



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Riorganizzazione cromatinica durante stress ossidativo: studio
in un modello in vitro di epatociti murini

Relatore:

Dr. Claudio Casali

Correlatore:

Dr. Adel Diaf

Tesi Sperimentale di
Davide Ardizzi

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	4
I. INTRODUZIONE	7
1. IL NUCLEO CELLULARE	7
1.1 L'ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA	11
1.2 TRASCRIZIONE E PROCESSAMENTO DEGLI RNA	16
2. EPIGENETICA	20
2.1 LA METILAZIONE DEL DNA.....	21
2.2 LE MODIFICHE ISTONICHE POST-TRADUZIONALI	25
3. STRESS OSSIDATIVO	31
3.1 STRESS OSSIDATIVO NEGLI EPATOCITI.....	36
3.2 IL BROMATO DI POTASSIO	38
4. RISPOSTA CROMATINICA ALLO STRESS OSSIDATIVO	42
II. SCOPO DEL LAVORO	49
III. MATERIALI E METODI	50
1. COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTO	50
2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM).....	50
3. IMMUNOCITOCHIMICA PER MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE: IMMUNOGOLD	51
4. TECNICHE DI STAINING PER LA MICROSCOPIA ELETTRONICA	52
4.1 EDTA REGRESSIVE TECHNIQUE.....	52
4.2 AMMINA D'OSMIO	52
5. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E IMMUNOCITOCHIMICA PER MICROSCOPIA A FLUORESCENZA.....	53
6. LIVE-CELL IMAGING	53
7. ANALISI STATISTICHE E PROCESSAMENTO DATI.....	54
IV. RISULTATI	55
1. IL TRATTAMENTO CON KBrO ₃ INDUCE γ -H2AX OLTRE A 8-oxoG	55
2. IL TRATTAMENTO CON KBrO ₃ ALTERA LO STATO DELLA CROMATINA	55

3. RIDUZIONE DI MARCATORI EPIGENETICI ISTRUTTIVI PER L'ESPRESSIONE GENICA	57
4. IL TRATTAMENTO CON KBrO_3 ALTERA LA TRASCRIZIONE E IL PROCESSAMENTO DEGLI RNA.....	58
5. RIDUZIONE NEI LIVELLI DI METILAZIONE NELLA FORMA DELLA 5mC.....	59
6. ANALISI DEI CLUMPS DI ETEROCROMATINA	61
V. DISCUSSIONE	65
VI. CONCLUSIONE	70
VII. BIBLIOGRAFIA	72

ABSTRACT

Il bromato di potassio (KBrO_3) è un agente ossidante in grado di generare come danno primario l'ossidazione delle guanine a 8-oxoguanina (8-oxoG), e in quantità minore altre tipologie di danno quali *double strand breaks* (DSBs). Ancora oggi l'ampio utilizzo di KBrO_3 come additivo alimentare in diversi Paesi nel mondo, il suo utilizzo nell'industria cosmetica e farmaceutica rendono particolarmente interessante lo studio degli effetti di questa sostanza ossidante. Per questo studio sono state utilizzate cellule epatiche murine AML-12 (alpha mouse liver 12), in considerazione di più motivi: gli epatociti presentano un alto livello trascrizionale, che li rende un modello ideale per lo studio dell'alterazione dell'espressione genica; gli epatociti presentano elevati livelli di glutathione, fondamentale per lo sviluppo di queste cellule, e che rappresenta un intermedio nel processo di ossidazione delle guanine a 8-oxoG tramite KBrO_3 ; le cellule AML-12 sono considerate un gold standard come modello di studio di fegato ed epatociti per le loro caratteristiche metaboliche, strutturali e morfologiche che le rendono paragonabili ad epatociti primari. Sulla base delle nostre conoscenze, infatti, gli effetti di KBrO_3 sulle modifiche epigenetiche e sull'organizzazione della cromatina in cellule epatiche non sono ancora stati investigati, nonostante il fegato rappresenti un organo fondamentale per lo svolgimento di una moltitudine di processi cellulari: per tali motivi, in questo progetto di Tesi sono stati valutati gli effetti dello stress ossidativo indotto da KBrO_3 sui cambiamenti epigenetici e sulle modifiche all'organizzazione della cromatina, che giocano un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica.

Precedentemente a questo lavoro di Tesi, nel nostro laboratorio, è stata quantificata la formazione di 8-oxoG, oltre ad altri parametri quali stress replicativo ed eventuali alterazioni cellulari, in cellule AML-12 trattate con KBrO_3 , per determinarne le concentrazioni di utilizzo. Inizialmente, quindi, con la tecnica dell'immunogold labelling, è stata confermata la formazione di DSBs indotti da KBrO_3 attraverso l'analisi del marcatore $\gamma\text{-H2AX}$, rappresentante la fosforilazione della serina 139 dell'istone H2AX, uno dei primi eventi per la segnalazione e la riparazione del danno al DNA. Il rimodellamento cromatinico è stato valutato con analisi ultrastrutturali svolte tramite staining con ammina d'osmio (OA), che hanno evidenziato come il trattamento con KBrO_3 induca un aumento della condensazione della cromatina, accompagnato dalla formazione di nuovi cluster di eterocromatina. Nel periodo di recovery post-trattamento la cromatina si decondensa, con riduzione nel numero di cluster. In letteratura, un comportamento analogo è stato riscontrato sia in cellule HeLa trattate con KBrO_3 che in altre tipologie cellulari sottoposte a stress termico. Per investigare potenziali alterazioni

generali nell'espressione genica è stato effettuato un esperimento di pulse-chase con 5-bromouridina (BrU), incorporata nell'RNA nascente al posto dell'uracile. L'analisi di immunofluorescenza ha evidenziato una riduzione del segnale fluorescente della BrU, mostrando un calo nell'attività trascrizionale in seguito al trattamento con KBrO₃ e una graduale ripresa nel successivo periodo di recovery. Inoltre, l'analisi sul marcaggio di hnRNP A/B ha mostrato una riduzione di questi fattori coinvolti in diversi processi di maturazione degli RNA. I dati ottenuti sul profilo epigenetico tramite immunogold labelling sono particolarmente interessanti. Le analisi sulla modifica istonica H3K4me₃ e la modifica epigenetica del DNA 5hmC, associate ad un profilo generalmente favorevole alla trascrizione, hanno mostrato una riduzione significativa del marcaggio a seguito del trattamento con KBrO₃. Tuttavia, appaiono discordanti i dati sulle ulteriori analisi della metilazione del DNA, che vedono una perdita globale di 5mC e della *de novo* metiltransferasi DNMT3A. Questi dati inseriti nel contesto di condensazione cromatinica e riduzione dell'attività trascrizionale introducono un quadro generale piuttosto complesso. Considerata singolarmente, la 5mC, modifica associata al silenziamento genico e ad una cromatina più compatta non può quindi giustificare in questo scenario la formazione di cluster di cromatina condensata dovuta al trattamento con KBrO₃. Probabilmente la 5mC non rappresenta la principale modifica responsabile della compattazione della cromatina qui descritta, suggerendo che altre modifiche epigenetiche, ad oggi non investigate, possano esserne la causa. L'analisi a livello ultrastrutturale dei cluster di eterocromatina ha evidenziato come essi risultino arricchiti alla loro periferia per i marcatori γ -H2AX e H3K4me₃. In letteratura è ampiamente riportato come, in diversi modelli, i foci di danno marcati con γ -H2AX vengano spostati alla periferia dei cluster per facilitare l'accesso del macchinario di segnalazione e riparo ai siti di DSBs e ridurre la probabilità di errori nella riparazione; mentre, il mantenimento del marcatore H3K4me₃ alla periferia dei cluster sembrerebbe promuovere la riparazione del danno reclutando fattori coinvolti nel pathway NHEJ (*non-homologous end-joining*): difetti nella metilazione di H3K4, infatti, riducono drasticamente il tasso di successo del NHEJ. Infine, lo studio sulla dinamica dei cluster di eterocromatina con live-cell imaging ha evidenziato il loro spostamento presso l'involucro nucleare e, come descritto in letteratura, questo evento potrebbe essere compreso nell'insieme dei meccanismi che governano la riparazione del danno al DNA, per garantire una riparazione non aberrante di cluster di sequenze ripetute. Future analisi potranno essere indirizzate a delineare in modo più completo il cambiamento del profilo epigenetico, il coinvolgimento di specifici geni e RNA, e la caratterizzazione più approfondita dei cluster di eterocromatina, per investigare il legame tra stress ossidativo, organizzazione della cromatina e regolazione dell'espressione genica.

I. INTRODUZIONE

1. IL NUCLEO CELLULARE

Le cellule eucariotiche differiscono da quelle procariotiche per la presenza di un nucleo ben definito. Il nucleo è una struttura che agisce come centro di controllo e di regolazione di diverse funzioni cellulari come la replicazione del DNA, la trascrizione e il processamento degli RNA (Y. Li et al., 2024).

Il nucleo è separato dal citoplasma attraverso un sistema di due membrane: la membrana nucleare esterna (MNE) e la membrana nucleare interna (MNI), che insieme formano l'involucro nucleare (*nuclear envelope*, NE). La MNE è in continuità con il reticolo endoplasmatico (RE) e si interfaccia con il citoplasma mentre la MNI si interfaccia con il nucleoplasma (De Magistris & Antonin, 2018). L'involucro nucleare presenta molti siti in cui sono inseriti grandi complessi proteici chiamati complessi del poro nucleare (*nuclear pore complex*, NPC), che giocano un ruolo fondamentale nel flusso regolato dell'informazione genica dalla trascrizione alla traduzione grazie al trasporto selettivo di macromolecole, come gli RNA messaggeri (mRNA), attraverso il NE. I NPC sono strutture larghe circa 50 nm e formate da quasi 1000 proteine, chiamate nucleoporine (*nucleoporins*, Nups), per un peso molecolare totale di circa 110 MDa (Petrovic et al., 2022). Le nucleoporine che compongono la struttura del NPC sono definite stazionarie e sono suddivise in due categorie: le Nups scaffold, che sono importanti componenti strutturali, e le FG-Nups, che sono ricche in ripetizioni fenilalanina-glicina (FG) (Hampoelz, Andres-Pons, Kastiris, & Beck, 2019). Tuttavia, il sistema di trasporto nucleocitoplasmatico, oltre al NPC, comprende i fattori di trasporto nucleare (*nuclear transport factors*, NTFs), proteine mobili, che a loro volta possono essere distinte in recettori di trasporto nucleare (*nuclear transport receptors*, NTRs), che mediano l'interazione tra le proteine cargo e le FG-Nups, e i NTFs ausiliari come la piccola GTPasi Ran, che gioca un ruolo chiave nel meccanismo di trasporto attivo di macromolecole attraverso i complessi del poro nucleare (Hampoelz et al., 2019).

La lamina nucleare è una rete proteica filamentosa con uno spessore di circa 15-20 nm localizzata al di sotto della MNI, è composta da lamine e proteine associate alle lamine, e aiuta a mantenere la stabilità e l'integrità del nucleo. Inoltre, è sempre più evidente il coinvolgimento della lamina nucleare nell'organizzazione del nucleo, nell'organizzazione della cromatina, nonché in diversi processi cellulari come trascrizione, replicazione del

DNA, differenziamento e senescenza (Patil & Sengupta, 2021). Le lamine sono classificate in lamine di tipo A e lamine di tipo B. Alla categoria delle lamine di tipo A appartengono le lamine A e C, codificate dal gene LMNA, mentre alla categoria delle lamine B appartengono le lamine B1 e B2, codificate rispettivamente dai geni LMNB1 e LMNB2 (Chojnowski, Ong, & Dreesen, 2015). Mutazioni nei geni codificanti le lamine sono associate allo sviluppo di patologie chiamate laminopatie, ad esempio mutazioni puntiformi nel gene LMNA possono essere la causa di varie forme di distrofia muscolare, neuropatie, cardiomiopatie dilatative e sindromi da invecchiamento precoce come la progeria di Hutchinson-Gilford (Chojnowski et al., 2015; Y. Li et al., 2024).

Nella maggioranza dei nuclei cellulari di mammifero una significativa porzione di cromatina trascrizionalmente silente è localizzata a ridosso della MNI, e, vista l'associazione con la lamina nucleare, queste regioni sono conosciute come domini associati alla lamina (*Lamina-Associated Domains*, LADs). I LADs sono regioni generalmente inattive da un punto di vista trascrizionale, a replicazione tardiva e povere di geni. L'esatto meccanismo di compattazione vicino al NE, ad oggi, è sconosciuto, nonostante sia chiara l'importanza della lamina nucleare in questo processo; inoltre, sono regioni ricche di modificazioni istoniche repressive come H3K9me2/3 e H4K20me3, o in alcuni casi anche H3K27me3. Molti LADs rimangono costanti tra le diverse tipologie cellulari (costitutivi, cLADs), mentre alcuni LADs possono variare (facoltativi, fLADs); all'interno dei fLADs sono presenti alcuni geni cellula-specifici o geni dello sviluppo che sono inattivi quando posizionati vicino al NE, mentre quando riposizionati a maggior distanza dal NE vengono espressi (Sobo, Alagna, Sun, Wilson, & Reddy, 2024).

