA-1, in accordo con la letteratura (Wolozin e Ivanov, 2019; Modafferi et al., 2025).

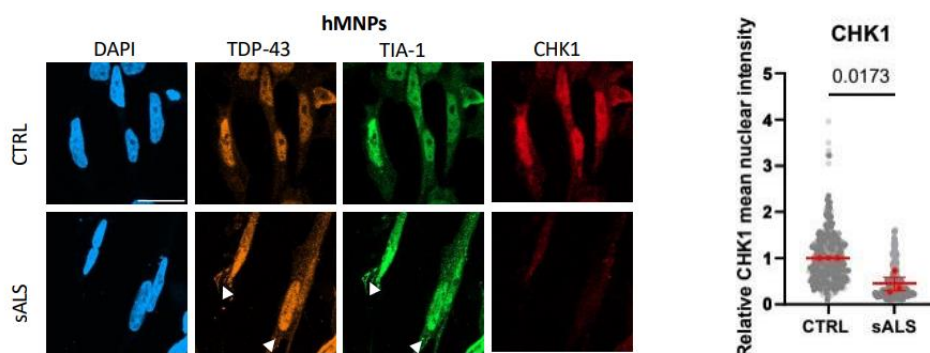


Figura 20: La chinasi *CHK1* risulta down-regolata anche in progenitori dei motoneuroni umani hMNP ottenuti da cellule iPSC di pazienti di SLA sporadica con accumulo di TDP-43 endogeno nel citoplasma. La quantificazione del segnale nucleare di *CHK1* è stato fatto tramite il software *Cell profiler* e la significatività riportata ottenuta tramite statistica tra tre esperimenti indipendenti del tipo *super plot*.

Quando abbiamo marcato il nucleo di questi progenitori motoneuronali umani con anticorpi contro *CHK1*, abbiamo scoperto che anche in questi modelli cellulari di SLA sporadica umana, *CHK1* è fortemente ridotta rispetto alle cellule di controllo di pazienti sani della stessa età e sesso (**Fig. 20**). Questo importantissimo dato indica che la riduzione di *CHK1* interessa tutti i casi di SLA sia familiari che sporadici, in percentuale molto più frequenti tra i malati SLA.

Parallelamente, l'analisi dei livelli di mRNA in tutti questi modelli di malattia FUS e TDP-43 relata non ha evidenziato riduzioni significative nel trascritto di

CHK1, escludendo una down-regolazione a livello trascrizionale anche in questo modello come anche riportato mostrato in Modafferi et al CellDeathDis 2026 (Fig.21).

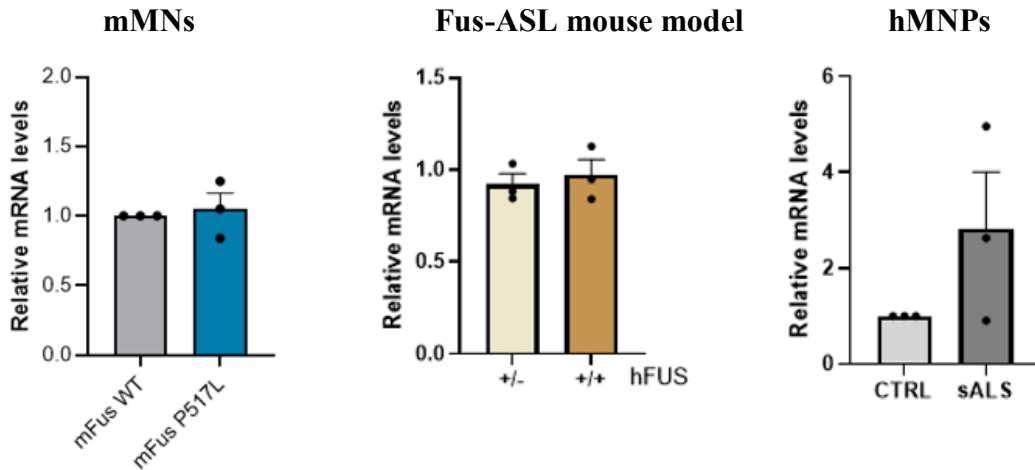


Figura 21: I livelli di mRNA di *Chk1* in cellule con CIs di *FUS* non sono down-regolati rispetto ai controlli sia nei motoneuroni murini terminalmente differenziati (mMN) sia nei campioni derivati dal midollo spinale lombare di animali *hFUS* eterozigoti non-sintomatici, e omozigoti sintomatici (*Fus-ASL* mouse-model). Anche in cellule progenitrici motoneuronali umani (hMNPs) derivati da campioni di pazienti *SALS* non si ha down-regolazione del trascritto di *CHK1*.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano in modo convergente che la down-regolazione di *CHK1* è un evento comune in molteplici modelli cellulari di SLA (sia legati a *FUS* che a *TDP-43*) e *in vivo* in un modello murino preclinico di *FUS-SLA*. Di particolare rilievo è il riscontro di tale deficit negli hMNPs derivate da iPSC di pazienti sporadici, il che suggerisce come la perdita di *CHK1*, e il conseguente deterioramento dell'integrità genomica, possa configurarsi come un evento precoce e cruciale nella patogenesi della SLA, in linea con altre precedenti evidenze scientifiche (Naumann et al., 2018).

Ruolo cruciale di CHK1 nella riparazione del danno al DNA

Dato il coinvolgimento cruciale di *CHK1* nel meccanismo di riparazione NHEJ, abbiamo ipotizzato che la perdita dei livelli corretti di proteina potesse contribuire all'accumulo di lesioni genomiche nelle cellule caratterizzate dalla presenza di inclusioni citoplasmatiche. Per verificare questa ipotesi e dimostrare la relazione

causa effetto tra i bassi livelli di CHK1 e l'aumento del γ H2AX, abbiamo inizialmente ripristinato i livelli nucleari della chinasi mediante una sovraespressione transitoria di CHK1- fuso al tag FLAG (CHK1-FLAG) in cellule HeLa recanti CI di FUS. Le analisi condotte in Immunofluorescenza contro il tag FLAG hanno confermato il successo del recupero dei livelli proteici di CHK1 nel compartimento nucleare di cellule che esprimono sia FUS P525L mutato che CHK1 FLAG con conseguente riduzione dei livelli di γ H2AX (**Fig. 22**). Queste osservazioni sono state validate tramite Western Blotting per dimostrare l'effettiva espressione di CHK1-FLAG (non mostrato in questo elaborato ma presente in Modafferi et al CellDeathDis 2026)

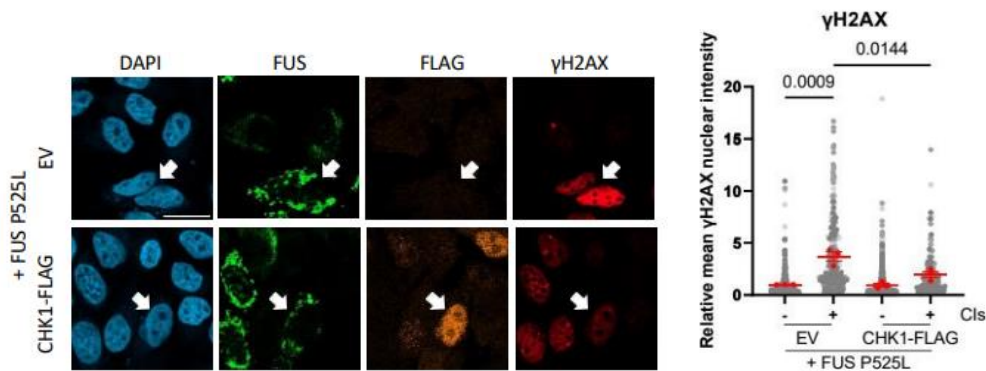


Figura 22: L'overespressione di CHK1-FLAG tramite trasfezione transiente riduce i livelli di γ H2AX nelle cellule che presentano CIs di FUS. Immunofluorescenza anti FLAG per individuare le cellule con overespressione di CHK1-FLAG e per γ H2AX.

Questo dato dimostra che il ripristino artificiale dei livelli di CHK1 è sufficiente a sostenere la riparazione del danno al DNA in queste cellule. Abbiamo quindi ipotizzato che la concomitante riduzione del segnale di γ H2AX (**Fig. 22**) osservata potesse dipendere da un recupero funzionale nell'assemblaggio dei foci di 53BP1. La successiva caratterizzazione tramite IF per 53BP1 ha validato tale ipotesi: la sovraespressione transitoria di CHK1 unitamente al FUS mutato, infatti, è in grado di ripristinare la corretta formazione dei foci di 53BP1 all'interno delle cellule danneggiate, nonostante la persistente presenza dei CI di FUS nel citoplasma, a seguito del ripristino dei giusti livelli nucleari di CHK1 (**Fig. 23**).

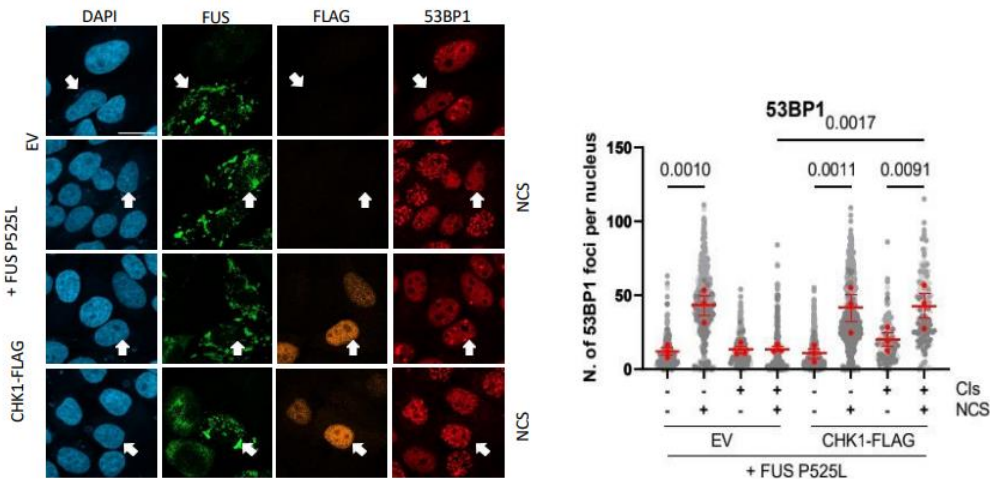


Figura 23: L'overespressione di *CHK1-FLAG* tramite trasfezione transiente aumenta il n. di foci di *53BP1* nelle cellule che presentano *Cis* di *FUS*. Immunofluorescenza anti *FLAG* per individuare le cellule con overespressione di *CHK1-FLAG* e per *53BP1*.