La lamina nucleare è collegata alle componenti citoplasmatiche tramite il complesso LINC (*linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton*), una struttura proteica che svolge un ruolo importante nell'organizzazione fisica del genoma e nella sua funzione. Questa connessione consente la rilevazione di stimoli meccanici ambientali e la conseguente regolazione dell'architettura nucleare sia direttamente che tramite il processo di meccano-trasduzione (Wong, Loo, & Stewart, 2021). Le componenti principali del complesso LINC sono proteine contenenti i domini SUN o i domini KASH. Nello specifico, proteine come le nesprine, che contengono domini KASH, sono ancorate alla MNE e interagiscono con le proteine aventi domini SUN che sono inserite a livello della MNI (Y. Li et al., 2024). La nesprina-1 e la nesprina-2 sono codificate da geni grandi e complessi, e a seconda dell'isoforma, interagiscono con le reti di actina o dei microtubuli, mentre la nesprina-3 prende contatto con i filamenti intermedi (Hennen, Saunders, Mueller, & Luxton, 2018).

Lo studio dell'organizzazione del genoma nel nucleo interfase ha portato all'evidenza che i singoli cromosomi occupano regioni ben definite denominate territori cromosomici (*Chromosome Territories*, CTs). Un primo suggerimento dell'organizzazione territoriale dei cromosomi nei nuclei cellulari animali arrivò da Carl Rabl, ma fu successivamente Theodor Boveri nel 1909 a introdurre il concetto di territorio cromosomico grazie ai suoi studi sugli stadi dei blastomeri nel verme *Parascaris Equorum* (T. Cremer & Cremer, 2010). La scoperta dei territori cromosomici non fu accolta con favore dalla comunità scientifica che, tra il 1950 e il 1970, restava ancorata all'idea che la cromatina si mescolasse nel nucleo interfase in maniera casuale, con quello che veniva definito il modello degli "spaghetti". Le evidenze sperimentali dell'esistenza dei CTs arrivarono dagli studi di Cremer et al. nel 1979. Con un elegante esperimento, utilizzarono cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells), irradiate nello stesso punto da un microlaser UV che determinava un danno al DNA, con successiva osservazione delle regioni danneggiate dal laser tramite marcatura con ^3H -timidina. In tale setup sperimentale, il danno è riscontrato sempre nella stessa regione di un singolo cromosoma, e non su cromosomi diversi, suggerendo l'esistenza dei territori cromosomici a discapito del modello degli "spaghetti". Tuttavia, fu solo negli anni '80 con lo sviluppo delle tecniche dell'ibridazione in situ, come la FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), che si poterono osservare i CTs (Fritz, Sehgal, Pliss, Xu, & Berezney, 2019). I cromosomi occupano specifici CTs in un nucleo in interfase e possiedono una distribuzione radiale non casuale che varia in base al tipo cellulare. L'organizzazione radiale dei CTs è stata documentata sia in funzione della densità genica che della dimensione cromosomica. I cromosomi più piccoli e ad alta attività trascrizionale occupano principalmente regioni centrali del nucleo, al contrario cromosomi di dimensioni maggiori e meno densamente ricchi di geni sono segregati verso la periferia, a ridosso della lamina nucleare (Tanabe, Habermann, Solovei, Cremer, & Cremer, 2002; Heride et al., 2010). Questa distribuzione cromosomica nel nucleo ha implicazioni funzionali. La replicazione genica e la macchina dell'espressione genica sono più concentrate al centro del nucleo. I cromosomi ricchi di geni, che tipicamente sono in posizione più centrale, sono replicati precocemente, mentre i cromosomi poveri in contenuto genico, che comunemente sono in posizione periferica, vengono replicati alla fine della fase S del ciclo cellulare (Malyavantham, Bhattacharya, Alonso, Acharya, & Berezney, 2008). I neuroni sensoriali olfattivi utilizzano la periferia nucleare come zona genica repressiva, necessaria per la percezione dell'olfatto. Tuttavia, analisi sulle cellule dei bastoncelli di mammifero hanno rivelato pattern differenti nella distribuzione dei CTs con eterocromatina al centro ed eucromatina alla periferia, essenziali per la visione notturna; per cui la posizione cromosomica va oltre all'organizzazione del

nucleo cellulare, ma è anche importante in diversi processi legati all'omeostasi e alla funzione cellulare (Lima, Lisboa, Terceiro, Rangel-Pozzo, & Mai, 2022). I cromosomi che occupano CTs adiacenti nel nucleo possono interagire, nonostante le interazioni siano mantenute limitate per evitare fenomeni di traslocazione cromosomica. Infatti, la vicinanza di determinati loci genici è positivamente correlata con la loro probabilità di traslocazione. Numerosi eventi di traslocazione cromosomica sono associati all'insorgenza di diverse tipologie di tumori. Un classico esempio è il cromosoma Philadelphia, derivato da un evento di traslocazione tra il cromosoma 9 e il cromosoma 22, che determina la formazione di un nuovo gene di fusione BCR/ABL1, responsabile della leucemia mieloide cronica (CML) (Szczepinska, Rusek, & Plewczynski, 2019).

Il coinvolgimento di alcuni cromosomi nell'interazione con i compartimenti subnucleari gioca un ruolo importante nel posizionamento dei CTs. Ad esempio, i cromosomi definiti acrocentrici (13, 14, 15, 21, 22) sono associati al nucleolo in quanto contribuiscono alla formazione delle regioni organizzatrici nucleolari (*nucleolar organizer regions*, NORs) attraverso i bracci corti (*p-arms*), che contengono principalmente sequenze ripetute di DNA ribosomiale (rDNA) (Lima et al., 2022). Le sequenze di rDNA vengono trascritte in RNA ribosomiale (rRNA) dalla RNA polimerasi I (RNAPI), tramite un processo che richiede altri due elementi, il fattore UBF (*upstream binding factor*) e il complesso TIF1B (Bersaglieri & Santoro, 2019). Il nucleolo ha un'organizzazione interna che riflette gli stadi di biogenesi dei ribosomi, infatti, attraverso la microscopia elettronica (EM) si possono distinguere tre sotto-compartimenti nucleolari: i centri fibrillari, la componente fibrillare densa e la componente granulare. Si ritiene che i centri fibrillari contengano la macchina trascrizionale dell'RNAPI e che la trascrizione avvenga a ridosso della componente fibrillare densa circostante. Le modificazioni degli rRNA nascenti (pre-rRNA) ad opera delle piccole ribonucleoproteine nucleolari (*small nucleolar ribonucleoproteins*, snoRNPs) e il caricamento dei fattori di processamento dei pre-rRNA avviene, invece, nella componente fibrillare densa; mentre, il processamento e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali avviene nella componente granulare prima che queste vengano esportate nel citoplasma attraverso i NPCs (McStay, 2023).

È stato anche studiato come il nucleolo funga da centro sensoriale di una vasta gamma di stimoli dello stress, tra cui rotture del doppio filamento del DNA (*double strand breaks*, DSBs), ipossia, carenza di nutrienti e stress ossidativo. Le proteine nucleolari possono spostarsi tra il nucleolo e il nucleoplasma, e per questa ragione alcune proteine nucleolari, come la nucleofosmina e la nucleostemina, si spostano continuamente per coordinare la funzione di queste proteine all'interno o all'esterno del nucleolo. L'innescò dello stress

nucleolare può portare ad uno spostamento anomalo di queste proteine, determinando il loro rilascio fuori dal nucleolo o la cattura di proteine non-nucleolari. Lo stress nucleolare è stato riconosciuto come un elemento fondamentale nella risposta agli stimoli dello stress attraverso l'attivazione di diverse vie di segnalazione, come i pathway di Mdm2-p53, NF- κ B, HIF-1 α e di segnalazione di danno al DNA (Hua, Yan, Wan, & Hu, 2022). I DSBs e altre forme di danno al DNA portano ad un rallentamento o allo stallo del macchinario di trascrizione della RNAPI. Questo determina una condizione di stress nucleolare che porta all'attivazione dei pathway di segnalazione di danno al DNA. Ad esempio, il 40% delle proteine PARP1 (*poly-ADP ribose polymerase-1*) sono distribuite nel nucleolo, e a seguito del danno al DNA, vengono liberate nel nucleoplasma (Rancourt & Satoh, 2009).

Oltre al nucleolo, esistono altri compartimenti subnucleari che rientrano nella definizione di corpi nucleari (NBs). I NBs sono compartimenti dinamici, non presentano una membrana lipidica e si formano tramite il fenomeno della separazione di fase; questi comprendono: corpi di Cajal (*Cajal bodies*, CBs), nuclear speckle (NS), corpi PML (*promyelocytic nuclear bodies*), paraspeckle e histone locus bodies (Mao, Zhang, & Spector, 2011). I CBs sono coinvolti nelle modificazioni degli small nuclear RNA (snRNAs) e degli small nucleolar RNA (snoRNAs), ma anche nel processamento e nel traffico delle small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) e delle snoRNPs. I NS sono coinvolti nel deposito e nelle modificazioni dei fattori di splicing degli RNA messaggeri nascenti (pre-mRNAs). I corpi PML si occupano del sequestro, della modifica e della degradazione di diverse proteine. Cambiamenti nel numero, nella morfologia o nella composizione dei NBs è strettamente correlata alla loro funzione in condizioni di stress cellulare. I corpi PML, ad esempio, sono stati riconosciuti come regioni sensibili allo stress che intrappolano le regioni telomeriche nel nucleo per la stabilizzazione durante l'apoptosi o la riparazione del danno al DNA (Shan, Li, Yu, & Chen, 2024).

1.1 L'ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA

Poiché il diametro del nucleo cellulare è solitamente di pochi micron, il DNA necessita di un preciso impacchettamento per adattarsi; per questo, il DNA non è libero, ma si trova sotto forma di cromatina. Alla base dell'organizzazione gerarchica della cromatina c'è un'unità strutturale ripetuta, il nucleosoma. Il nucleosoma è composto da un ottamero istonico, formato da due copie ciascuno di quattro istoni (H2A, H2B, H3, H4), attorno al quale sono avvolte 147 paia di basi (bp) di DNA attraverso un'interazione mediata delle code N-terminali degli istoni. Queste unità sono collegate tramite DNA linker, che ha tipicamente una lunghezza di 50 bp, e formano una fibra di cromatina detta "collana di perle"

che ha un diametro di 11 nm (G. Li & Zhu, 2015; Bascom & Schlick, 2017). La densità e il posizionamento dei nucleosomi riportano informazioni importanti per la regolazione della trascrizione genica; ad esempio, le regioni codificanti sono, di solito, densamente ricche di istoni, mentre le regioni dei promotori attivi presentano una minor densità di proteine istoniche (Parmar & Padinhateeri, 2020).

L'organizzazione gerarchica della cromatina ha storicamente descritto un livello superiore alla "collana di perle", ovvero la fibra con diametro di 30 nm. Questo modello classico, tuttavia, è oggi al centro di numerosi dibattiti che ne confutano la veridicità, poiché dati recenti supportano i risultati ottenuti con precedenti osservazioni di EM, che non supportano l'esistenza di questo livello di organizzazione a 30 nm, come invece descritto per molti anni. Due modelli, già ampiamente diffusi negli scorsi anni, erano stati proposti per cercare di fornire esempi plausibili di questa organizzazione (Lakadamyali & Cosma, 2020; Vinayak, Lakadamyali, & Shenoy, 2026): il modello a solenoide e il modello a zig-zag (P. Chen, Li, & Li, 2021). Nel modello a solenoide la fibra da 30 nm viene descritta come un'elica a singolo inizio (one-start) con un andamento a spirale (6 nucleosomi per spira), dove il DNA linker connette i nucleosomi seguendo la curvatura del solenoide. Nel modello a zig-zag, invece, è descritta come una struttura a doppio inizio (two-start), in cui i nucleosomi "saltano" a zig-zag formando due pile e il DNA linker è relativamente dritto (G. Li & Zhu, 2015; P. Chen et al., 2021). Nella formazione della fibra di cromatina da 30 nm sono fondamentali gli istoni H1, appartenenti alla famiglia degli istoni linker, che si trovano nella cromatina condensata in un rapporto stechiometrico 1:1 con i nucleosomi (Robinson & Rhodes, 2006). Gli istoni H1 presentano una testa C-terminale, un corpo centrale che interagisce con il DNA e una coda N-terminale. Questi istoni interagiscono con il DNA al di fuori del nucleosoma e mediante interazioni di tipo testa-coda possono associarsi tra di loro permettendo l'ulteriore compattazione della cromatina (G. Li & Zhu, 2015).

Uno studio condotto da Paulson e Laemmli ha mostrato un livello superiore di organizzazione che coinvolge diverse proteine non-istoniche (Paulson & Laemmli, 1977). L'esperimento del suo gruppo consistette nel trattare cromosomi in prometafase con polianioni in soluzione iposalina così da rimuovere la componente istonica dalla cromatina, e, attraverso la microscopia elettronica, osservarono una struttura proteica con una forma simile ad un cromosoma in metafase, dalla quale si estendevano anse (*loops*) di DNA. Questa struttura è stata nominata Chromosome Scaffold; essa è composta da proteine come DNA topoisomerasi II α , condensine di tipo I e II, coesine e KIF4A (*kinesin family member 4A*) (Paulson, Hudson, Cisneros-Soberanis, & Earnshaw, 2021). La formazione dei loops di cromatina non solo risulta essere importante per la condensazione del DNA, ma è una

caratteristica chiave nella regolazione genica per porre in prossimità spaziale loci genomici distanti. Queste strutture a loops sono dinamiche e variabili nel tempo, permettendo, nelle fasi del ciclo cellulare e in diverse tipologie cellulari, di variare i loops per consentire alle cellule di alterare l'espressione genica in base alle necessità (Kohwi-Shigematsu et al., 2012). Questi loops di cromatina, conosciuti anche come TADs (*topologically associating domains*), sono stati identificati come blocchi di sub-megabase (Mb) nelle mappe di contatto ricostruite attraverso la tecnica High-throughput Chromosome Conformation Capture (Hi-C). I TADs hanno un ruolo importante nel mettere in contatto elementi regolatori in cis come promotori ed enhancer, ma anche nell'evitare l'interazione tra sequenze regolatorie non correlate che sono localizzate in TADs differenti. I confini dei TADs sono ricchi di CTCF (*CCCTC-binding factor*) e coesina, suggerendo un ruolo fondamentale di questi elementi nella formazione e nel mantenimento dei TADs. La proteina CTCF è una 11-zinc finger DNA binding protein, con un dominio centrale a dita di zinco e due grandi domini fiancheggiati C- e N-terminali; la coesina, invece, è un complesso multiproteico a forma di anello, composto da Smc1, Smc3, Rad21 e SA1/2. La coesina è implicata nell'estrudere la cromatina formando i loops, ciascuno dei quali viene delimitato ai confini dalle CTCF che segnalano alle coesine le estremità del loop. Inoltre, all'interno di uno stesso TAD possono formarsi loops regolatori secondari che promuovono il contatto funzionale tra enhancer, promotori e altri elementi regolatori dell'espressione genica (Hansen, Cattooglio, Darzacq, & Tjian, 2018; da Costa-Nunes & Noordermeer, 2023; Fujishiro, Sasai, & Maeshima, 2025). I TADs contengono geni la cui espressione avviene in maniera concertata, ma TADs diversi presentano geni con attività trascrizionale differente e ciò comporta che questi domini abbiano proprietà fisiche eterogenee. Le interazioni tra domini eterogenei possono determinare una separazione di fase polimero-polimero che separa la cromatina in due tipologie di compartimenti: i compartimenti A, contenenti domini con geni attivamente trascritti, e i compartimenti B, contenenti domini poveri di geni o con geni inattivi da un punto di vista trascrizionale (Rao et al., 2014; Fujishiro et al., 2025). (**Figura 1**).

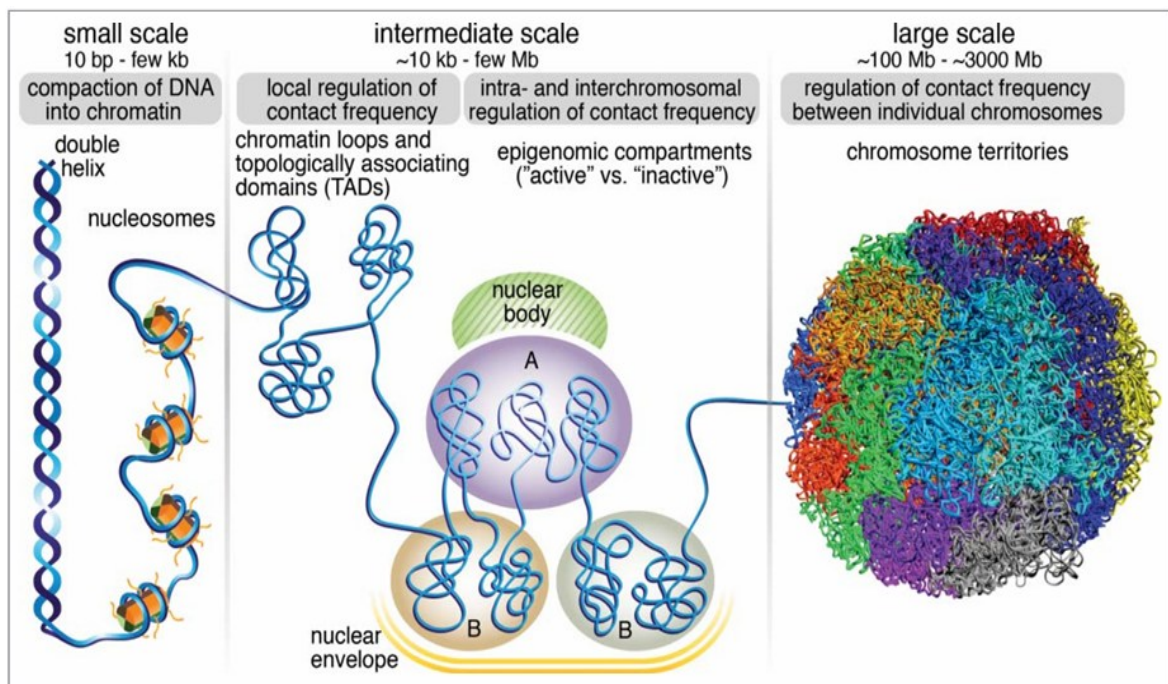


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'organizzazione della cromatina dai nucleosomi ai CTs. Il DNA a doppia elica viene compattato attorno ai nucleosomi con un primo superavvolgimento che forma la “collana di perle” da 11 nm. Nell'organizzazione di ordine superiore questa struttura viene organizzata in TADs. I TADs mettono in relazione elementi regolatori della trascrizione posti in loci distanti sul genoma. I TADs a loro volta si organizzano in compartimenti: i compartimenti A sono localizzati in zone più centrali del nucleo, con TADs contenuti geni trascrizionalmente attivi; mentre, i compartimenti B localizzati vicino al NE, sono formati da TADs con geni mantenuti silenti. I compartimenti derivanti da singoli cromosomi occupano posizioni ben distinte nel nucleo determinando i CTs (Hansen et al., 2018)

La cromatina non occupa tutto il volume del nucleo con la stessa densità, ma vi è uno spazio definito compartimento intercromatinico (IC), connesso con i NPCs, che fornisce gli spazi attraverso cui si spostano fattori di trascrizione e di splicing, molecole di RNA e proteine non-istoniche. Le vie dell'IC sono fiancheggiate dalla regione pericromatinica (PR), una regione meno condensata localizzata alla periferia dei domini cromatinici (CDs) e dei cluster di domini cromatinici (CDCs), zone più compatte con una bassa o assente attività trascrizionale. La PR è ricca di segnali epigenetici per la cromatina trascrizionalmente competente e di RNA polimerasi II (RNAPII), e risulta essere il maggior sito di trascrizione. Studi tramite EM hanno rivelato l'esistenza delle PF (*perichromatin fibrils*), generalmente localizzate nella PR, che dovrebbero essere la manifestazione morfologica dei trascritti di RNA. La PR è risultata essere anche il sito di accumulo dei PG (*perichromatin granules*), formati da almeno qualche PF, prima che queste lascino il nucleo. È stato dimostrato come

i PG siano coinvolti nell'accumulo e nel deposito di pre-mRNAs, portando la comunità scientifica a considerare un ruolo della PR anche nello smistamento di mRNA dal nucleo al citoplasma, mediante l'intervento di determinate proteine coinvolte nella motilità intracellulare. Inoltre, si ritiene che all'interno di questa regione avvengano anche vari processi cellulari come la replicazione, il riparo del DNA, lo splicing e alcune modifiche epigenetiche di DNA e RNA (Masiello, Siciliani, & Biggiogera, 2018; M. Cremer & Cremer, 2019; T. Cremer et al., 2020). Un modello recente integra tutte queste informazioni sull'organizzazione strutturale della cromatina nel nucleo in una visione che vede la divisione in due compartimenti funzionali e strutturali: il compartimento nucleare attivo (ANC) e il compartimento nucleare inattivo (INC). La PR e l'IC insieme compongono il compartimento attivo, mentre i CDs e i CDCs formano il compartimento inattivo in quanto non sono accessibili a fattori di trascrizione e al macchinario della trascrizione (T. Cremer, Cremer, & Cremer, 2018; M. Cremer & Cremer, 2019). (**Figura 2**)

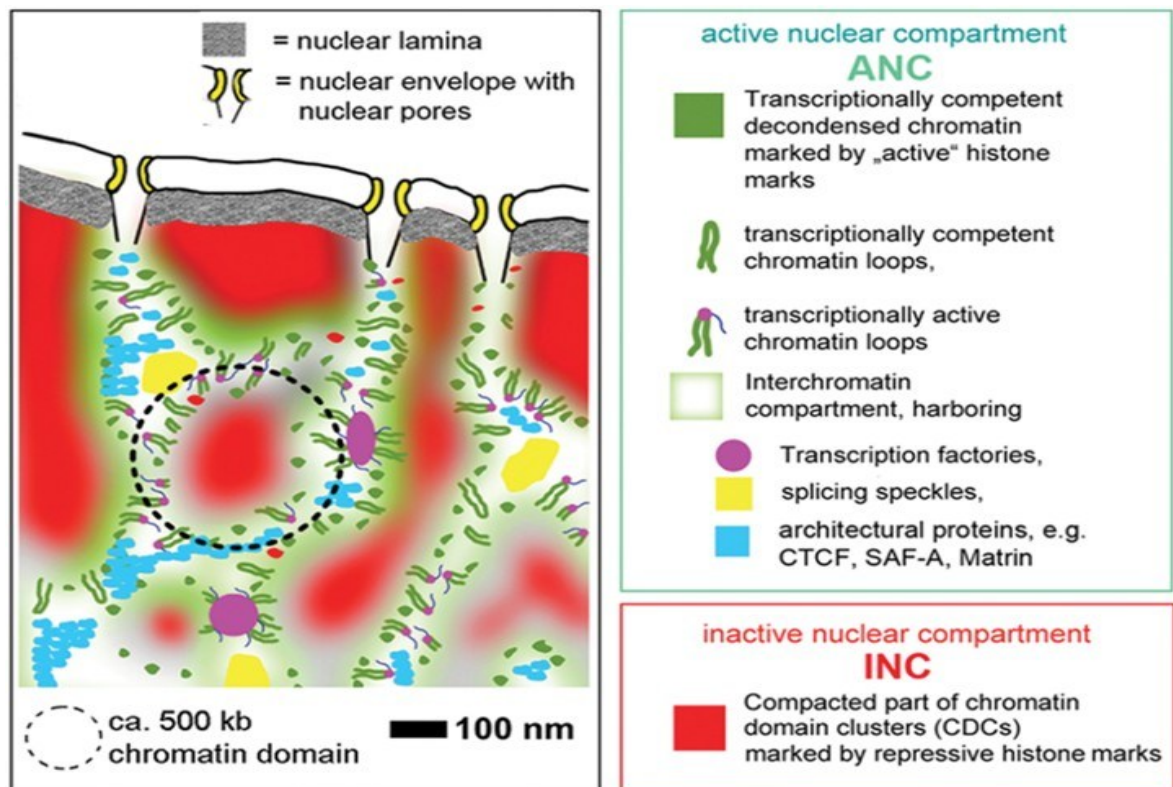


Figura 2. Modello ANC-INC. L'immagine mostra una semplificazione della relazione tra i compartimenti attivi e inattivi spazialmente co-allineati. L'ANC è composta dal compartimento intercromatinico (bianco), che rappresenta un network di canali connessi ai NPCs, e dalla regione pericromatinica (verde). La PR rappresenta la periferia dei domini cromatinici e dei cluster di domini cromatinici (entrambi in rosso), ed è la regione dove avviene la trascrizione e lo splicing dell'RNA in quanto è accessibile a fattori di trascrizione (viola) e di splicing (giallo). L'INC, invece, è composto dal core di cromatina più condensata rappresentato dai CDs e dai CDCs che sono ricchi di segnali epigenetici per la cromatina silente (M. Cremer & Cremer, 2019).