Poiché abbiamo osservato che la sovraespressione di *CHK1* può compensare l'accumulo di danni al DNA (**Fig. 26**), ci siamo chiesti se la sua profonda deplezione tramite interferenza dell'RNA (siRNA) potesse aumentare ulteriormente l'accumulo di danni al DNA nelle cellule con *CI*. A ulteriore supporto di un ruolo protettivo di *CHK1* nel mantenimento dell'integrità del genoma, la deplezione di *CHK1* mediante siRNA esacerba l'accumulo di danni al DNA in queste cellule, come indicato dall'aumentata intensità di γ H2AX in seguito alla deplezione di *CHK1* nelle cellule contenenti *CI* di *FUS* (**Fig. 24**).

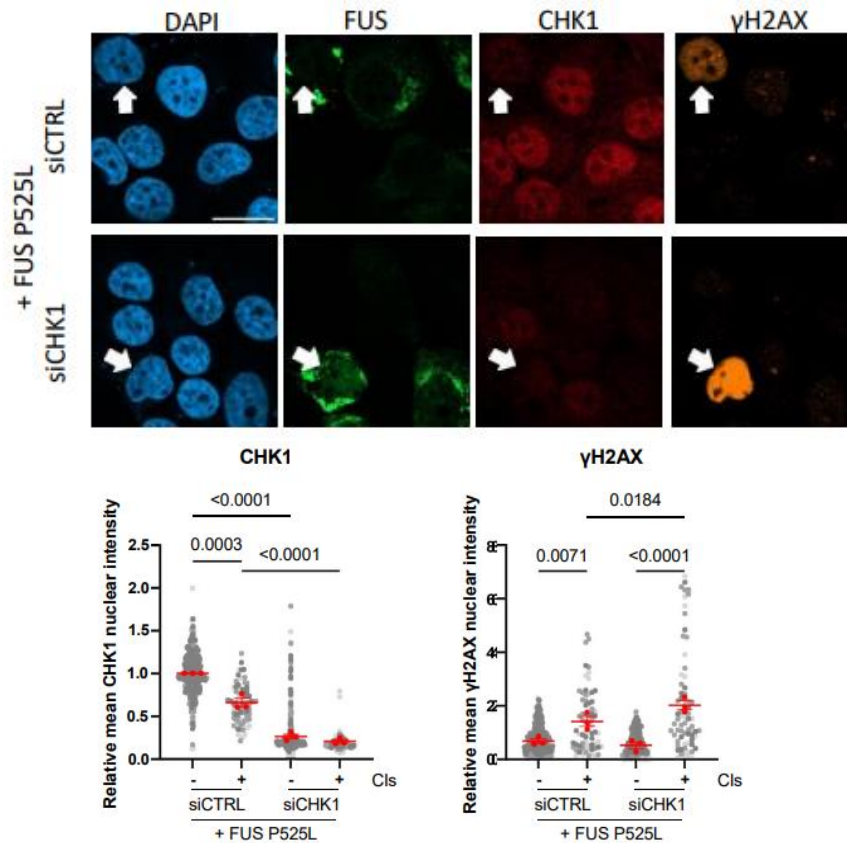


Figura 24: Il silenziamento di *CHK1* tramite siRNA precedente alla trasfezione di *FUS-P525L* riduce in modo ancora più drastico i livelli di *CHK1* nucleare in cellule con CI e aumenta in modo significativo i livelli di γ H2AX. Immunofluorescenza contro *CHK1* e γ H2AX seguita da relativa quantificazione tramite Cell Profiler del segnale nucleare dei due marcatori che in modo consistente presentano andamenti inversamente correlati.

Infine, ci siamo chiesti se potessimo riprodurre questi risultati nelle cellule contenenti CI di TDP-43. Abbiamo prima eseguito l'IF per analizzare i livelli di γ H2AX e 53BP1. Contrariamente alle nostre aspettative, la sovraespressione di *CHK1* nelle cellule contenenti CI di TDP-43 non è sufficiente a ridurre l'accumulo di danni al DNA o a ripristinare la formazione dei foci di 53BP1 in seguito a un danno esogeno al DNA (*data not shown* in questo elaborato di tesi ma presente in Modafferi S. et al CellDeath&Dis 2026). Questa osservazione suggerisce che la genotossicità indotta da CI di TDP-43 è maggiore o legata a diversi eventi paralleli e coesistenti. Per questo motivo il nostro studio si è maggiormente focalizzato su modelli di malattia preclinica FUS.

Analisi dello splicing di CHK1

A fronte della riduzione dei livelli nucleari della proteina CHK1 osservata nei diversi modelli cellulari e preclinici di SLA, si è reso necessario indagare la causa molecolare di tale down-regolazione e deficit funzionale. Il trascritto di CHK1 è soggetto ad un evento di splicing alternativo che produce una forma long full length e una short in cui l'esone 3 è escluso. La proteina prodotta dalla forma short senza esone 3 è notoriamente instabile ed è stata vista agire come dominante negativa perché in un dimero con la forma full-length inibisce l'azione della proteina completa (Pabla et al., 2012). Il controllo dell'inclusione dell'esone 3 nel trascritto è mediato dal fattore di splicing TRA2, che se presente, garantisce che la quasi totalità del trascritto di CHK1 includa l'esone 3 dando origine alla proteina full length stabile. E' noto che le mutazioni di FUS e la formazione di CI possono alterare lo splicing di diversi trascritti. Pertanto, per testare l'ipotesi che la perdita della stabilità della chinasi CHK1 fosse determinata da un'alterazione dello splicing alternativo nelle cellule con CI di FUS a favore della forma short di CHK1, abbiamo analizzato quantitativamente e strutturalmente lo splicing alternativo del trascritto di *CHK1* con particolare riferimento all'inclusione o l'esclusione "skipping" dell'esone 3, in cellule con o senza CI. Come discusso in precedenza l'analisi trascrizionale mediante RT-PCR ha rivelato che i livelli complessivi di mRNA di *CHK1* rimangono stabili e non mostrano variazioni significative nelle cellule esprimenti le varianti mutate (FUS P525L o TDP-43) rispetto ai controlli, escludendo un difetto di efficienza trascrizionale del gene. Abbiamo quindi eseguito esperimenti di RT-PCR con primers che mappano nell'esone 2 e nell'esone 4, mirati a valutare lo splicing alternativo, di inclusione o skipping dell'esone 3. Con questi primers si otterrà una banda da 327 bp nel caso di inclusione e una banda da 150 bp nel caso di skipping dell'esone 3 e generazione della isoforma short instabile. Nei campioni di RNA isolata da cellule isolate tramite *cell sorting* con il sistema FUS-split è stata riscontrata esclusivamente la banda fisiologica di 327 bp, corrispondente al prodotto di PCR del trascritto in cui l'esone 3 è incluso, anche nella popolazione cellulare esprimente FUS mutato (**Fig. 29**). Le intensità relative delle bande ha rivelato che la regolazione dello splicing è del tutto invariato sia in cellule esprimenti le varianti

mutate (FUS P525L) che nei controlli, indicando che la perdita di stabilità di CHK1 non è causata da un'aumentata frequenza di skipping dell'esone 3. Analisi del trascritto GADPH sono stati usati come controllo interno di quantità di RNA totale e di efficienza di retro-trascrizione. Cellule HeLa trasfettate con un EV sono state usate come controllo negativo e un campione in cui non è stato inserito il cDNA (NC) è stato usato per escludere contaminazioni della mix di reazione con DNA genomico o con prodotti di PCR (**Fig 25**). Nell'analisi della Percentuale di Inclusione dello Splicing (PSI) condotta su motoneuroni umani (hMNP) da pazienti sALS (**Fig. 27**).

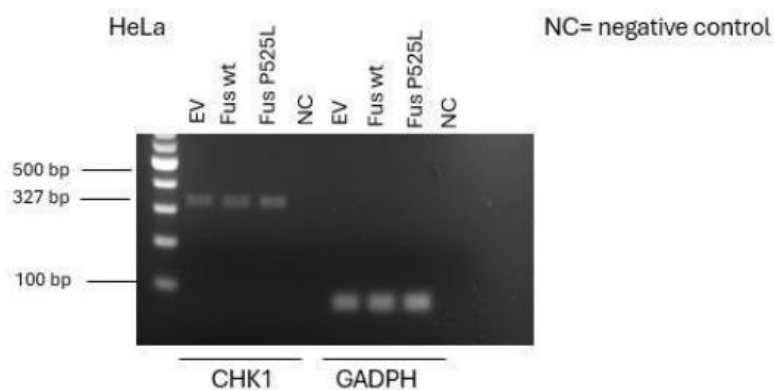


Figura 25: Analisi di splicing di CHK1 in cellule Hela trasfettate con EV, FUS WT, FUS P525L. Primers utilizzati per discriminare l'inclusione e lo skipping dell'esone 3. Tutti i campioni valutati presentano la banda a 327bp con l'esone 3 incluso. GADPH è usato come controllo di caricamento e PCR. NC fa riferimento al campione con solo mix in assenza di cDNA.

Per validare l'efficacia del protocollo di RT-PCR, è stato utilizzato come controllo positivo il knockdown del regolatore di splicing TRA2 tramite siRNA (**Fig. 26**). Solo nel controllo positivo è visibile la comparsa della banda alternativa aberrante a 107 bp, generata dall'esclusione esonica. La persistenza dell'unica banda integra nei modelli patologici di SLA, in netto contrasto con il profilo alterato del controllo positivo siTRA2, esclude definitivamente la presenza di difetti di splicing. Questo dato, unito all'evidenza di livelli totali di mRNA costanti, dimostra che il deficit di CHK1 non è dovuto ad un'alterazione dello splicing alternativo in cellule HeLa.