1.2 TRASCRIZIONE E PROCESSAMENTO DEGLI RNA

L'espressione genica inizia con il processo di trascrizione, cioè la generazione di un trascritto di RNA a partire da una sequenza di DNA mediante l'attività della RNAPII. La trascrizione, tipicamente, è un processo che ha inizio in un sito preciso definito TSS (*transcription start site*), in posizione 5' del gene. Il TSS è incorporato in un promotore principale che comprende 50 bp di DNA a monte e a valle del TSS. Il promotore serve come sito di legame per il macchinario della trascrizione, che comprende RNAPII e i fattori generali della trascrizione (*general transcription factors*, GTFs). Il promotore è sufficiente per permettere l'inizio della trascrizione, ma generalmente ha una bassa attività basale, motivo per cui può essere "potenziato" da elementi regolatori della trascrizione distanti sul genoma che prendono il nome di enhancers. Gli enhancers legano proteine regolatori note come fattori di trascrizione e reclutano cofattori di trascrizione, così da aumentare l'attività di trascrizione promossa da un promotore indipendentemente dalla sua distanza o dal suo orientamento (Haberle & Stark, 2018). Ogni gene può essere suddiviso sulla base della presenza di specifiche sequenze al suo promotore, i CPE (*core promoter elements*), che possono trovarsi o a monte o a valle dei TSS. Nonostante la varietà dei CPE, i geni vengono più semplicemente classificati in geni contenenti o privi di TATA box nella regione del promotore. La TATA box è una sequenza TATAA riconosciuta dalla TBP (*TATAA-binding protein*) che si lega al DNA in associazione con vari fattori TBP-associati (*TBP-Associated Factors*, TAFs) come il complesso TFIIH. Il legame di TBP con la sequenza TATAA facilita l'assemblaggio ordinato dei GTFs ed è un passaggio critico per la formazione di un complesso di pre-inizio (*pre-initiation complex*, PIC) funzionale. Oltre ai TAFs, altri fattori possono associarsi con TBP al promotore, come, ad esempio, TFIIA che è coinvolto nello stabilizzare l'interazione tra TBP e la TATA box. La RNAPII si lega al promotore insieme alla subunità TFIIF e stabilizza ulteriormente la formazione di PIC (Shandilya & Roberts, 2012; Haberle & Stark, 2018). L'assemblaggio del complesso PIC non garantisce l'inizio della trascrizione vera e propria, tuttavia è condizione necessaria affinché inizi il processo. L'inizio della trascrizione, infatti, è stato diviso in tre passaggi sulla base della lunghezza iniziale del trascritto nascente di RNA. Trascritti con una lunghezza minore di 5 nucleotidi (nt) sono instabili e ricadono in un'alta frequenza di inizi abortivi, una lunghezza di 10 nt favorisce l'inizio della trascrizione produttiva rispetto a quella abortiva, mentre ad una lunghezza di 25 nt la trascrizione produttiva viene raggiunta e inizia il processo di allungamento del trascritto di RNA. Per ottenere un ambiente favorevole all'inizio della trascrizione produttiva sono fondamentali alcune modifiche post-traduzionali al dominio C-

terminale (*C-terminal domain*, CTD) della RNAPII. Alla lunghezza di 25 nt avviene il capping dell'RNA nascente alla sua estremità 5'; in particolare, il capping enzyme riconosce la Serina 5 fosforilata al CTD della RNAPII, che poi catalizza l'aggiunta del cap di metilguanossina al 5' dell'RNA nascente fornendo il segnale per l'inizio della trascrizione produttiva (Svetlov & Nudler, 2013). La stabilità dell'ibrido DNA-RNA è un punto critico per il mantenimento dell'attività della RNAPII durante l'allungamento del trascritto nascente e qualsiasi disaccoppiamento di questo eteroduplex può comportare una terminazione precoce del processo di trascrizione (Shandilya & Roberts, 2012; Svetlov & Nudler, 2013). Terminato il processo di allungamento dell'RNA la RNAPII può dissociarsi dal DNA determinando la fine della trascrizione oppure può essere reclutata nuovamente a livello del promotore per la produzione di un nuovo trascritto. Negli eucarioti, la maggior parte dei trascritti nascenti di RNA messaggero (pre-mRNAs) presentano al 3'-UTR (*3'-untranslated region*) una sequenza altamente conservata di poli-A (5'-AAUAAA-3') seguita a valle da una sequenza ricca in G/U. Trascritte queste sequenze la RNAPII subisce un rallentamento che determina una pausa nell'attività di trascrizione. Inizialmente, un complesso proteico multi-subunità formato da CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) e da CFI e CFII (*cleavage factor I & cleavage factor II*) viene reclutato alla sequenza consenso di poli-A al 3'-UTR. A livello di questa sequenza il pre-mRNA viene tagliato da una endonucleasi e modificato con l'aggiunta di una coda di poli-A mediante la Poli-A polimerasi (PAP), successivamente rilasciato ed esportato nel citoplasma. L'estremità a valle del taglio viene, invece, bersagliata dall'esonucleasi Rat1/XNR2, che degrada l'RNA fino a quando non incontra la RNAPII e secondo il modello "torpedo" questa collisione determina il distacco della RNAPII dalla cromatina (Kuehner, Pearson, & Moore, 2011; Xie, Libri, & Porrua, 2023).

Il 95 % dei geni, negli eucarioti superiori, sono trascritti come pre-mRNAs che contengono sequenze non codificanti (introni) così come sequenze codificanti (esoni). Lo splicing alternativo dell'RNA, un processo nel quale vengono rimossi gli introni per formare un mRNA maturo, avviene largamente in parallelo con la trascrizione portata avanti dalla RNAPII. Nonostante la reazione chimica dello splicing sia piuttosto semplice, quello che avviene nella cellula è molto più complicato: lo splicing è catalizzato da un dinamico macchinario ribonucleoproteico, lo spliceosoma, che richiede l'idrolisi di una grande quantità di ATP (*adenosine triphosphate*). Lo spliceosoma si assembla sugli introni attraverso un processo graduale di riconoscimento di tre sequenze consenso. Queste includono il sito di splicing al 5' (5'-ss), che contiene un dinucleotide GU al 5' dell'introne, il branch site (BS), che è tipicamente un nucleotide adenosina, e il sito di splicing al 3' (3'-

ss), che comprende il tratto polipirimidinico e il dinucleotide AG al 3' dell'introne. Lo spliceosoma si riassume su ogni introne con lo stesso procedimento ed è composto da cinque snRNPs, che contengono, rispettivamente, gli snRNA U1, U2, U4, U5 o U6. Lo splicing inizia con il riconoscimento del 5'-ss dell'introne per mezzo della snRNP U1, seguito dal riconoscimento del BS ad opera della snRNP U2. Successivamente, un complesso preassemblato tri-snRNP U4/U6.U5 viene aggiunto al macchinario dello spliceosoma in formazione, seguito dal rilascio delle snRNPs U1/U4 che determina la formazione del complesso catalitico attivo dello spliceosoma (Matera & Wang, 2014; Stanley & Abdel-Wahab, 2022; Vorlander, Pacheco-Fiallos, & Plaschka, 2022).

Il destino degli mRNA dipende da più fattori che ne regolano la maturazione, la trascrizione, lo splicing e la traduzione. Tra questi, vi sono le hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), che supportano la maturazione dei pre-mRNA in mRNA, stabilizzano gli mRNA durante il loro trasporto cellulare e controllano la loro traduzione in proteine. Considerando la loro eterogeneità e complessità strutturale, le hnRNPs sono proteine chiave nel metabolismo cellulare degli acidi nucleici. Nelle hnRNPs sono stati identificati quattro domini di legame all'RNA (*RNA-binding domains*, RBD): il motivo di riconoscimento dell'RNA (*RNA recognition motif*, RRM), il quasi-RRM, un dominio ricco in glicina contenente le RGG box e il dominio KH. Il dominio RRM eucariotico è strutturalmente caratterizzato da quattro β -foglietti e due α -eliche unite a una sequenza ottamerica RNP1 e una esamerica RNP2, che insieme permettono il riconoscimento dell'RNA. Le RGG (Arginina-Glicina-Glicina) box sono intercalate tra residui di fenilalanina e tirosina, questo dominio ricco in glicine è visto come un dominio ausiliario utile nell'interazione tra le diverse hnRNPs (Geuens, Bouhy, & Timmerman, 2016; Liu & Shi, 2021).

Le hnRNPs A/B sono suddivise in quattro sottogruppi: hnRNP A1, A2/B1, A3 e A0. La maggioranza degli studi sono stati eseguiti sulle hnRNP A1 e A2/B1 che sono altamente espresse nelle cellule. Queste sono coinvolte nei processi di trascrizione, di traduzione degli mRNA in proteine e nello splicing alternativo. Le hnRNP A/B sono attivatori della trascrizione; è stato dimostrato che possono legarsi al DNA e attivare il processo di trascrizione. Un potenziale meccanismo, con cui questo avviene, potrebbe essere il RNAa (*RNA activation*), un fenomeno che vede gli small activating dsRNA (saRNA) legarsi a regioni complementari sui promotori dei geni e portare ad un incremento dell'attività trascrizionale nelle cellule di mammifero. Nello splicing, le hnRNP A/B possono essere legate dai silenziatori dello splicing degli esoni (ESS) o degli introni (ISS) che antagonizzano il riconoscimento di alcuni siti di splicing da parte delle proteine che si occupano del riconoscimento di questi siti. Sono, quindi, coinvolte nei processi di splicing e nell'inibizione

del riconoscimento dei siti 5'-ss e 3'-ss prossimali, favorendo il riconoscimento di un sito 5'-ss distale, andando a promuovere fenomeni come l'exon skipping, che porta all'esclusione di determinati esoni dal trascritto maturo di mRNA (Liu & Shi, 2021).

Recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento delle hnRNP A2/B1 nel caricamento degli esosomi, vescicole extracellulari che mediano la comunicazione cellula-cellula, e trasportano proteine, RNA e lipidi. Le hnRNP A2/B1 legano i miRNAs e li indirizzano agli esosomi per essere incorporati. Un'altra categoria sono le hnRNP C che devono oligomerizzare per legare gli RNA e ne determinano lo smistamento in base alla dimensione. Tra le altre hnRNPs si annoverano le proteine D, L e K. La hnRNP D è principalmente coinvolta nei processi di degradazione degli mRNA. La hnRNP L partecipa alla regolazione dello splicing alternativo ed è implicata nel fenomeno dell'exon skipping. La hnRNP K, invece, svolge molteplici funzioni sia nel nucleo sia nel citoplasma, contribuendo alla regolazione della trascrizione, dello splicing, del silenziamento genico, nonché alla stabilità e alla traduzione degli mRNA (Geuens et al., 2016; Thibault et al., 2021).

2. EPIGENETICA

Il concetto di epigenetica è stato descritto per la prima volta nel 1942 dal biologo inglese Conrad Hal Waddington per descrivere la complessità di quei processi che mediano il flusso di informazioni dal DNA al fenotipo. Quasi un secolo di studi ha rivelato l'esistenza di diversi processi epigenetici che condividono una caratteristica in comune, ovvero modificare l'accessibilità del DNA senza alterare la sua sequenza (Crawford, Charlesworth, Riffle, Yardley, & Osborne, 2026). Il campo dell'epigenetica comprende diversi meccanismi dinamici come la metilazione del DNA, le modifiche istoniche post-traduzionali (PTMs) e il coinvolgimento di RNA non codificanti. La metilazione del DNA è coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari, tra cui il rimodellamento della struttura cromatinica, l'inattivazione del cromosoma X, l'imprinting genomico, la stabilità cromosomica e la trascrizione genica. Gli istoni possono andare incontro a modifiche post-traduzionali che alterano la loro interazione con il DNA o con altre proteine nucleari. In particolare, gli istoni H3 e H4 presentano lunghe code N-terminali e sono gli istoni che, più frequentemente, sono soggetti a modifiche covalenti sui residui aminoacidici come acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e fosforilazione (Baccarelli & Bollati, 2009).

L'epigenetica è coinvolta in moltissimi eventi cellulari sia fisiologici che patologici, come lo sviluppo, l'invecchiamento, il cancro, le malattie immunologiche e la risposta a vari stimoli.

Lo sviluppo di un organismo è, per definizione, epigenetica. Le differenze nei programmi di espressione genica portano allo sviluppo di diversi organi o tessuti senza alterare la sequenza stessa del DNA. Una serie di studi ha contribuito a spiegare il concetto di "controllo epigenetico dello sviluppo"; ad esempio, Takahashi e Yamanaka identificarono quattro fattori regolatori che, se espressi nei fibroblasti, portavano ad una riprogrammazione di queste cellule a embryonic stem (ES)-like cells. Anche gli esperimenti di clonazione, che prevedevano il trapianto di un nucleo derivante da cellule somatiche in oociti che erano stati precedentemente enucleati, furono un successo. Tuttavia, entrambi gli approcci risultarono poco efficienti, con un tasso di successo estremamente basso, dovuto alla mancanza di una completa conoscenza dei meccanismi epigenetici che avvengono durante lo sviluppo embrionale e nei processi di differenziamento cellulare (Reik, 2007). L'epigenetica è coinvolta anche nella risposta agli stimoli ambientali; è risultato in diversi studi sperimentali ed epidemiologici che alcuni fattori ambientali sono coinvolti nei cambiamenti aberranti dei pathways epigenetici. Inoltre, i meccanismi epigenetici possono mediare meccanismi di tossicità e risposta a determinati agenti chimici. Tuttavia, in quanto questi cambiamenti

epigenetici sono piccoli, potenzialmente cumulativi e che si sviluppano col tempo, risulta spesso complicato stabilire relazioni di causa-effetto tra fattori ambientali, cambiamenti epigenetici e patologie (Baccarelli & Bollati, 2009).

Tutte le modifiche epigenetiche che intervengono nei vari processi cellulari, dallo sviluppo degli organismi fino alle risposte a stimoli di diversa natura, sono apportate da diverse categorie di enzimi definiti modulatori dell'epigenetica. I modulatori dell'epigenetica sono suddivisi in categorie sulla base della loro funzione enzimatica o biochimica, includendo: writers, erasers, readers e remodelers. I writers sono enzimi che aggiungono attivamente le modifiche epigenetiche al DNA, agli istoni e alle proteine non-istoniche; al contrario, gli erasers rimuovono attivamente le modifiche dal loro bersaglio. I readers sono, invece, enzimi che riconoscono le modifiche aggiunte dai writers mettendo in atto le risposte biologiche a quelle modifiche. I remodelers sono composti multi-subunità ATP-dipendenti che riposizionano, spostano, rimuovono o alterano la composizione dei nucleosomi. Possono modificare direttamente l'accessibilità alla cromatina per regolare la trascrizione, la riparazione o la replicazione del DNA (Honer, Ferman, Gray, Bondarenko, & Whetstine, 2024).