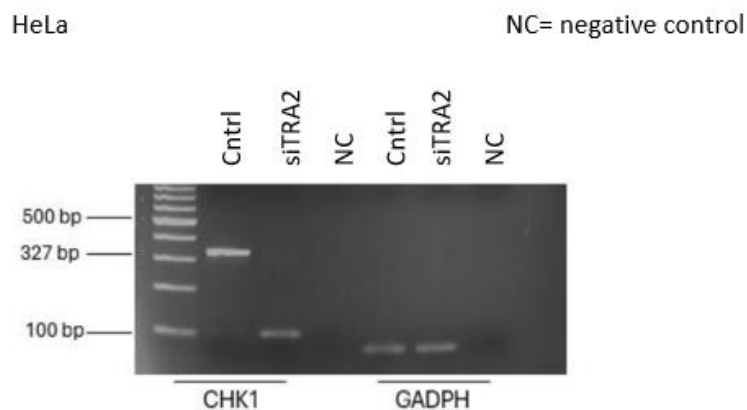


Figura 26. *Analisi di splicing alternativo del mRNA di CHK1 in seguito al silenziamento di TRA2. L'analisi dimostra che, come precedente dimostrato, l'assenza di TRA2 risulta in una quasi totale conversione dello splicing di CHK1 nella forma short in cui l'esone 3 viene escluso. Cntrl: RNA da cellule trattate con siRNA controllo. siTRA2: RNA estratto da cellule trasfettate con siRNA per TRA2. NC fa riferimento al campione con solo mix in assenza di cDNA.*

Nell'analisi della Percentuale di Inclusione dello Splicing (PSI) condotta su precursori di motoneuroni umani (hMNP) ottenute da iPCS da pazienti di SLA proradica sALS, abbiamo riscontrato un corretto splicing alternativo di CHK1 del tutto paragonabile al controllo (**Fig. 27**). Questo dato conferma che la perdita di CHK1 osservato nelle cellule di questi pazienti non è dovuta ad una aumentata frequenza di skipping dell'exone 3 e conseguente produzione della forma short instabile di CHK1.

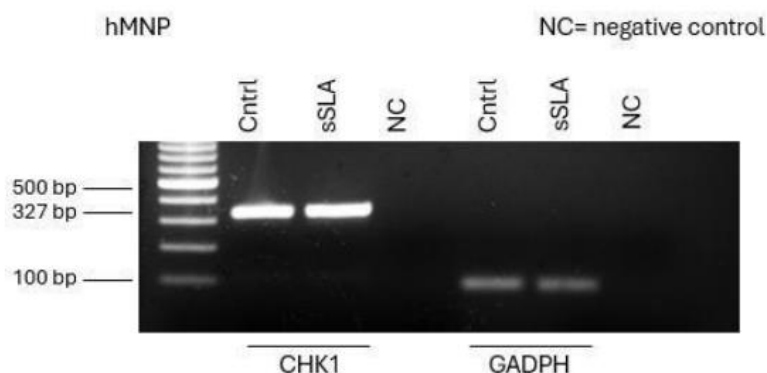


Figura 27: *Analisi di splicing di CHK1 in cellule hMNP controllo e sALS. RT-PCR dello splicing di CHK1 e di GADPH come controllo di caricamento e efficienza di reazione. Cntrl: Controllo RNA da pazienti sani, sSLA RNA estratto da hMNP di pazienti SLA sporadici, NC fa riferimento al campione con solo mix in assenza di cDNA.*

Lo stesso risultato è stato osservato anche in motoneuroni murini mFus-P517L e in RNA estratto dalla colonna vertebrale di Animali sintomatici modelli preclinici si SLA legata a FUS (Modafferi S. et al 2026) queste analisi dimostrano che l'alterazione dello splicing a favore dell'esclusione dell'esone 3 e della produzione della forma short instabile di CHK1 non è il meccanismo alla base della deregolazione di questa chinasi nelle cellule nei modelli di SLA familiare o sporadica FUS e TDP-43.

Il turnover della proteina legata alla degradazione tramite il proteasoma

Successivamente abbiamo indagato il possibile coinvolgimento del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) nella degradazione della proteina CHK1 nelle cellule con CI di FUS. A tal fine, è stato utilizzato l'inibitore del proteasoma MG132 nelle cellule HeLa. Mediante esperimenti di immunofluorescenza, è emerso che il trattamento con MG132 determina un completo recupero dei livelli nucleari di CHK1 indicando che CHK1 è oggetto di degradazione tramite il proteasoma e che questa regolazione appare accentuata nelle cellule con CI (**Fig. 28**). I risultati hanno mostrato che l'inibizione dell'UPS non altera la formazione delle CIs nelle HeLa. E' importante notare che il ripristino dei livelli di CHK1 ottenuto tramite inibizione del proteasoma risulta in una marcata riduzione dell'intensità del segnale γ H2AX nelle cellule contenenti Cis (**Fig. 28**). Il trattamento con MG132 induce l'accumulo di CHK1 anche nelle cellule HeLa non trasfettate, supportando ulteriormente l'ipotesi che CHK1 venga degradato attraverso il proteasoma, come già riportato in precedenza. (Zhang et al., 2005).

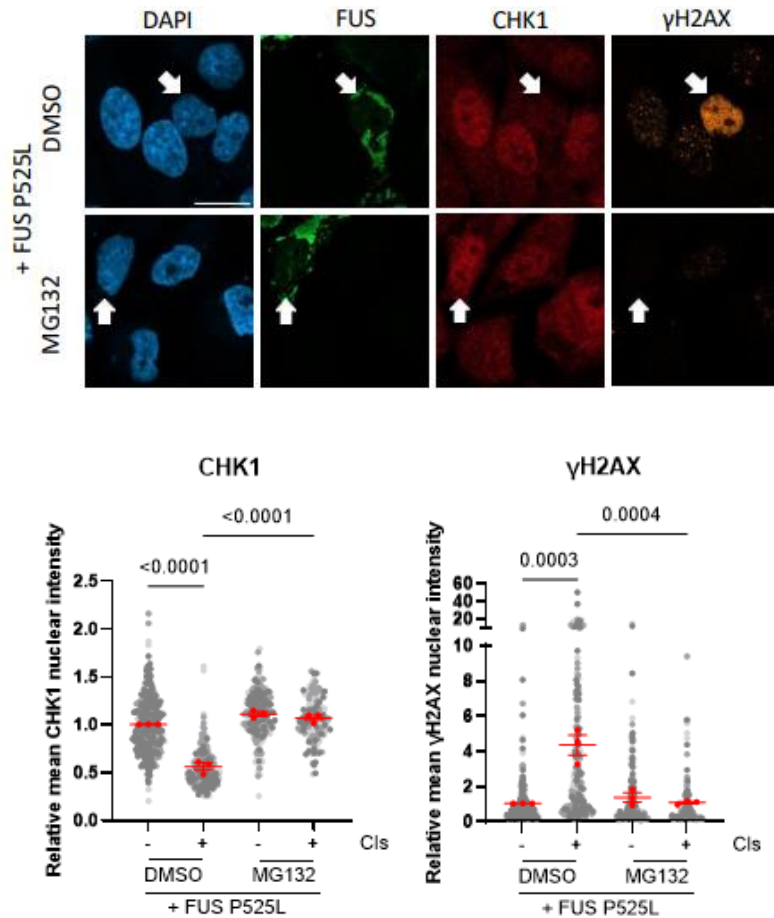


Figura 28: *Inibizione del proteasoma con MG132 in cellule HeLa. Recupero di CHK1 e riduzione dei livelli di γH2AX. Immagini di immunofluorescenza per CHK1 e γH2AX mostrano il recupero di CHK1 e riduzione dei livelli di γH2AX. Livelli di espressione di CHK1 e γH2AX in cellule trattate con MG132 o DMSO il solvente usato per sciogliere l'inibitore come controllo.*

Considerato che anche linee cellulari neuronali contenenti CIs mostrano una perdita nucleare di CHK1, abbiamo valutato se il sistema UPS fosse responsabile della degradazione di CHK1 anche in un contesto neuronale, che è più rilevante per la SLA. A questo scopo, cellule HT-22 sovraesprimenti la variante mutata P525L di FUS sono state trattate con MG132 e analizzate mediante immunofluorescenza per CHK1 e γH2AX. I risultati hanno mostrato che l'inibizione dell'UPS non altera la formazione delle CIs nemmeno nelle cellule HT-22 ma è sufficiente a ripristinare i livelli proteici di CHK1 e a prevenire l'accumulo del segnale γH2AX (Fig. 29). Complessivamente, questi risultati dimostrano che la via dell'UPS è responsabile della degradazione di CHK1 nelle

cellule soggette ad aggregazione della proteina FUS mutata, infatti come si può notare dal grafico l'inibizione dell'UPS consente il recupero dei livelli nucleari di CHK1 e previene l'accumulo dei segnali di danno al DNA (Fig. 29).

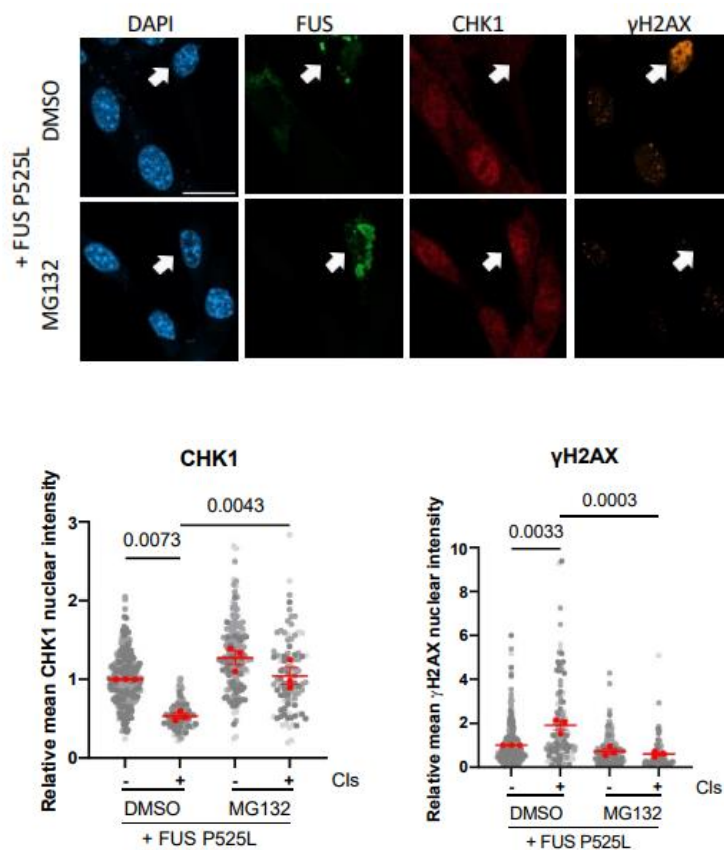


Figura 29: Inibizione del proteasoma con MG132 in HT-22. Recupero di CHK1 e riduzione dei livelli di γH2AX. Livelli di espressione di CHK1 e γH2AX in cellule trattate con MG132 o DMSO come controllo.

Analisi dei livelli di chk1 dopo il trattamento SINEUP

Una volta osservata la riduzione proteica di CHK1 nei modelli cellulari analizzati, caratterizzati da CIs di TDP-43 e FUS, e dimostrato che l'mRNA endogeno di *CHK1* è quantitativamente e strutturalmente preservato, ma che la proteina matura viene degradata troppo rapidamente dal proteasoma. In questo contesto patologico, abbiamo ipotizzato che l'utilizzo della tecnologia dei SINEUP offrisse una grande opportunità terapeutica per ripristinare in vivo i livelli endogeni di CHK1 tramite la stimolazione della traduzione del suo trascritto in proteina full length. Questi ultimi sono RNA lunghi non-codificanti e sintetici, ingegnerizzati per aumentare i livelli proteici di un mRNA target in modo altamente specifico, potenziando esclusivamente la traduzione proteica (Zucchelli et al., 2016). A tale scopo, sono state utilizzate cellule HeLa sottoposte a co-trasfezione: un plasmide esprime la proteina FUS mutata (P525L) che permette l'espressione della variante proteica responsabile della formazione di CI e il plasmide contenente il SINEUP specifico per CHK1. È importante sottolineare che il SINEUP utilizzato in questa fase in cellule coltivate *in vitro* è utilizzato direttamente per la trasfezione, ma il tipo di plasmide è lentivirale e quindi contiene i geni accessori e le sequenze LTR necessari per il packaging lentivirale (**Fig. 30**). Questi plasmidi permettono quindi di generare particelle lentivirali che il mio laboratorio vorrebbe in futuro impiegare per infettare animali transgenici modelli murini di SLA. Un elemento cruciale del design del vettore utilizzato per esprimere in cellule i diversi SINEUP, è la presenza di una sequenza codificante per la RFP (Red Fluorescent Protein) che permette di individuare chiaramente le cellule trasfettate e l'espressione dei geni espressi dal plasmide stesso (**Fig. 30**). L'espressione di questo reporter fluorescente permette di monitorare in tempo reale, tramite microscopia a fluorescenza, l'efficienza di trasfezione: le cellule che hanno incorporato con successo il plasmide emettono infatti un segnale rosso, consentendo di distinguere chiaramente la popolazione cellulare rilevante per lo studio da quella non trasfettata.

mentre i SINEUP 02 e 03 si sono rivelati funzionali nel ripristinare parzialmente i livelli della chinasi. L'efficienza dei SINEUP è stata testata paragonandoli con un controllo negativo denominato Scramble H (SCR H). Il termine "Scramble" (dall'inglese "rimescolato") indica che la sequenza del Binding Domain è stata invertita o rimescolata casualmente pur mantenendo la stessa lunghezza e composizione nucleotidica della sequenza SINEUP complementare al trascritto endogeno di CHK1. La dicitura "H" (High) si riferisce invece al design del backbone del vettore, che ricalca quello dei SINEUP ad alta espressione, utilizzati nell'esperimento.

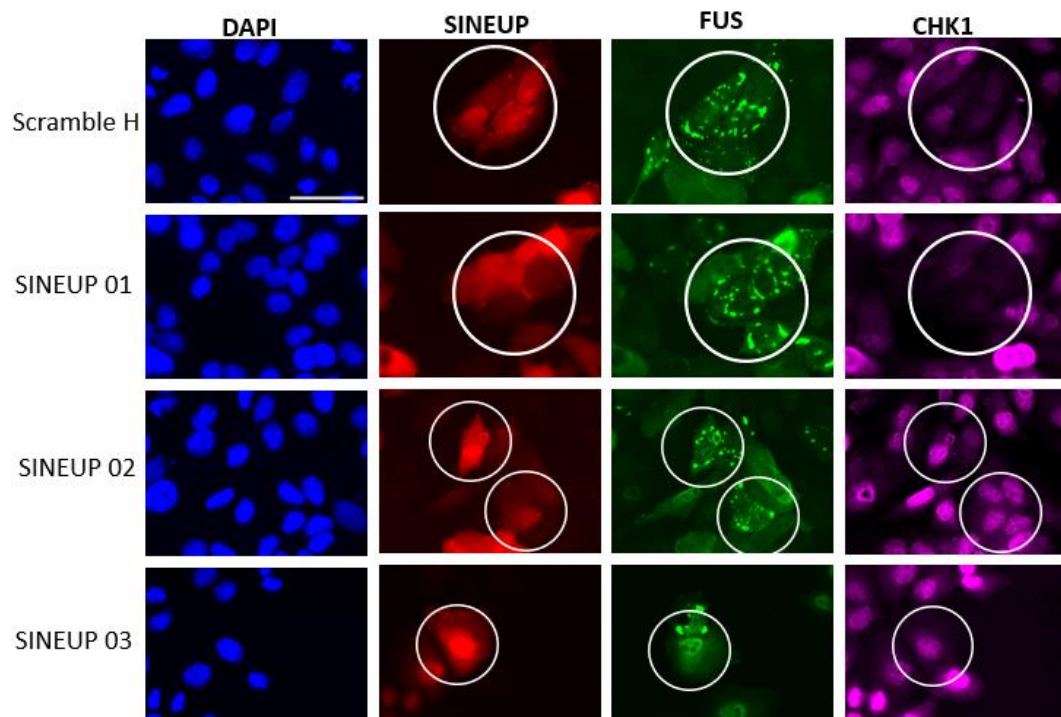


Figura 31: IF indiretta per CHK1 in HeLa co-trasfettate con FUS P525L e SINEUP Scr H, 01, 02, e 03. Le cellule cerchiare sono quelle co-trsfettate, quindi rilevanti per il nostro studio. E' possibile vedere il una maggiore intensità di CHK1 nelle cellule trasfettate con il SINEUP 02 e 03 rispetto al controllo.

Tale evidenza è stata successivamente confermata dall'analisi quantitativa dell'intensità nucleare del segnale di immunofluorescenza per la proteina endogena CHK1, come riportato nel grafico (**Fig. 32**). La quantificazione della

fluorescenza ha infatti evidenziato un aumento significativo dei livelli di CHK1, validando la capacità di uno o due dei 3 SINEUP testati, di contrastare la deplezione proteica indotta dalla formazione di CI di FUS-P525L. In particolare, il SINEUP 02 ha mostrato l'efficacia maggiore, determinando l'incremento proteico più marcato e statisticamente significativo. E' interessante notare come il SINEUP 02 e 03, oltre ad aumentare CHK1 nelle cellule con CIs, aumenti i livelli proteici del suo target anche nelle cellule senza CIs, confermando la funzionalità del SINEUP.

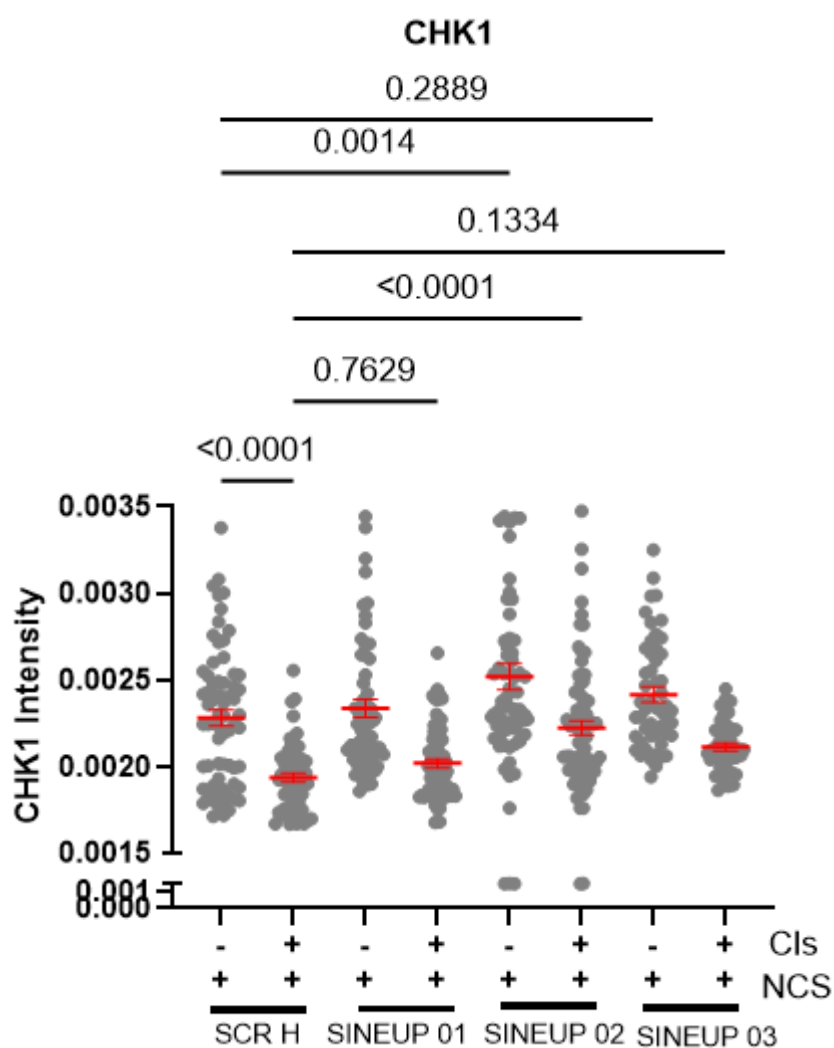


Figura 32: La quantificazione del segnale nucleare di CHK1 è stato fatto tramite il software Cell profiler e la significatività riportata è ottenuta tramite statistica tra quattro esperimenti indipendenti. Il SINEUP 01 non mostra significatività nell'aumento di CHK1 rispetto al controllo, lo 02 è altamente significativo, lo 03 non è significativo ma in alcuni esperimenti mostra un comportamento borderline.