2.1 LA METILAZIONE DEL DNA

La metilazione del DNA più comune è la reazione chimica che determina l'aggiunta di un gruppo metile, tramite legame covalente, al carbonio in posizione 5 dell'anello di citosina con la formazione della 5-metilcitosina (5mC). Nei mammiferi, questa reazione avviene principalmente a livello delle citosine che precedono le guanine, nominati dinucleotidi CpG; tuttavia, la 5mC può trovarsi anche su dinucleotidi CpH, dove H indica una base qualsiasi tra adenina, timina e citosina. La metilazione delle citosine avviene ad opera delle DNA metiltransferasi (DNMT), una famiglia di enzimi che comprende DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. Il gruppo metile aggiunto dalle DNMT viene donato dalla S-adenosil-metionina (SAM). La SAM viene generata da una reazione che coinvolge una molecola di metionina e una di ATP, e, quando utilizzata da una DNMT, viene convertita in S-adenosil-omocisteina (SAH), la quale a sua volta viene poi trasformata in omocisteina e riciclata dalla cellula. La DNMT1, con il supporto della ubiquitina ligasi E3 UHRF1, ha il compito di riprodurre fedelmente il pattern di metilazione del DNA replicato. Infatti, il filamento neosintetizzato è inizialmente non metilato, risultando in uno stato di emimetilazione del DNA, e la DNMT1 riconosce questo stato ripristinando il pattern di metilazione, in modo che venga ereditato correttamente attraverso la divisione cellulare. La

categoria delle DNMT3 viene generalmente indicata come *de novo* DNMT per il loro ruolo di stabilire i pattern di metilazione del DNA durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale. Inoltre, si occupano del mantenimento e della formazione di 5mC durante il normale ciclo cellulare. La DNMT3L, invece, manca di attività catalitica e si pensa che il suo ruolo principale sia aiutare le DNMT3A e 3B nel regolare il loro posizionamento e la loro attività catalitica (Tibben & Rothbart, 2024).

Molteplici studi si sono concentrati sul ruolo della metilazione del DNA nel silenziamento genico attraverso la metilazione dei promotori dei geni, in particolare delle isole CpG. Le isole CpG vengono, generalmente, definite come regioni di lunghezza 1 kb che presentano un alto contenuto in CG e di dinucleotidi CpG rispetto al resto del genoma. Geni che contengono un'isola CpG non metilata, tipicamente, sono attivamente trascritti e presentano il TSS privo di nucleosomi, ma fiancheggiato da nucleosomi che presentano la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3); questa architettura consente il legame dei fattori di trascrizione per l'inizio della trascrizione (Jones, 2012; Tibben & Rothbart, 2024). Tuttavia, la metilazione del DNA avviene anche a livello del corpo di un gene, ovvero la regione tra il promotore e il sito di terminazione della trascrizione. In questa regione, in assenza di isole CpG, la metilazione del DNA è correlata positivamente all'attiva trascrizione del gene. Nonostante ciò, in alcuni casi, sono presenti delle isole CpG nel corpo del gene, definite intrageniche, e quando metilate non sempre sono correlate positivamente alla trascrizione attiva del gene. Infatti, Varley et al. hanno mostrato che la metilazione del DNA, se cade nel corpo di un gene privo di isole CpG, è positivamente correlata alla trascrizione attiva del gene, mentre se il corpo del gene contiene un'isola CpG intragenica la metilazione può correlare positivamente o negativamente all'attiva trascrizione del gene stesso (Varley et al., 2013; Tibben & Rothbart, 2024).

La formazione di 5mC non è una modifica epigenetica permanente, nel nucleo avvengono continuamente processi di demetilazione attiva o passiva. Durante la divisione cellulare, se, per qualsiasi motivazione, alle DNMT viene impedito di metilare il DNA replicato, le citosine non vengono modificate dando origine ad un processo di demetilazione passiva. Al contrario, il processo di demetilazione attivo vede l'intervento degli enzimi TET (*Ten-Eleven Translocase*), che mediano un processo multistep. La 5mC viene ossidata a 5-idrossimetilcitosina (5hmC), un intermedio stabile, e successivamente ossidata a 5-formilcitosina (5fC) e 5-carbossilcitosina (5caC). La 5fC e la 5caC vengono riconosciute da proteine, come la TDG (*thymine-DNA glycosylase*), coinvolte in uno dei meccanismi di riparazione del DNA, il BER (*Base Excision Repair*), che rimuovono questi intermedi ossidati sostituendoli con una citosina non metilata (**Figura 3**) (Crawford et al., 2026). La

famiglia degli enzimi TET comprende TET1, TET2 e TET3, che agiscono tramite un dominio catalitico Fe(II)- e α -chetoglutarato-dipendente. Le proteine TET mostrano tutte attività catalitica per ossidare la 5mC a 5hmC, ma mostrano un'espressione cellulare dipendente. TET1 è preferenzialmente espressa nelle cellule staminali embrionali (*embryonic stem cells*, ESCs), mentre TET2 e TET3 hanno un profilo di espressione simile in diversi tessuti; ad esempio TET3 risulta particolarmente espresso nel cervelletto, nella corteccia e nell'ippocampo. Si ritiene, inoltre, che la 5hmC possa essere rimossa anche tramite deaminazione mediata da AID (*Activation-induced deaminase*), che genera 5-idrossimetiluracile (5hmU) e il BER completa il processo di demetilazione. Tuttavia, AID non agisce sul DNA a doppio filamento e il tasso di deaminazione della 5hmC a 5hmU è comunque molto basso anche su DNA a singolo filamento (Shi, Ali, Tang, & Yang, 2017; Zhang, Zhang, Wang, & Wang, 2023). La 5hmC, nonostante sia un intermedio nel processo di rimozione della metilazione, è una modifica epigenetica con un ruolo funzionale. La 5hmC è associata alla trascrizione genica ed è particolarmente arricchita in geni attivi dal punto di vista trascrizionale, infatti è stata spesso osservata nei TSS fiancheggiati da nucleosomi contenenti la modifica istonica H3K4me3. In aggiunta, è ritenuto che la 5hmC possa regolare l'espressione genica modulando l'accessibilità alla cromatina al macchinario della trascrizione o inibendo il legame dei repressori della trascrizione (Shi et al., 2017).

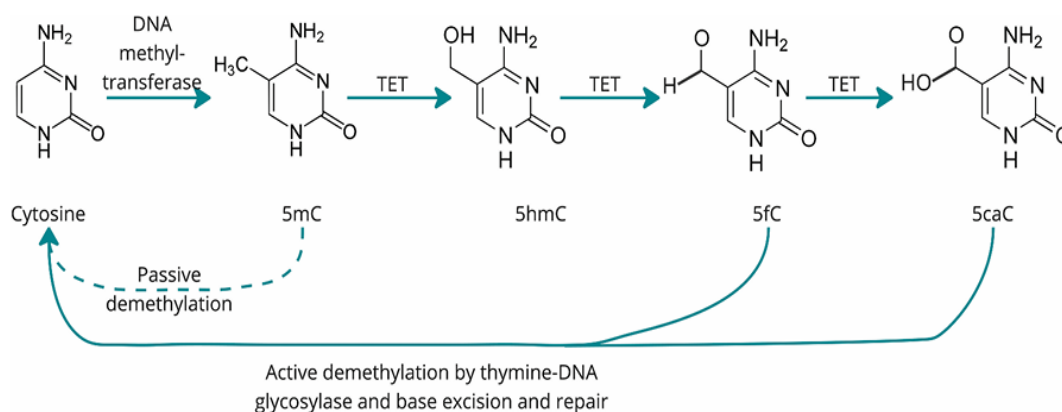


Figura 3. Ciclo di modifica delle citosine. Le DNA metiltransferasi (DNMT) aggiungono un gruppo metile in posizione 5 dell'anello della citosina, determinando la formazione di 5mC. Questa modifica può essere cancellata con due tipologie di demetilazione: passiva o attiva. La demetilazione passiva avviene senza interventi esterni. Durante la divisione cellulare le citosine non vengono nuovamente metilate, comportando una "diluizione" delle 5mC. La demetilazione attiva avviene ad opera degli enzimi TET che tramite un processo multistep ossidano la 5mC. Gli stadi finali di questo processo sono rimossi tramite il BER, un meccanismo di riparazione del DNA, che li sostituisce con una citosina non metilata (Crawford et al., 2026).

Le metilazioni delle citosine vengono interpretate attraverso proteine specifiche, il cui compito è riconoscere queste modifiche epigenetiche per reclutare altre proteine in grado di modellare l'accessibilità della cromatina. I “readers” delle citosine comprendono la famiglia delle proteine MBD (*methyl-CpG-binding domain*), la famiglia delle proteine Kaiso e la famiglia del dominio SRA (*SET- and Ring finger-associated*). La famiglia delle MBD, tipicamente repressori della trascrizione, ha un ruolo fondamentale nel crosstalk tra la metilazione delle citosine, le modificazioni istoniche e l'organizzazione della cromatina. I membri della famiglia MBD possono contenere, rispettivamente, diversi domini in base alla loro funzione; la maggior parte contiene un dominio TRD di repressione della trascrizione che media l'interazione con proteine specifiche, altri possono contenere un dominio zinc-finger per legare anche dinucleotidi CpG non metilati (dominio CxxC). Tra questi, il primo ad essere scoperto è stato MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*), che contiene il dominio MBD e un dominio TRD. MeCP2 ha come partner di legame delle deacetilasi istoniche e delle metiltransferasi istoniche, e ha un ruolo nella formazione di eterocromatina per il silenziamento dell'espressione genica. È particolarmente espresso nei neuroni ed è fondamentale nello sviluppo neurale, inoltre, mutazioni di MeCP2 sono associate allo sviluppo di gravi patologie del neurosviluppo come la sindrome di Rett. In aggiunta a MeCP2 esistono altri sei membri della famiglia MBD, nominati MBD1-6, tra cui il più importante è MBD1 che aiuta a mantenere l'eterocromatina e recluta metiltransferasi istoniche. MBD1 contiene un dominio MBD, un dominio TRD, oltre a due o tre domini CxxC che sono presenti in MBD1 ad opera dello splicing. L'isoforma di MBD1 che contiene un terzo dominio CxxC acquisisce l'abilità di legarsi anche a citosine non metilate (Du, Luu, Stirzaker, & Clark, 2015; Tibben & Rothbart, 2024).

È importante sottolineare che la 5mC non è una modifica esclusiva del DNA, ma è anche una fondamentale modifica post-trascrizionale degli RNA. La metilazione dell'RNA può regolare il livello di espressione di geni chiave e regolare processi biologici modulando la stabilità, l'efficienza di traduzione, la struttura spaziale e l'interazione degli RNA con le proteine. La metilazione delle citosine sull'RNA avviene ad opera della famiglia di proteine con dominio NOL1/NOP2/SUN (NSUN) e delle metiltransferasi DNMT2. Tra le proteine che leggono queste modifiche sull'RNA e mettono in atto risposte biologiche figurano YTHDF2, ALYREF e YBX1 (Z. Liu et al., 2026).

2.2 LE MODIFICHE ISTONICHE POST-TRADUZIONALI

La regolazione della struttura della cromatina, il posizionamento dei nucleosomi e la trascrizione genica sono, primariamente, controllati dalle proteine istoniche. Come descritto precedentemente, i nucleosomi sono formati da quattro tipologie di istoni: H2A, H2B, H3 e H4. Gli istoni possono andare incontro a varie PTMs che influenzano la loro interazione con il DNA. In normali condizioni fisiologiche, le PTMs degli istoni, sono essenziali per mantenere la struttura dei nucleosomi e funzionano come meccanismi di regolazione. Agiscono come regolatori chiave in molti processi cellulari come la replicazione del DNA, l'espressione genica, la riparazione del danno al DNA e l'organizzazione della cromatina (M. Wang & Lin, 2021).

Gli istoni possono essere modificati in diversi modi, i più comuni sono la metilazione, l'acetilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione, mentre esistono modifiche meno frequenti come la crotonilazione, la malonilazione, la propionilazione e la butirrilazione (Figura 4) (R. Liu et al., 2023).