Analisi dei livelli nucleari di γ H2AX dopo il trattamento SINEUP

Una volta osservato che il trattamento con i SINEUP è in grado di indurre un aumento significativo dei livelli proteici di CHK1, l'indagine si è spostata sulla valutazione dell'impatto funzionale di tale recupero sul livello di danno al DNA. L'obiettivo principale è stato verificare se il ripristino dei livelli della chinasi CHK1 fosse sufficiente a mitigare l'accumulo di danni al DNA, associato alla presenza di CI di FUS-P525L. Per questo è stato analizzato il marker γ H2AX. Seguendo lo stesso approccio metodologico utilizzato per CHK1 un primo riscontro è stato ottenuto mediante l'analisi qualitativa al microscopio a fluorescenza. Poiché il SINEUP 01 non ha mostrato effetti significativi nel recupero della chinasi, sono stati analizzati solo il SINEUP 02 e 03. Le cellule trasfettate con il FUS-P525L e trattate con lo Scramble H mostravano un segnale nucleare di γ H2AX intenso e diffuso, confermando l'elevato carico di danno al DNA in questo contesto patologico come precedentemente osservato. Al contrario, nelle cellule trasfettate con i SINEUP funzionali, è stata rilevata una chiara diminuzione visiva dell'intensità del segnale di γ H2AX, suggerendo un effetto protettivo mediato dall'aumento dei livelli proteici di CHK1 (**Fig. 33**).

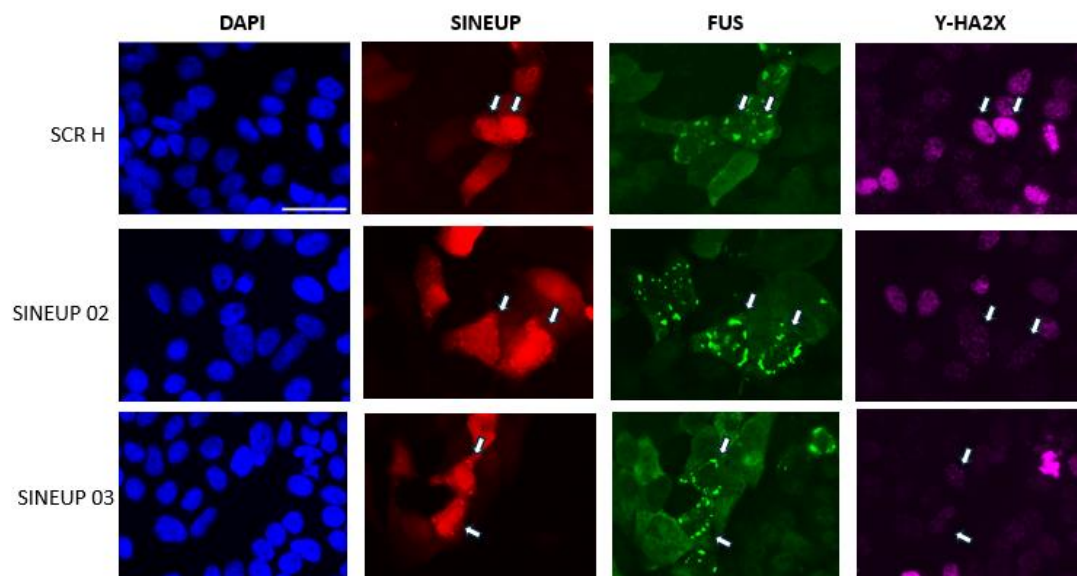


Figura 33: *IF indiretta per γ H2AX in HeLa co-trasfettate con FUS P525L e SINEUP Scr H, 02, e 03. Le cellule indicate con le frecce sono quelle co-trasfettate, quindi rilevanti per il nostro studio. E' possibile vedere una riduzione dell'intensità di γ H2AX nelle cellule trasfettate con il SINEUP 02 e 03 rispetto al controllo.*

Per confermare l'evidenza ottenuta ad occhio al microscopio, è stata eseguita un'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza nucleare. I risultati hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di γ H2AX nucleare nelle cellule trattate con i SINEUP 02 e 03 rispetto al controllo (**Fig. 34**).

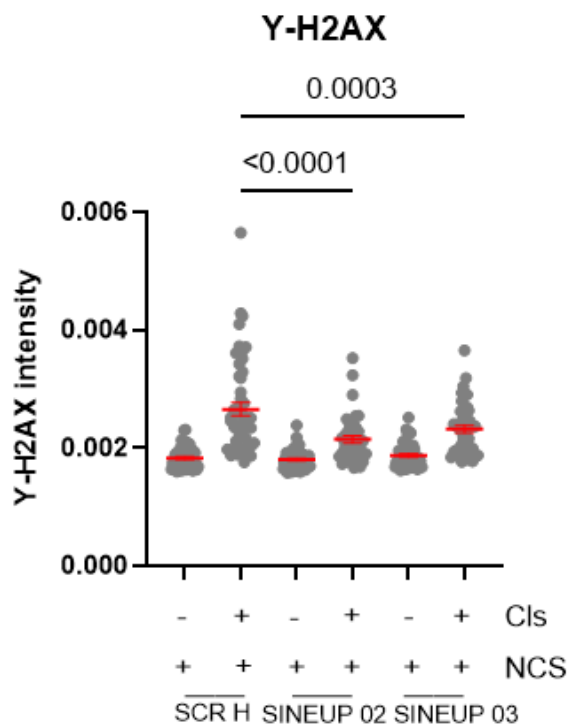


Figura 34: La quantificazione del segnale nucleare di γ H2AX è stato fatto tramite il software Cell profiler e la significatività riportata è ottenuta tramite statistica tra quattro esperimenti indipendenti. I SINEUP 02 e 03 mostrano valori altamente significativi nella diminuzione di γ H2AX rispetto al controllo.

Questa diminuzione dei livelli di γ H2AX indica effettivamente una riduzione del danno al DNA accumulato, validando l'ipotesi che il recupero dei livelli di CHK1 tramite tecnologia SINEUP sia in grado di mitigare, almeno parzialmente, l'accumulo di danno al DNA nelle cellule caratterizzate dalla formazione di inclusioni citoplasmatiche di FUS.

Analisi del numero dei foci di 53BP1 per nucleo dopo il trattamento SINEUP

Il calo dei livelli di γ H2AX osservato, suggerisce una riduzione del danno al DNA, ma non chiarisce se tale effetto sia dovuto a una minore induzione di rotture o a un miglioramento dell'efficienza dei sistemi di riparazione. Per

approfondire questo aspetto, nello step successivo dell'indagine mi sono occupato di monitorare il reclutamento sulle lesioni di 53BP1, proteina chiave nel pathway di riparazione del danno al DNA tipico delle cellule post replicative: il NHEJ. Seguendo il medesimo approccio sperimentale usato in precedenza le cellule trasfettate con FUS mutato e i diversi SINEUP sono state trattate con NCS per indurre la formazione di foci di 53BP1. Nelle cellule controllo NCS induce la formazione di foci brillanti e distinti mentre come già osservato le cellule con CI di FUS mutato sono incapaci di riconoscere il danno al DNA indotto da NCS. E' stata quindi analizzata la formazione dei foci nucleari di 53BP1 in cellule esprimenti i SINEUP contro CHK1. L'analisi qualitativa al microscopio ha rivelato una differenza nel pattern di distribuzione della proteina. Nelle cellule trasfettate con FUS P525L e il controllo Scramble H, il numero di foci di 53BP1 risultava ridotto, suggerendo una compromissione nel reclutamento della proteina presso i siti di danno. Al contrario, nelle cellule trattate con i SINEUP funzionali 02 e 03, è stato possibile osservare un incremento del segnale puntiforme (foci) all'interno dei nuclei (**Fig. 35**).

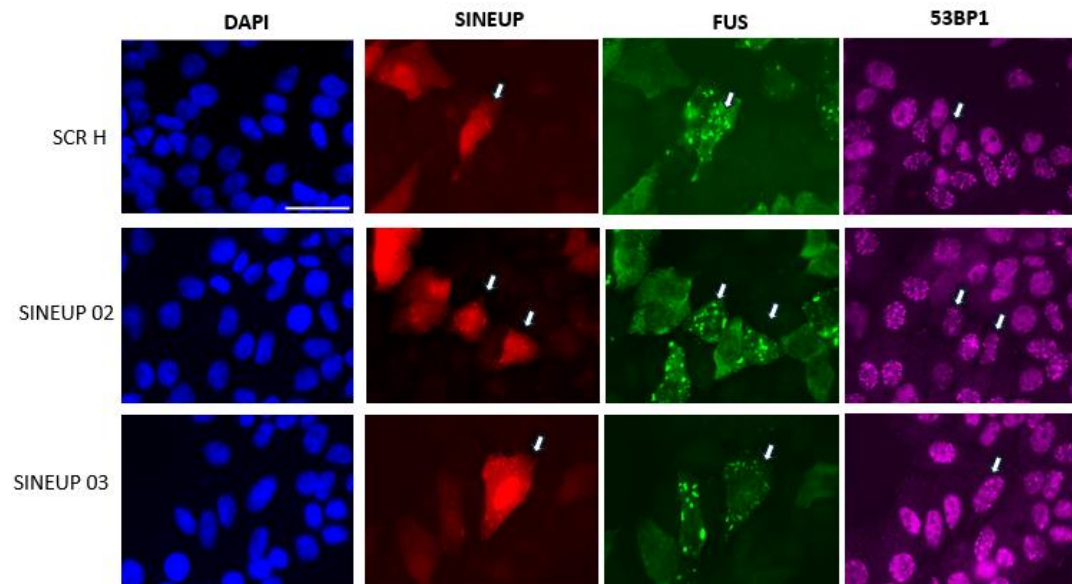


Figura 35: IF indiretta per 53BP1 in HeLa co-trasfettate con FUS P525L e SINEUP Scr H, 02, e 03. Le cellule indicate con le frecce sono quelle co-trsfettate, quindi rilevanti per il nostro studio. E' possibile vedere un aumento del n. dei foci di 53BP1 nelle cellule trasfettate con il SINEUP 02 e 03 dopo trattamento con NCS rispetto al controllo.

La successiva quantificazione del numero di foci per nucleo ha confermato che il trattamento con i SINEUP determina un aumento del reclutamento di 53BP1 rispetto alle cellule di controllo. In modo particolare l'aumento statistico si osserva per il SINEUP 02, mostrandosi il più efficiente (**Fig. 36**).

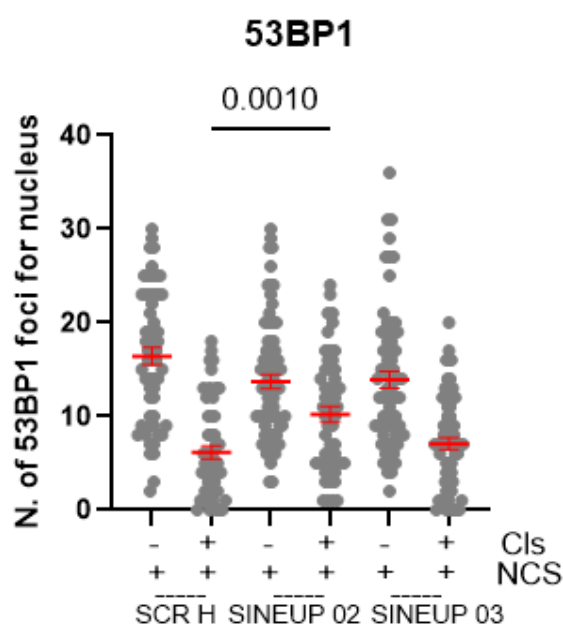


Figura 36: La quantificazione del n. dei foci di 53BP1 per nucleo è stato fatto tramite il software Cell profiler e la significatività riportata è ottenuta tramite statistica tra quattro esperimenti indipendenti. Il SINEUP 02 mostra un valore significativo nell'aumento del n. di foci di 53BP1 rispetto al controllo.

L'aumento dei foci di 53BP1 nei campioni trattati con SINEUP, in concomitanza con la riduzione di γ H2AX, indica che il ripristino dei livelli di CHK1 non si limita a prevenire il danno, ma promuove attivamente l'efficienza della risposta cellulare. Questo risultato suggerisce che il recupero della chinasi permetta di superare il blocco della DDR indotto dalle inclusioni citoplasmatiche, favorendo il corretto reclutamento dei fattori di riparazione e portando, di conseguenza, a una risoluzione più efficace delle rotture del DNA.

5. Discussione e Conclusioni

Questo elaborato si propone di valutare approcci terapeutici basati su RNA non codificanti SINEUP, finalizzati a stimolare la traduzione proteica di un fattore coinvolto nella risposta al danno al DNA, la cui espressione risulta downregolata in modelli di sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Lo studio si inserisce nel solco delle ricerche condotte negli ultimi anni dal gruppo presso il quale ho svolto la mia tesi, che hanno portato alla caratterizzazione dei difetti della risposta al danno al DNA responsabili dell'accumulo di lesioni genomiche nelle cellule affette da aggregazione proteica. In particolare, tali alterazioni sono associate all'accumulo di proteine quali FUS e TDP-43, fattori strettamente coinvolti nella patogenesi della SLA e altre malattie neurodegenerative. Nelle cellule proliferanti, la risposta al danno al DNA dispone di diversi pathway di riparazione delle lesioni a doppio filamento che sono diversamente coordinati nelle varie fasi del ciclo cellulare: I principali sono l'HR, attiva prevalentemente in fase S e G2 del ciclo cellulare e quindi maggiormente utilizzata da cellule proliferanti e il NHEJ attivo in tutte le fasi del ciclo compresa la fase G1 e G0 delle cellule terminalmente differenziate e post-mitotiche. Nei neuroni differenziati in fase G0, ad esempio l'omologia di sequenza fornita dal cromatidio fratello è assente, relegando l'intera fedeltà del riparo genomico all'efficienza della via NHEJ. In condizioni fisiologiche, questo processo richiede una finissima coordinazione molecolare orchestrata da chinasi e fattori regolatori che rilevano la lesione, ne segnalano la presenza e reclutano i complessi enzimatici deputati alla risaldatura delle estremità tronche. Nel contesto patologico della SLA, la DDR va incontro a un collasso multifattoriale. La SLA è ormai riconosciuta come una proteinopatia in cui ribonucleoproteine chiave nel metabolismo dell'RNA, quali FUS e TDP-43, subiscono una transizione di fase aberrante, abbandonando il compartimento nucleare per accumularsi sotto forma di inclusioni citoplasmatiche insolubili e tossiche. Fisiologicamente, FUS e TDP-43 svolgono un ruolo attivo anche nel nucleo durante le fasi precoci della DDR, cooperando nella prevenzione dell'accumulo di ibridi DNA:RNA potenzialmente genotossici e favorendo l'azione di diversi sensori delle lesioni a doppio filamento del DNA, sostenendo in questo modo la riparazione del danno stesso. La loro aggregazione nel citoplasma esercita un duplice effetto deleterio: da un lato

determina un guadagno di funzione tossica citoplasmatica, dall'altro provoca una perdita di funzione nucleare. Le indagini condotte presso il nostro laboratorio hanno identificato un nodo cruciale in questa cascata di eventi patologici e potenzialmente genotossici: la deplezione nucleare dovuta ad eccessiva degradazione da parte del proteasoma della chinasi CHK1 in assenza di una alterata regolazione della trascrizione del gene per CHK1 ne una de-regolazione del suo splicing alternativo. Sebbene storicamente studiata per il suo ruolo nella transizione delle fasi del ciclo cellulare (checkpoint G2/M e intra-S), CHK1 si è rivelata in diversi studi recenti essere un fattore fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni differenziati. In cellule in fase G1-G0 inoltre regola l'asse ATM/CHK1/ASF1A necessario per la ristrutturazione cromatinica e il reclutamento del fattore protettivo 53BP1 sui siti di danno. Ne consegue che la perdita di CHK1 indotta da inclusioni citoplasmatiche di FUS e TDP-43, determina l'accumulo di DSB persistenti. Da queste premesse nasce il rationale sperimentale della presente tesi: analizzare nel dettaglio l'impatto di tali aggregati sulla DDR e validare l'efficacia terapeutica della tecnologia SINEUP per indurre un rescue traduzionale di CHK1. Il dato fenotipicamente più dirompente è emerso a seguito del trattamento con il farmaco radiomimetico Neocarzinostatina: nelle cellule sane adiacenti (prive di inclusi), lo stimolo genotossico ha indotto la fisiologica e corretta focalizzazione del fattore orchestratore 53BP1 sui siti di lesione. Al contrario, nelle cellule contenenti le CI di FUS P525L, la formazione dei foci di 53BP1 è risultata completamente inibita. Poiché 53BP1 è indispensabile nel NHEJ per proteggere le estremità tronche del DNA dalla resezione esonucleasica aberrante e per favorire il reclutamento del complesso Ku70/Ku80-DNA-PKcs, la sua mancata focalizzazione nucleare certifica un blocco strutturale e funzionale della via di riparo. Nel nostro recente lavoro pubblicato nel 2026 sulla rivista *Cell Death and Disease* del gruppo Nature, abbiamo dimostrato che una causa di tale blocco è la riduzione dei livelli nucleari della proteina CHK1, osservata nelle cellule con inclusioni di FUS. Al fine di comprendere il livello di de-regolazione della chinasi, abbiamo inizialmente valutato i livelli di trascritti di CHK1. L'isolamento delle popolazioni cellulari mediante sorting e la successiva analisi trascrizionale tramite RT-qPCR hanno

dimostrato che i livelli di mRNA di CHK1 rimangono stabili e invariati sia in presenza di FUS WT che di FUS P525L che in linee cellulari derivanti da pazienti sporadici di SLA con proteinopatie di TDP-43 endogena. Questo risultato esclude un difetto di efficienza trascrizionale del gene CHK1, spostando l'attenzione su un meccanismo patologico post-traduzionale. Un'ipotesi che abbiamo voluto testare è se la perdita dei livelli nucleari di CHK1 sia dovuta ad una degradazione proteasomica accelerata indotta dallo stress proteotossico indotto dalle inclusioni. Questo scenario trova conferma nei risultati ottenuti dallo studio parallelo condotto su TDP-43. La sovraespressione massiva (pari a circa 8 volte rispetto ai livelli basali) sia della variante TDP-43 WT che delle varianti mutate associate a forme familiari di SLA (A382T, I383V, M337V) ha indotto una down-regulation di CHK1 e un corrispondente accumulo di γ H2AX del tutto sovrapponibili. Di contro, le cellule che esprimevano tali varianti ma che non sviluppavano aggregati morfologicamente visibili mantenevano livelli fisiologici di CHK1 e una DDR funzionale. L'equivalenza fenotipica tra la TDP-43 WT aggregata, che costituisce il marker patologico del 97% dei casi di SLA sporadica, e le varianti mutate dimostra l'universalità del meccanismo identificato: l'aggregazione citoplasmatica esercita un effetto di perdita di funzione nucleare dominante che converge sulla deplezione di CHK1 come hub patogenetico comune della neurodegenerazione nella SLA familiare e sporadica. E' importante notare che la formazione di inclusioni citoplasmatiche colocalizzanti con marcatori di stress granules potrebbe ridurre l'efficienza della traduzione proteica. E' quindi possibile che la degradazione tramite il proteasoma in condizione di ridotta sintesi di nuova proteina possa contribuire a ridurre progressivamente i livelli di CHK1 fin sotto un livello soglia tollerato dalla cellula. In questo quadro di severa vulnerabilità cellulare si inserisce il successo terapeutico ottenuto mediante l'applicazione della tecnologia SINEUP. La trasfezione di lncRNA sintetici SINEUP ingegnerizzati specificamente contro il trascritto di CHK1 ha permesso di ottenere una up-regolazione controllata e selettiva della chinasi. Sfruttando il dominio di legame antisense accoppiato all'elemento ripetitivo SINEB2, il SINEUP ha incrementato l'efficienza di traduzione del pool di mRNA endogeno di CHK1 sopravvissuto nel citoplasma. Dal punto di vista biotecnologico, questo approccio offre vantaggi