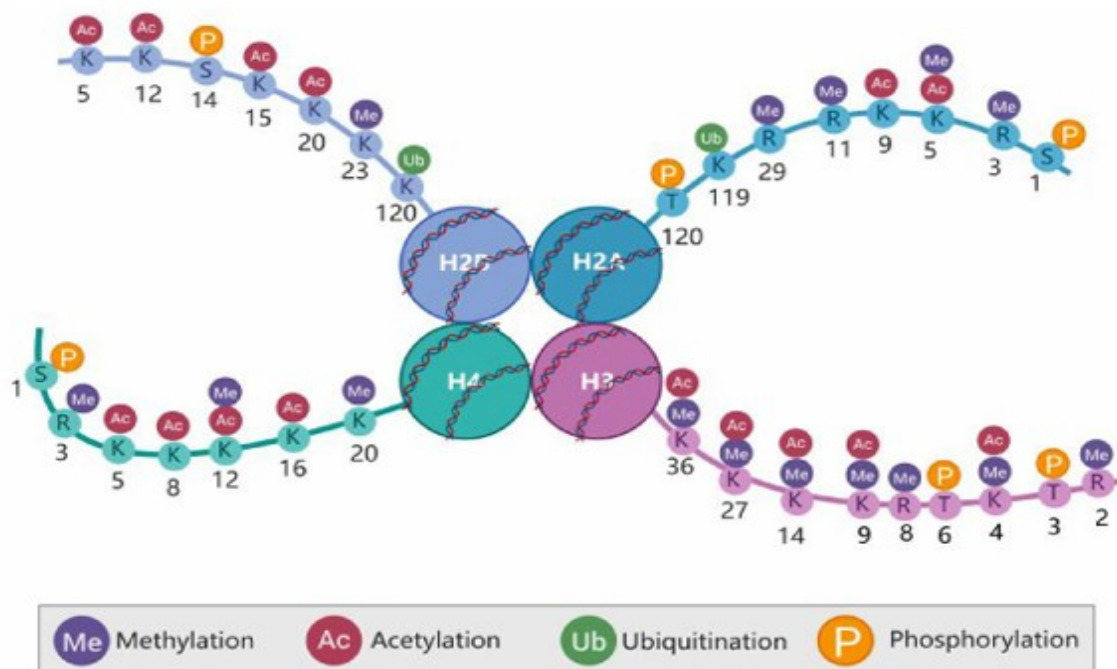


Figura 4. PTMs delle code N-terminali degli istoni. Rappresentazione schematica degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 con le principali PTMs a cui vanno incontro le loro code N-terminali (Duan et al., 2024).

La maggior parte delle PTMs degli istoni avviene a livello delle code N-terminali, nonostante esistano importanti modifiche epigenetiche che coinvolgono il dominio globulare degli istoni. Le PTMs sul dominio globulare degli istoni può portare a cambiamenti nelle

interazioni istone-istone, nella stabilità dei nucleosomi o alterare l'interazione col DNA, impattando sulla funzionalità della cromatina, spesso senza richiedere l'intervento di proteine effettrici (Duan et al., 2024).

La metilazione degli istoni avviene ad opera delle metiltransferasi istoniche (HMTs, *Histone methyltransferases*), le quali vengono suddivise in due classi: le metiltransferasi delle lisine degli istoni (KMTs) e le metiltransferasi delle arginine degli istoni (PRMTs). In aggiunta, in base alla sequenza del dominio catalitico, le KMTs vengono divise in: contenenti il dominio SET (SET-containing) o prive del dominio SET (non-SET). Tra le SET-containing KMTs figurano alcuni enzimi come SUV39H1/2, MLL 1-4, G9a, GLP, SMYD, SETDB1/2, EZH2. Le PRMTs si dividono in due categorie: la prima include PRMT1, 3, 4, 6 e 8, che catalizzano la monometilazione delle arginine in modo asimmetrico, spesso attivando l'espressione genica; la seconda include PRMT5 e 7 che catalizzano la monometilazione delle arginine in modo simmetrico, spesso reprimendo l'espressione dei geni (R. Liu et al., 2023).

Le metilazioni sui residui aminoacidici degli istoni possono essere rimosse dalle demetilasi degli istoni (*Histone demethylases*, HDMs). Questi enzimi rimuovono primariamente le metilazioni dalle lisine, e sono conosciuti anche come lisina demetilasi (*Lysine demethylases*, KDMs). Attualmente, sono conosciute due famiglie conservate nell'evoluzione: le demetilasi lisina-specifiche (*Lysine-specific demethylases*, LSDs) e le demetilasi contenenti il dominio Jumonji C (JHDMs), le quali utilizzano meccanismi differenti per rimuovere i gruppi metili. La famiglia delle LSDs contiene LSD1 e LSD2 che agiscono attraverso un meccanismo flavin-adenina dinucleotide (FAD)-dipendente. LSD1 è in grado di rimuovere le mono- e le di- metilazioni dalle lisine, ma non agisce sulle lisine trimetilate. Le JHDMs sono una famiglia di più di 30 membri con un'attività idrossilasica che gli permette di rimuovere tutti e tre gli stati di metilazione delle lisine. Le demetilasi delle arginine (*Arginine demethylases*, RDMs), invece, sono poco caratterizzate; le più studiate sono le peptidil-arginina deiminasi (PADIs), enzimi Ca^{2+} -dipendenti che, nelle proteine, trasformano i residui di arginina in citrullina. Questi enzimi riescono, anche, ad effettuare la stessa reazione utilizzando come substrato residui di arginina monometilati (**Figura 5**) (Duan et al., 2024).

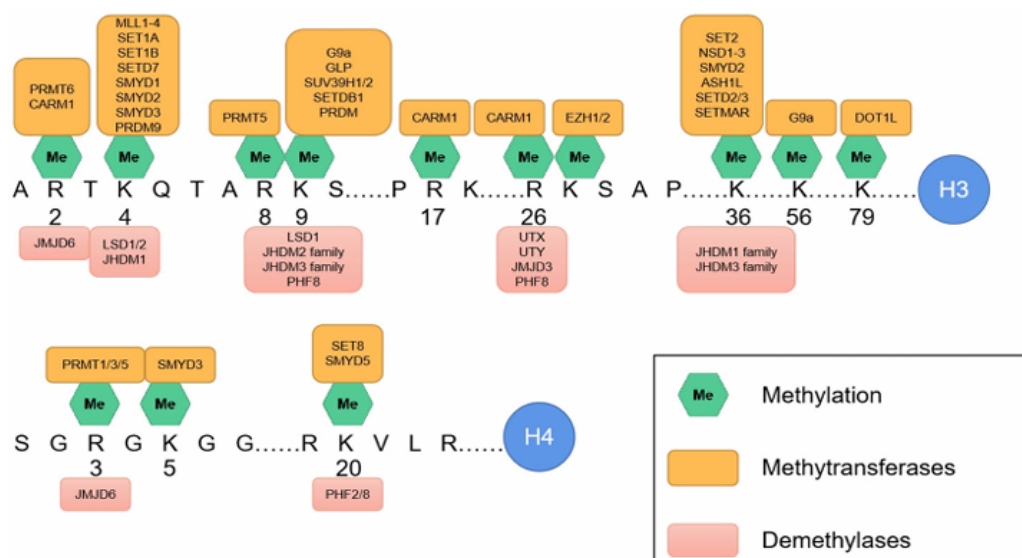


Figura 5. Siti di metilazione degli istoni H3 e H4. L'immagine mostra i principali siti di metilazione delle code N-terminali degli istoni H3 e H4. Inoltre, vengono indicate le metiltransferasi (HMTs) che aggiungono i gruppi metili (sopra) e le demetilasi (HDMs) che le rimuovono (sotto) (Duan et al., 2024).

SUV39H1, SUV39H2, G9a, GLP, ma anche SETDB1 e SETDB2, rappresentano i principali enzimi metilanti la lisina 9 dell'istone H3 (H3K9). In particolare, la dimetilazione (H3K9me2) e la trimetilazione (H3K9me3) di questo residuo aminoacidico sono presenti spesso nelle sequenze ripetute non codificanti come i satelliti pericentromerici e le ripetizioni subtelomeriche, le quali sono silenziate e raggruppate in clusters, formando l'eterocromatina costitutiva (Padeken, Methot, & Gasser, 2022). EZH2 (*enhancer zeste homolog 2*), componente chiave del complesso PRC2 (*polycomb-repressive complex 2*), rappresenta la principale KMT che posiziona la dimetilazione o la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me2/3) e richiede sia EED che SUZ12 per svolgere questa funzione, entrambi componenti fondamentali di PRC2. H3K27me3 è un segno distintivo dell'eterocromatina facoltativa in diversi organismi, nonostante non sia ancora completamente chiaro come funzioni questo marcatore nella repressione dell'espressione genica e come venga controllato. Questa modifica può essere riconosciuta da una proteina del complesso PRC1 (*polycomb-repressive complex 1*) che aiuta a mediare la repressione trascrizionale e la compattazione della cromatina (Wiles & Selker, 2017). I complessi SET1/MLL, che aggiungono le metilazioni alla lisina 4 dell'istone H3 (H3K4), comprendono diverse KMTs e subunità essenziali, includendo sei membri catalitici: SETD1A, SETD1B, MLL 1-4 (Shilatifard, 2012). La monometilazione di H3K4 (H3K4me1) viene catalizzata da MLL3 e MLL4, ed è largamente associata agli enhancers dei geni promuovendone l'attivazione;

mentre, la dimetilazione di H3K4 (H3K4me2), depositata da MLL1 e MLL2, si trova sia a livello di promotori che di enhancers, in particolare dei promotori dei geni bivalenti e dello sviluppo, reprimendo la trascrizione di specifiche regioni genomiche.

Nei mammiferi, la trimetilazione di H3K4 (H3K4me3) viene inserita, principalmente, dagli enzimi SETD1A e SETD1B (**Figura 6**) (H. Wang & Helin, 2025).

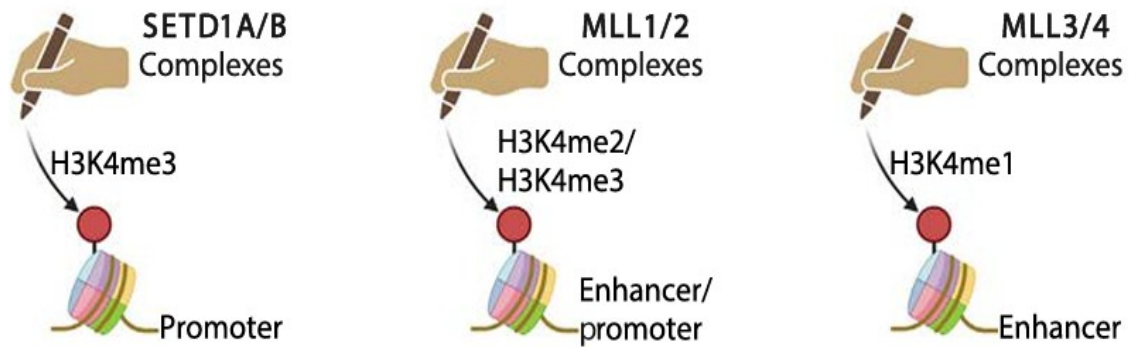


Figura 6. *Writers delle metilazioni di H3K4.* Schema semplificato delle KMTs che catalizzano gli eventi di metilazione di H3K4. Sono indicati, anche, i principali siti di localizzazione dei vari gradi di metilazione (H. Wang & Helin, 2025).

H3K4me3 si trova tipicamente ai TSS e si ritiene che aiuti a reclutare proteine di legame per la TATA box contenenti il dominio PHD, come TAF3, che sono fondamentali per l'inizio della trascrizione, favorendo la formazione del complesso PIC a livello del promotore. . In aggiunta, recenti studi hanno dimostrato che H3K4me3 ha un ruolo nel rilascio della RNAPII in pausa attraverso il reclutamento di INTS11 (*Integrator complex subunit 11*), che presenta un'attività endonucleasica dell'RNA e può promuovere l'inizio della trascrizione produttiva rilasciando la RNAPII in pausa al promotore. Un altro reader di H3K4me3 è CHD1 (*Chromodomain helicase DNA binding protein 1*), un enzima di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente, che può riconoscere questa modifica e reclutare fattori necessari alla maturazione dell'RNA. Anche BPTF, la più grande subunità di NURF (*Nucleosome remodeling factor*), può interagire con H3K4me3 attraverso un dominio PHD, risultando potenzialmente importante per il suo ruolo di regolare l'accessibilità alla cromatina (Wysocka et al., 2006; Sims et al., 2007; H. Wang & Helin, 2025). Alcuni studi sul ruolo della metilazione del DNA e di specifiche PTMs degli istoni hanno rivelato interazioni tra queste tipologie di modifiche epigenetiche. Ad esempio, la metilazione di H3K4 (H3K4me) può inibire la metilazione *de novo* del DNA, ed è stato dimostrato da studi che mostravano come i promotori marcati con la H3K4me fossero resistenti alla metilazione del DNA. A seguito di queste osservazioni il gruppo di Ooi et al. ha rivelato che il dominio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) di DNMT3L, partner di legame di DNMT3A, interagisce in modo

specifico con H3K4 non modificata. Infatti, maggiore è il grado di metilazione di H3K4 maggiore è l'effetto inibitorio su DNMT3A (S. M. Janssen & Lorincz, 2022). La dimetilazione della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36me2) viene inserita da parte di diverse KMTs come NSD1, NSD2, NSD3 e ASH1L ed è arricchita nelle regioni intergeniche. Nei mammiferi, la HMT SETD2 apporta la trimetilazione della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36me3), avente un ruolo chiave durante la trascrizione, dove aiuta il ripristino della compattazione della cromatina a seguito del passaggio della RNAPII. Durante il processo di allungamento del trascritto, SETD2, viene reclutata sulla RNAPII andando ad aggiungere la modifica H3K36me3 sulla sequenza di DNA appena trascritta (Sharda & Humphrey, 2022). L'acetilazione è una PTM degli istoni evolutivamente conservata, tra le prime ad essere stata descritta, con l'acetilazione delle lisine identificata per la prima volta da Allfrey et al. nel 1964. Questa modifica introduce delle cariche negative ai residui di lisina nella coda N-terminale degli istoni; queste cariche respingono il DNA carico negativamente, risultando in uno stato più rilassato della cromatina che facilita il legame dei fattori di trascrizione, incrementando il livello di espressione genica (Alaskhar Alhamwe et al., 2018). Il bilanciamento dinamico dell'acetilazione istonica viene mantenuto da due classi di enzimi: le acetiltransferasi degli istoni (*Histone acetyltransferases*, HATs) e le deacetilasi degli istoni (*Histone deacetylases*, HDACs). Le HATs aggiungono gruppi acetili alle lisine utilizzando acetil-CoA determinando un rilassamento della cromatina, al contrario, le HDACs rimuovono i gruppi acetili portando ad una compattazione della cromatina nel nucleo (R. Liu et al., 2023). Sono state identificate 13 HATs che vengono suddivise in tre famiglie: CPB/p300, GANT e MYST. Invece, le HDACs comprendono 18 membri suddivisi in quattro grandi classi: le HDACs di classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8) sono espresse dalle cellule umane in modo ubiquitario e si trovano principalmente nel nucleo; le HDACs di classe II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10) sono espresse in modo tessuto-specifico e si spostano tra nucleo e citoplasma; le HDACs di classe III, conosciute anche come sirtuine (SIRT 1-7) sono NAD⁺-dipendenti e operano con un meccanismo catalitico unico; la HDAC di classe IV (HDAC 11) è stata trovata sia nel nucleo che nel citoplasma (Duan et al., 2024). L'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27ac) rappresenta una modifica largamente descritta come associata a promotori ed enhancers attivi, si può trovare sia in prossimità che in posizione distale rispetto al TSS, ed è spesso arricchita in geni che promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare. Altri esempi sono: l'acetilazione della lisina 14 dell'istone H3 (H3K14ac) utile a discriminare gli enhancers attivi da quelli inattivi sia globalmente sia a livello di geni specifici; l'acetilazione della lisina 18 dell'istone H3 (H3K18ac) che è spesso associata a trasformazioni oncogeniche e può

essere utile per effettuare valutazioni diagnostiche e prognostiche del paziente; l'acetilazione della lisina 20 dell'istone H4 (H4K20ac), invece, è una acetilazione atipica poiché risulta particolarmente presente a livello dei TSS di geni poco espressi, ma non di quelli completamente silenziati, suggerendo un ruolo nel ridurre l'espressione di geni trascritti piuttosto che nella formazione di eterocromatina che determina il completo silenziamento dei geni (Kaimori et al., 2016; M. Zhu et al., 2025).

La fosforilazione degli istoni ha come bersaglio i residui aminoacidici serina, treonina e lisina, i quali presentano un gruppo ossidrilico. Questa modifica epigenetica comporta una riduzione dell'affinità tra DNA e istoni, facilitando il reclutamento di fattori di trascrizione sul DNA. La fosforilazione, come le altre modifiche istoniche, è reversibile e può essere rimossa dalle fosfatasi (R. Liu et al., 2023). Un evento fondamentale di fosforilazione degli istoni riguarda una variante dell'istone H2A, definita H2AX, che contiene un motivo C-terminale aggiuntivo e rappresenta circa il 10% degli istoni H2A. In quanto la stabilità del genoma viene messa alla prova quotidianamente da danni al DNA, la cellula mette in atto meccanismi di rilevazione, segnalazione e riparo del danno. In risposta ad eventi di DSBs vengono attivati dei pathways che comprendono la fosforilazione della serina 139 dell'istone H2AX, e questo viene chiamato γ -H2AX (Millan-Zambrano, Burton, Bannister, & Schneider, 2022).

L'ubiquitinazione degli istoni è stata scoperta da diverso tempo, e come l'ubiquitinazione di altre proteine richiede tre enzimi: l'enzima attivatore dell'ubiquitina E1, l'enzima legante l'ubiquitina E2 e l'enzima ligasi proteina-ubiquitina E3. La rimozione della modifica coinvolge la famiglia delle ubiquitina carbossi-terminale idrolasi e la famiglia delle proteasi ubiquitina-specifiche. Un'importante modifica di ubiquitinazione è quella della lisina 119 dell'istone H2A (H2AK119ub) che viene catalizzata dal PRC1 ubiquitina ligasi E3 dell'istone H2A. L'ubiquitinazione dell'istone H2A e dell'istone H2B prendono parte a diversi processi coinvolti nella trascrizione genica e nella riparazione dei danni al DNA (R. Liu et al., 2023).

3. STRESS OSSIDATIVO

Nelle cellule eucariotiche, le reazioni di trasferimento degli elettroni (reazioni redox) sono coinvolte in diversi processi come il metabolismo energetico della cellula, la fosforilazione ossidativa, l'attività catalitica degli enzimi e il metabolismo dei farmaci. Alcuni meccanismi coinvolgono enzimi aventi come reazione finale la riduzione di ossigeno molecolare (O_2); ad esempio, il ciclo dell'acido tricarbossilico e la catena di trasporto degli elettroni (ETC) che sono collegati alla membrana mitocondriale interna, dove vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hajam et al., 2022). Oltre ai ROS, esistono le specie reattive dell'azoto (RNS), dello zolfo (RSS), del cloro (RCS) e del bromo (RBS). Alcune specie reattive esistono sotto forma di radicali liberi, atomi e molecole con uno o più elettroni non appaiati. Esempi di radicali liberi tra i ROS sono l'anione superossido ($\bullet O_2^-$), il radicale idrossile ($\bullet OH$) e il radicale carbonato ($CO_3\bullet^-$); l'ossido nitrico ($NO\bullet$) e il diossido di azoto ($NO_2\bullet$) tra i RNS; il bromo atomico ($Br\bullet$) e il radicale dibromato ($Br_2\bullet^-$) tra i RBS. Le specie reattive non radicali includono, ad esempio, il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'ozono (O_3), il nitrato (NO_3^-), il nitrito (NO_2^-) e quasi tutti i membri dei RSS (Hassan, Ahmed, & Hassan, 2024). Questi agenti ossidanti possono derivare da sorgenti esogene (farmaci, inquinamento, raggi UV, agenti chimici e radiazioni ionizzanti) oppure sorgenti endogene. I mitocondri sono la fonte endogena primaria di produzione dei ROS attraverso la fosforilazione ossidativa, durante la quale O_2 viene ridotto ad acqua (H_2O) nella ETC per la produzione di energia sotto forma di ATP. Il principale ROS prodotto nei mitocondri è l'anione superossido, e sono stati riconosciuti ben sette siti di produzione: i siti di legame dell'ubichinone nel complesso I (sito IQ) e nel complesso III (sito IIIQo), la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (GPDH), la flavina nel complesso I (sito IF), la proteina electron transferring flavin Q oxidoreductase (ETFQOR) della β -ossidazione degli acidi grassi, la piruvato deidrogenasi e la 2-ossoglutarato deidrogenasi (Hajam et al., 2022). La fonte secondaria di produzione di ROS sono le NADPH ossidasi (*NADPH oxidases*, Noxs), localizzate in vari distretti, che trasportano elettroni attraverso le membrane biologiche generando anioni superossido. Altri compartimenti che contribuiscono alla generazione di ROS sono il reticolo endoplasmatico e i perossisomi (Hajam et al., 2022). In condizioni fisiologiche, lo stress ossidativo, viene mantenuto a bassi livelli nei tessuti grazie agli antiossidanti, sistemi naturali di difesa. Gli antiossidanti sono classificati in due tipologie: gli antiossidanti enzimatici come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx) e gli antiossidanti non enzimatici, comprendenti le vitamine (vitamine A, C, E), il glutatione (GSH), il coenzima Q10 (CoQ10), la tioredossina (Trx) e i

polifenoli. La SOD converte l'anione superossido in H_2O_2 che, nonostante sia un agente ossidante, presenta una reattività decisamente inferiore. Nei mammiferi ne esistono tre tipologie: le SOD contenenti rame (Cu-SOD) e zinco (Zn-SOD), conosciute come SOD1 e localizzate principalmente nel citoplasma; le SOD contenenti manganese (Mn-SOD), conosciute come SOD2 e presenti nella matrice mitocondriale; le SOD extracellulari (EC-SOD), conosciute come SOD3, sono le uniche presenti nella matrice extracellulare e nei fluidi corporei. Il GSH può essere sfruttato dalla GPx come agente riducente per trasformare H_2O_2 in H_2O , venendo ossidato a glutatione disolfuro (GSSG). In aggiunta, può neutralizzare direttamente diversi agenti ossidanti, venendo sempre ossidato a GSSG. Il GSSG viene riconvertito alla sua forma attiva attraverso la glutatione reduttasi (GR), usando il NADPH come donatore di elettroni (**Figura 7**) (H. Liu et al., 2026).

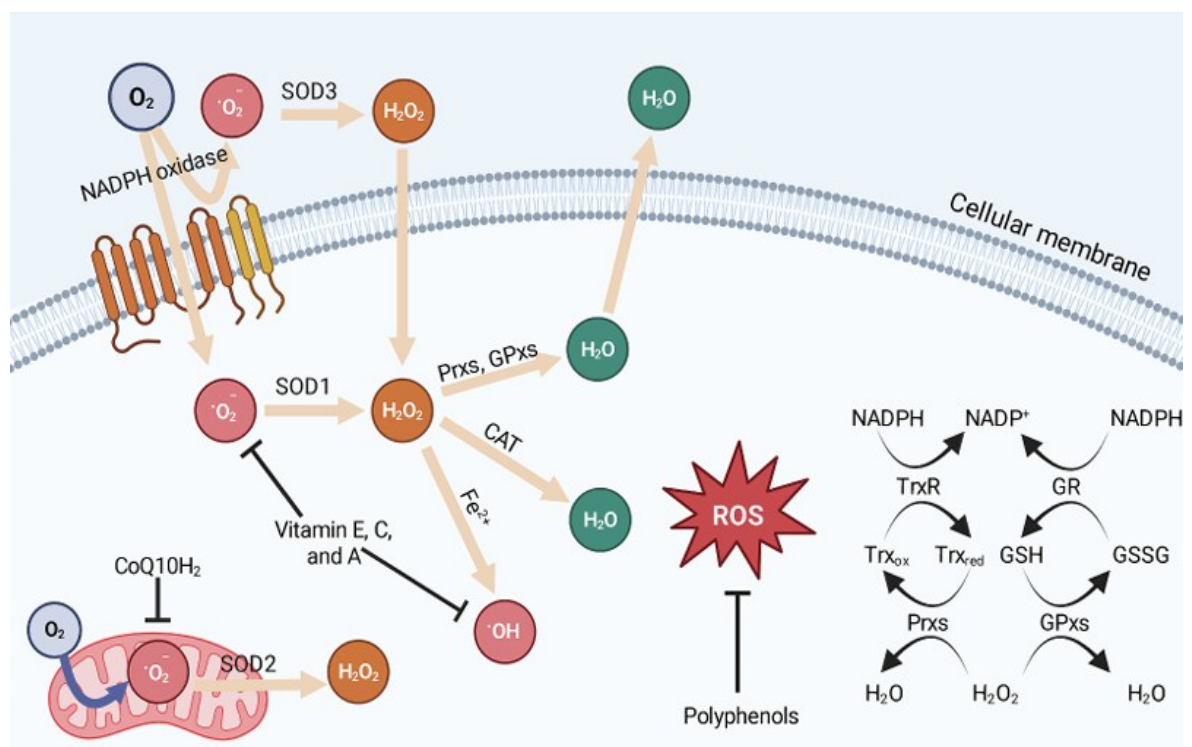


Figura 7. Sistemi di difesa antiossidante nelle cellule. I ROS vengono generati a livello dei mitocondri e della membrana cellulare, principalmente attraverso le NADPH ossidasi e la ETC. Le SOD trasformano l'anione superossido ($\bullet O_2^-$) in H_2O_2 , che viene neutralizzata dalle CAT e da altri enzimi antiossidanti. Agenti antiossidanti non enzimatici come le vitamine, il GSH e i polifenoli riducono i livelli dei ROS. I sistemi basati su Trx e GSH aiutano a mantenere l'omeostasi redox (H. Liu et al., 2026).

I ROS, se mantenuti entro certi livelli, sono fondamentali per la cellula agendo come molecole di segnalazione in vari processi cellulari come la proliferazione, il differenziamento, la risposta immunitaria e gli adattamenti metabolici (H. Liu et al., 2026). Il pathway di NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) è un sistema di difesa

primario contro lo stress ossidativo. In condizioni basali, nel citoplasma, NRF2 viene sequestrato da Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) e portato a degradazione. Tuttavia, se i ROS ossidano precise cisteine di Keap1 determinano la stabilizzazione e la traslocazione nucleare di NRF2, che si lega alle sMaf (*small Maf proteins*) attivando l'espressione di geni antiossidanti. I ROS sono coinvolti anche nel pathway di NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) collegato alla risposta infiammatoria. Questi attivano il complesso IKK, portando alla fosforilazione di I κ B, che permette a NF- κ B di traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni coinvolti nella risposta immunitaria. Il pathway di AP-1 (*activator protein 1*), attivato tramite le MAP chinasi (MAPKs) in risposta ai ROS, gioca un ruolo fondamentale nella proliferazione, nel differenziamento e nell'apoptosi cellulare. Il pathway di AMPK, che porta alla trascrizione del gene FoxO, è coinvolto nei sistemi di difesa antiossidanti stimolando la biogenesi mitocondriale e l'adattamento allo stress (**Figura 8**) (Anwar, Alharbi, Babiker, & Rahmani, 2026).