rispetto al gene-delivery tradizionale: non richiede la trascrizione di transgeni esogeni lunghi e difficili da far pervenire nel sistema nervoso centrale e previene gli effetti tossici derivanti da una sovraespressione massiva e incontrollata di proteine della DDR che devono essere finemente regolate. La sovraespressione di CHK1 infatti è tossica (Zhang et al., 2005). Il ripristino dei livelli proteici di CHK1 mediato da SINEUP si è tradotto in un rescue funzionale dei fenotipi patologici di accumulo di danno al DNA. La riabilitazione dei livelli della chinasi ha riattivato la segnalazione a valle nella DDR, ripristinando la corretta focalizzazione nucleare del fattore 53BP1 in risposta allo stress indotto da NCS. Di conseguenza, la riattivazione della via NHEJ ha permesso una rapida riparazione delle DSB, evidenziata dalla riduzione del segnale pan-nucleare di γ H2AX. La tecnologia SINEUP ha quindi dimostrato di poter interrompere l'asse patologico, restituendo alle cellule la capacità di difendere la propria integrità genomica nonostante la persistenza degli aggregati proteici a monte. In conclusione, il lavoro mette in evidenza come la SLA possa essere interpretata non solo come una patologia dell'RNA o della proteostasi, ma anche come una malattia causata da stress genotossico. L'interazione tra aggregazione proteica, disfunzione della DDR e degradazione aberrante di CHK1 delinea un quadro patogenetico integrato, nel quale la compromissione dei sistemi di sorveglianza cellulare accelera il declino neuronale. Questa prospettiva apre la strada a possibili strategie terapeutiche mirate a ristabilire l'equilibrio proteostatico e a preservare l'integrità del genoma, con l'obiettivo di rallentare o contrastare la progressione della malattia.

Prospettive future

Avendo dimostrato l'efficacia dei SINEUP specifici per il trascritto umano di CHK1, il passo immediatamente successivo prevede l'estensione di questa analisi ai modelli murini. Sono già stati progettati e sono attualmente pronti per la validazione sperimentale costrutti SINEUP diretti contro l'mRNA murino di Chek1. Questi strumenti consentiranno di verificare la conservazione del meccanismo di rescue traduzionale in linee cellulari di topo, come le HT-22 in cui può essere indotto il fenotipo patologico. La validazione *in vitro* nel sistema

murino porrà le basi necessarie per la successiva sperimentazione in vivo su modelli animali di SLA (quali i topi transgenici TDP-43 o FUS), tappe fondamentali per valutare l'impatto della terapia sulla progressione della neurodegenerazione e sul recupero del fenotipo motorio. Infatti, la ricerca futura si focalizzerà sull'ingegnerizzazione di vettori virali, sfruttando il fatto che i plasmidi utilizzati in questo studio contengono già le sequenze e gli elementi strutturali necessari per il packaging. I vettori lentivirali (LV) verranno impiegati per veicolare il SINEUP umano, ottimizzando l'efficienza di trasduzione in modelli cellulari complessi a lungo termine, come i motoneuroni derivati da iPSC umane. Il costrutto SINEUP murino invece verrà clonato all'interno di vettori adeno-associati (AAV). Questo approccio potrà permettere la somministrazione intracerebrale o intratecale in vivo, garantendo un'espressione sostenuta e sicura del lncRNA nel sistema nervoso centrale dei modelli murini. Dal punto di vista biotecnologico, sono attualmente in fase di progettazione nuove varianti di SINEUP ingegnerizzate per presentare una stabilità intracellulare incrementata e una superiore affinità di legame verso il trascritto bersaglio, allo scopo di potenziarne ulteriormente l'output traduzionale. Quindi un'altra prospettiva futura potrebbe essere quella di combinare i costrutti SINEUP più efficienti in modo da massimizzare il recupero della chinasi CHK1 a ridosso dei siti di danno e offrendo una protezione definitiva contro lo stress proteotossico e la morte neuronale.

6. Bibliografía

Abbas, T., Keaton, M. A., & Dutta, A. (2013). Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(3), a012914. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012914>

Abuetabh, Y., Wu, H. H., Chai, C., Al Yousef, H., Persad, S., Sergi, C. M., & Leng, R. (2022). DNA damage response revisited: The p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Experimental & Molecular Medicine*, **54**(10), 1658–1669. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00863-4>

Adolph, M. B., Mohamed, T. M., Balakrishnan, S., Xue, C., Morati, F., Modesti, M., Greene, E. C., Chazin, W. J., & Cortez, D. (2021). RADX controls RAD51 filament dynamics to regulate replication fork stability. *Molecular Cell*, **81**(5), 1074-1083.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.036>

Aguilera, A., & García-Muse, T. (2012). R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molecular Cell*, **46**(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.009>

Altmeyer, M., Neelsen, K. J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Grøfte, M., Rask, M. B. D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M. L., & Lukas, J. (2015). Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). *Nature Communications* 2015, **6**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9088>

Ayala, Y. M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S. E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2011). TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO journal*, **30**(2), 277–288. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.310>

- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017, **18**(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J., Koppers, M., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, **125**(6), 777-794. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
- Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(4), 297–308. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>
- Britton, S., Coates, J., & Jackson, S. P. (2013). A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *Journal of Cell Biology*, **202**(3), 579–595. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303073>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *New England Journal of Medicine*, **377**(2), 162-172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, **9**(8), 619–631. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., Golland, P., Sabatini, D.M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **7**, R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., Santoro, C., Forrest, A. R., Carninci, P., Biffo, S., Stupka, E., & Gustincich, S. (2012). Long non-coding antisense RNA controls

Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, **491**(7424), 454–457. <https://doi.org/10.1038/nature11508>

Chen, C.-C., Feng, W., Lim, P. X., Kass, E. M., & Jasin, M. (2018). *Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer*. *Annual Review of Cancer Biology*, **2**(1), 313-336. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-030617-050502>

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, **40**(2), 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>

Ciechanover, A., & Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine*, **47**(3), e147-e147. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.117>

Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**(11), 806-819. <https://doi.org/10.1038/35097565>

Conte, A., Lattante, S., Zollino, M., Marangi, G., Luigetti, M., Del Grande, A., Servidei, S., Trombetta, F., Sabatelli, M. (2012). P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **22**, 73–75. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.08.003>

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, **17**(10), 1195-1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>

D’Ambra, E., Santini, T., Vitiello, E., D’Uva, S., Silenzi, V., Morlando, M., Bozzoni, I. (2021). Circ-Hdgfrp3 shuttles along neurites and is trapped in

aggregates formed by ALS-associated mutant FUS. *iScience*, **24**, 103504. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103504>

Don, E.K., Maschirow, A., Radford, R.A.W., Scherer, N.M., Vidal-Itriago, A., Hogan, A., Maurel, C., Formella, I., Stoddart, J.J., Hall, T.E., Lee, A., Shi, B., Cole, N.J., Laird, A.S., Badrock, A.P., Chung, R.S., Morsch, M. (2021). In vivo Validation of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) to Investigate Aggregate Formation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Mol. Neurobiol.*, **58**, 2061–2074. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02238-0>

Ferretti, L. P., Lafranchi, L., & Sartori, A. A. (2013). Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Frontiers in Genetics*, **4**, 52907. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2013.00099>

Ghodke, I., Remisova, M., Furst, A., Kilic, S., Reina-San-Martin, B., Poetsch, A. R., Altmeyer, M., & Soutoglou, E. (2021). AHNAK controls 53BP1-mediated p53 response by restraining 53BP1 oligomerization and phase separation. *Molecular Cell*, **81**(12), 2596. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.04.010>

Goldstein, M., & Kastan, M. B. (2015). The DNA damage response: Implications for tumor development and treatment. *Annu. Rev. Med.*, **66**, 129–143. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-081313-121208>

Grundy, G. J., Rulten, S. L., Arribas-Bosacoma, R., Davidson, K., Kozik, Z., Oliver, A. W., Pearl, L. H., & Caldecott, K. W. (2016). The Ku-binding motif is a conserved module for recruitment and stimulation of non-homologous end-joining proteins. *Nature Communications*, **7**(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11242>

Gusho, E., & Laimins, L. (2021). Human Papillomaviruses Target the DNA Damage Repair and Innate Immune Response Pathways to Allow for Persistent Infection. *Viruses*, **13**(7), 1390. <https://doi.org/10.3390/v13071390>

- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Disease primers*, **3**, 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, **361**(15), 1475-1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Huang, R., & Zhou, P. K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**(1), 1-27. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>
- Iyama, T., & Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, **12**(8), 620-636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>
- Iyer, D. R., & Rhind, N. (2017). The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes*, **8**(2), 74. <https://doi.org/10.3390/genes8020074>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jin, J., Shirogane, T., Westmuckett, L., Gallegos, G., Michelman, R. I., Tornatore, J., Blue, S. K., Schmidt, S. L., Yoshida, K., Zhang, Y., Anamoto, T., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2003). SCF β -TRCP mediated degradation of Cdc25A regulates the G1/S checkpoint. *Genes & Development*, **17**(24), 3062-3074. <https://doi.org/10.1101/gad.1157503>
- Karakaidos, P., Karagiannis, D., & Rampias, T. (2020). Resolving DNA Damage: Epigenetic Regulation of DNA Repair. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**(11), 2496. <https://doi.org/10.3390/molecules25112496>

Khan, F. A., & Ali, S. O. (2017). Physiological roles of DNA double-strand breaks. *Journal of Nucleic Acids*, **2017**, Article 6439169. <https://doi.org/10.1155/2017/6439169>

Kilic, S., Lezaja, A., Gatti, M., Bianco, E., Michelena, J., Imhof, R., & Altmeyer, M. (2019). Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *The EMBO Journal*, **38**(16), e101379. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101379>

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Y-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, **36**(18), 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>

Kuchenbaecker, K. B., et al. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, **317**(23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>

Lagerwerf, S., Vrouwe, M. G., Overmeer, R. M., Fouteri, M. I., & Mullenders, L. H. (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair*, **10**(7), 743–750. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2011.04.024>

Lee, K. Y., & Dutta, A. (2021). Chk1 promotes non-homologous end joining in G1 through direct phosphorylation of ASF1A. *Cell Reports*, **34**(4), 108680. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108680>

Levone, B. R., Lenzken, S. C., Antonaci, M., Maiser, A., Rapp, A., Conte, F., Reber, S., Mechttersheimer, J., Ronchi, E. A., Mühlemann, O., Leonhardt, H., Cardoso, M. C., Ruepp, M. D., & Barabino, S. M. L. (2021). FUS-dependent liquid–liquid phase separation is important for DNA repair initiation. *Journal of Cell Biology*, **220**(5), e202008030. <https://doi.org/10.1083/jcb.202008030>

Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **65**, 127–134. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>

Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, **355**(6330), 1152–1158. <https://doi.org/10.1126/science.aam7344>

Mastrocola, A. S., Kim, S. H., Trinh, A. T., Rodenkirch, L. A., & Tibbetts, R. S. (2013). The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, **288**(34), 24731–24741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497974>

Modafferi, S., Farina, S., Esposito, F., Brandi, O., Di Salvio, M., Della Valle, I., D'Uva, S., Scarian, E., Cicio, G., Riccardi, A., Pisati, F., Garbelli, A., Santini, T., Pansarasa, O., Morlando, M., D'Ambrosi, N., Cozzolino, M., Cestra, G., d'Adda di Fagagna, F., Gioia, U., ... Francia, S. (2025). DNA damage response defects induced by the formation of TDP-43 and mutant FUS cytoplasmic inclusions and their pharmacological rescue. *Cell death and differentiation*, **32**(12), 2309–2322. <https://doi.org/10.1038/s41418-025-01530-7>

Modafferi, S., Silenzi, V., Garbelli, A. et al. (2026). Proteasomal-dependent CHK1 degradation leads to DNA damage accumulation in ALS cellular model systems. *Cell Death Dis.* <https://doi.org/10.1038/s41419-026-08603-6>

Nedelsky, N. B., & Taylor, J. P. (2022). Pathological phase transitions in ALS-FTD impair dynamic RNA-protein granules. *RNA (New York, N.Y.)*, **28**(1), 97–113. <https://doi.org/10.1261/rna.079001.121>

Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, **314**(5796), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>

Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlow, A., Naujock, M., Günther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., Reinhardt, P., Sternecker, J., Frickenhaus, M., Pan-Montojo, F., Storkebaum, E., Poser, I., Freischmidt, A., Weishaupt, J.H., Holzmann, K., Troost, D., Ludolph, A.C., Boeckers, T.M., Liebau, S., Petri, S., Cordes, N., Hyman, A.A., Wegner, F., Grill, S.W., Weis, J., Storch, A., Hermann, A. (2018). Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. *Nat. Commun.*, **9**, 335. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02299-1>

O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M., & Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2. *The EMBO Journal*, **16**(3), 545–554. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.3.545>

O'Connor M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular cell*, **60**(4), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>

Ochi, T., Blackford, A. N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., ... & Blundell, T. L. (2015). PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science*, **347**(6218), 185–188. <https://doi.org/10.1126/science.1261971>

Pabla, N., Bhatt, K., & Dong, Z. (2012). Checkpoint kinase 1 (Chk1)-short is a splice variant and endogenous inhibitor of Chk1 that regulates cell cycle and DNA damage checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(1), 197-202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104767109>

Patel, A. G., Sarkaria, L. H., & Kaufmann, S. H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor toxicity in BRCA1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, **108**(8), 3406–3411. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1013715108>

Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: A focus on protein modifications. *Genes & Development*, **25**(5), 409–433. <https://doi.org/10.1101/gad.2021311>

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S. C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Yeo, G. W., & Cleveland, D. W. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience*, **14**(4), 459–468. <https://doi.org/10.1038/nn.2779>

Posavec Marjanović, M., Crawford, K., & Ahel, I. (2017). PARP, transcription and chromatin modeling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **63**, 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.09.014>

Quinn, C., & Elman, L. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. *Continuum*, **26**(5), 1323–1347. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000911>

Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18**(10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>

Rossi, S., Milani, M., Della Valle, I. *et al.* Cytoplasmic accumulation of a splice variant of hnRNPA2/B1 contributes to FUS-associated toxicity in a mouse model of ALS. *Cell Death Dis* **16**, 219 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07538-8>

Rummens, J., Da Cruz, S. (2025). RNA-binding proteins in ALS and FTD: from pathogenic mechanisms to therapeutic insights. *Mol Neurodegeneration* **20**, 64. <https://doi.org/10.1186/s13024-025-00851-y>

Scarian, E., Bordoni, M., Fantini, V., Jacchetti, E., Raimondi, M.T., Diamanti, L., Carelli, S., Cereda, C., Pansarasa, O. (2022). Patients' Stem Cells Differentiation in a 3D Environment as a Promising Experimental Tool for the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5344. <https://doi.org/10.3390/ijms23105344>

Schärer, O. D. (2013). Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(10), a012609. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>

Schwartz, J. C., Ebmeier, C. C., Podell, E. R., Heimiller, J., Taatjes, D. J., & Cech, T. R. (2012). FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2. *Genes & development*, **26**(24), 2690–2695. <https://doi.org/10.1101/gad.204602.112>

Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>

Sirbu, B. M., & Cortez, D. (2013). DNA damage response: Channelling to repair, cell cycle checkpoints and apoptosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(4), a012724. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012724>

Smith, H.L., Southgate, H., Tweddle, D.A., Curtin, N.J. (2020). DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Rev. Mol. Med.*, **22**, e2. <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>

Smits, V. A., & Gillespie, D. A. (2015). Novel Insights into Chk1 Regulation by Phosphorylation. *Cell Structure and Function*, **40**(1), 43-51. <https://doi.org/10.1247/csf.14017>

- Stinson, B. M., & Loparo, J. J. (2021). Repair of DNA double-strand breaks by the nonhomologous end joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, **90**, 137–164. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-080320-110356>
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, **539**(7628), 197-206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, **6**, 157. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>
- Traven, A., & Heierhorst, J. (2005). SQ/TQ cluster domains: Concentrated zones of phospho-signaling in response to DNA damage and other cellular stresses. *BioEssays*, **27**(4), 397–407. <https://doi.org/10.1002/bies.20204>
- Tubbs, A., & Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability. *Cell*, **168**(4), 644-656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
- Wang, Y. L., Zhao, W. W., Bai, S. M., Feng, L. L., Bie, S. Y., Gong, L., Wang, F., Wei, M. B., Feng, W. X., Pang, X. L., Qin, C. L., Yin, X. K., Wang, Y. N., Zhou, W., Wahl, D. R., Liu, Q., Chen, M., Hung, M. C., & Wan, X. B. (2022). MRNIP condensates promote DNA double-strand break sensing and end resection. *Nature Communications* 2022, **13**(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30303-w>
- Wang, Y. L., Zhao, W. W., Shi, J., Wan, X. B., Zheng, J., & Fan, X. J. (2023). Liquid-liquid phase separation in DNA double-strand breaks repair. *Cell Death & Disease* 2023, **14**(11), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06267-0>
- Welch, G. M., & Tsai, L. H. (2022). Mechanisms of DNA damage-mediated neurotoxicity in neurodegenerative disease. *EMBO Reports*, **23**(6), e54217. <https://doi.org/10.15252/embr.202154217>

- Wolozin, B., Ivanov, P. (2019). Stress granules and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, **20**, 649–666. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0222-5>
- Wu, D., Zhang, P., Li, F., Shen, Y., Chen, H., Feng, Y., He, A., & Wang, F. (2020). CD138⁺ multiple myeloma cells express high level of CHK1 which correlated to overall survival in MM patient. *Aging*, **12**(22), 23067–23081. <https://doi.org/10.18632/aging.104066>
- Ye, W., & Blain, S. W. (2011). Chk1 has an essential role in the survival of differentiated cortical neurons in the absence of DNA damage. *Apoptosis*, **16**(5), 514-524. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0579-z>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, **16**(1), 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2891>
- Zhang, Y.-W., Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W., Liu, Y.-C., Mercurio, F., Abraham, R.T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell.*, **19**, 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.019>
- Zhang, Y. W., Brognard, J., Coughlin, C., et al. (2009). The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. *Molecular Cell*, **35**(4), 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.030>
- Zhang, Y., & Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer*, **134**(5), 1013–1023. <https://doi.org/10.1002/ijc.28226>
- Zucchelli, S., Cotella, D., Takahashi, H., Carrieri, C., Cimatti, L., Fasolo, F., Jones, M. H., Sblattero, D., Sanges, R., Santoro, C., Persichetti, F., Carninci, P., & Gustincich, S. (2015). SINEUPs: A new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation. *RNA biology*, **12**(8), 771–779. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1060395>