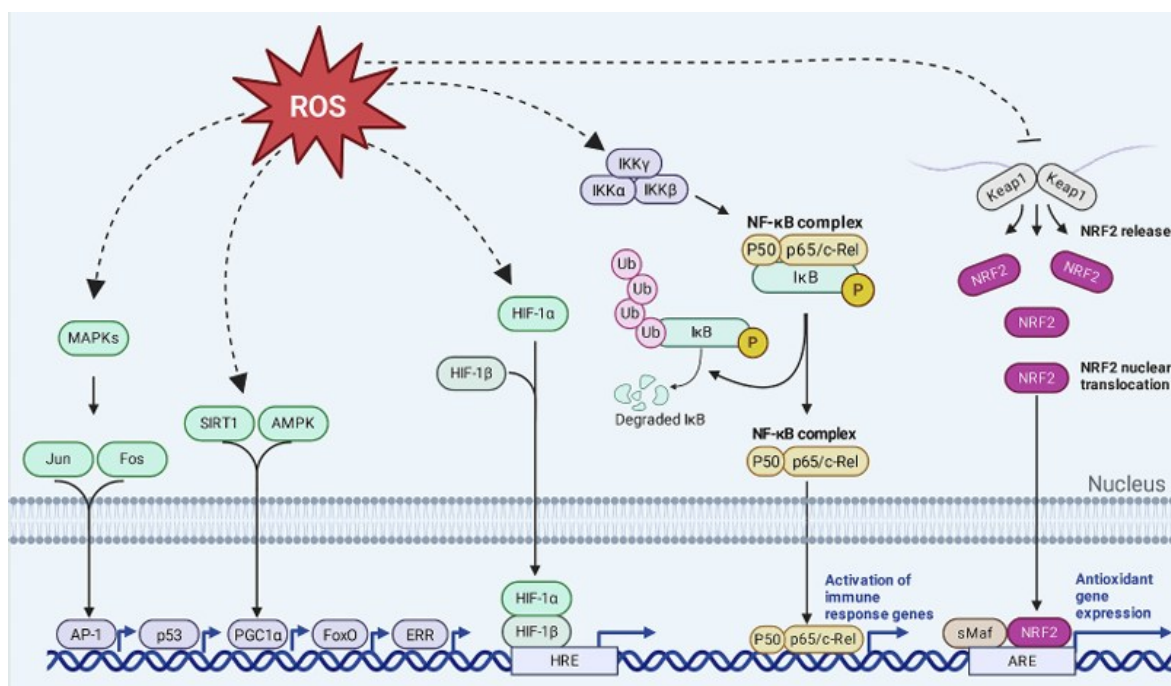


Figura 8. *Pathways correlati allo stress ossidativo.* I ROS attivano diverse vie di segnalazione cellulare, tra cui le vie di MAPKs, AMPK, HIF-1 α , NF- κ B e NRF2. Questi pathways regolano diverse risposte cellulari come la proliferazione, il differenziamento, la risposta immunitaria, l'infiammazione e la difesa antiossidante. Con un accumulo di ROS alcuni fattori di trascrizione come NRF2 e NF- κ B traslocano nel nucleo dove attivano, rispettivamente, l'espressione di geni coinvolti nella difesa antiossidante e nella risposta immunitaria (H. Liu et al., 2026).

Nonostante la loro importanza fisiologica, uno sbilanciamento tra concentrazione di ROS e sistemi antiossidanti altera i normali livelli di stress ossidativo, determinando il passaggio

da uno stato fisiologico (eustress ossidativo) ad uno stato patologico (distress ossidativo), che causa danni alle componenti cellulari contribuendo all'invecchiamento e all'insorgenza di patologie, tra cui malattie cardiovascolari, disturbi neurodegenerativi, il diabete e il cancro (H. Liu et al., 2026). Ad esempio, l'invecchiamento, è un graduale declino della resilienza fisiologica, strettamente legato alla produzione di ROS, a disfunzione mitocondriale e infiammazione persistente. Con l'avanzare dell'età la ETC diventa meno efficiente portando ad una maggiore produzione di ROS, aumentando così i danni al DNA mitocondriale. I danni accumulati ai mitocondri attivano le vie di segnalazione infiammatorie scatenando la SASP (*Senescence-associated secretory phenotype*); in aggiunta, i danni causati ad altre componenti cellulari come lipidi, proteine e DNA contribuiscono alla senescenza cellulare. I danni al DNA attivano una risposta cellulare che stabilizza la proteina p53 e attiva gli inibitori delle chinasi delle cicline, arrestando il ciclo cellulare e partecipando allo sviluppo della senescenza. Inoltre, le cellule senescenti secernono citochine pro-infiammatorie, metalloproteasi della matrice, e altri fattori che contribuiscono alla degenerazione tissutale (Gonzalez Acevedo, Powers, & Cucullo, 2026).

Un eccesso di ROS nella cellula causa danni a macromolecole come lipidi, proteine e DNA. I ROS attaccano i doppi legami carbonio-carbonio degli acidi grassi insaturi generando radicali lipidici. Questi radicali reagiscono con l'ossigeno formando radicali perossidilici lipidici, i quali attaccano altri lipidi formando nuovi radicali lipidici che continuano a reagire con l'ossigeno, creando una reazione a catena che guida la perossidazione lipidica, contribuendo alla destabilizzazione delle membrane cellulari. Inoltre, un eccesso di stress ossidativo può compromettere le proteine cellulari alterando la conformazione tridimensionale, la funzionalità o causando la loro frammentazione, attraverso la rottura dei legami peptidici e delle catene laterali degli aminoacidi. La carbonilazione delle proteine, un marcatore di stress ossidativo, è una modifica irreversibile dovuta ad ossidazione che attacca aminoacidi come lisina, arginina, istidina, prolina e treonina, formando gruppi carbonile. In aggiunta, può causare anche effetti reversibili come l'ossidazione dei gruppi tiolici (-SH) delle cisteine, formando ponti disolfuro.

L'eccesso di ROS può comportare anche la morte cellulare per mezzo di diversi meccanismi come l'apoptosi, la necrosi o la ferroptosi. L'apoptosi viene attivata tramite il rilascio del citocromo C nel citoplasma da parte dei mitocondri o attraverso una sovraespressione dei recettori di morte e dei loro ligandi, innescando una cascata di segnalazione che attiva le caspasi responsabili della morte cellulare controllata. Quando, invece, l'eccesso di ROS è eccessivamente elevato avviene la rottura delle membrane cellulari, dei lisosomi e dei mitocondri scatenando la necrosi, che provoca una risposta infiammatoria dovuta alla

fuoriuscita delle componenti cellulari (Gabriella, Luca, & Alessandra, 2026; H. Liu et al., 2026). Il danno al DNA può essere causato da un'eccessiva produzione di ROS nelle cellule. Esistono varie sorgenti capaci di danneggiare il DNA con la formazione di ROS come radiazioni ionizzanti e agenti chimici. Ad esempio, la genotossicità indotta da due agenti chemioterapici come la doxorubicina e il cisplatino può aumentare i livelli di ROS e inibire i sistemi di difesa antiossidante (GSH, SOD, CAT). I ROS provocano la perforazione della membrana dei mitocondri portando al rilascio del citocromo C che inizia il processo di apoptosi; inoltre, a cascata il citocromo C e la caspasi 9 attivano la caspasi 3, che attiva le PARP portando alla frammentazione del DNA (Hajam et al., 2022). Una lesione estremamente pericolosa sono i DSBs che possono essere mutagenici portando a riarrangiamenti cromosomici, per cui la cellula attiva una serie di risposte per riparare questo danno in modo efficace. Inoltre, i ROS possono danneggiare il DNA ossidando le basi azotate dei nucleotidi; un classico esempio è la formazione della 8-ossio-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxoG), la quale può legarsi alla timina al posto della citosina e portare a mutazioni nella sequenza del DNA. Per cui, l'ossidazione delle basi azotate viene riparata dai meccanismi di riparazione del DNA, in particolare dal BER. Il danno al DNA può, anche, portare alla perdita di informazioni epigenetiche, probabilmente a causa dell'alterazione nella metilazione del DNA nelle isole CpG (**Figura 9**) (Hajam et al., 2022).

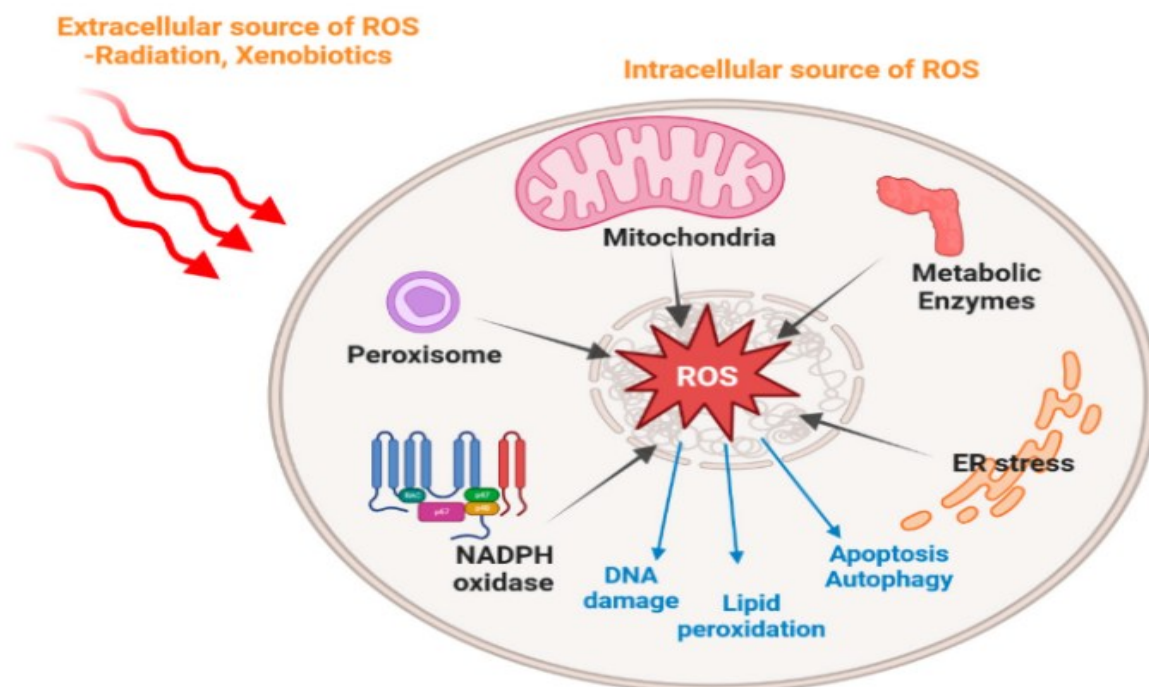


Figura 9. Rappresentazione schematica delle sorgenti di ROS e dei danni da loro indotti. Sorgenti esogene come radiazioni e xenobiotici, o sorgenti interne come mitocondri, metabolismo degli enzimi, NADPH ossidasi, stress del reticolo endoplasmatico e perossisomi portano alla produzione

di ROS. Un eccesso di ROS comporta danni alle componenti cellulari, potendo causare danno al DNA, perossidazione lipidica, autofagia e apoptosi (Hong, Boiti, Vallone, & Foulkes, 2024).

Il fegato e i reni sono gli organi maggiormente colpiti dall'attacco dei ROS a causa del loro coinvolgimento nei processi metabolici e di filtrazione. Nel fegato, l'ossidazione delle biomolecole comporta l'attivazione della risposta immunitaria e lipoapoptosi delle cellule epatiche, inoltre porta all'alterazione delle membrane biologiche con conseguente deuteriazione che determina la deposizione di collagene negli epatociti causando fibrosi epatica e cirrosi. Nel rene, l'eccesso di ROS avvia la produzione di varie citochine pro-infiammatorie che innescano un'inflammazione nefrotica influenzando le funzionalità renali (Hajam et al., 2022).

3.1 STRESS OSSIDATIVO NEGLI EPATOCITI

Il fegato gioca un ruolo chiave nell'omeostasi sistemica dell'organismo, comprendendo processi fondamentali come il metabolismo del colesterolo e degli acidi biliari, la detossificazione (alcohol, farmaci, endo- e xenobiotici), la sintesi e il deposito di glucosio, il turnover lipidico, il metabolismo degli ormoni e la secrezione di proteine plasmatiche. La maggior parte di queste funzioni sono svolte dagli epatociti, cellule parenchimali che rappresentano l'80% della massa del fegato e il 60% della sua componente cellulare. Nel fegato sono presenti almeno altre sei tipologie cellulari: le cellule epiteliali biliari, le cellule endoteliali sinusoidali, le cellule stellate, le cellule dendritiche, i macrofagi e oltre ad altre cellule del sistema immunitario. Queste cellule supportano gli epatociti nello svolgimento delle loro funzioni e, insieme ad essi, sono organizzati in strutture anatomiche tridimensionali, sotto forma di colonne esagonali chiamate lobuli epatici. I lobuli sono perfusi da sangue proveniente da due tipologie di vasi: il sangue della vena porta, ricco di nutrienti, tossine e molecole derivanti dall'assorbimento intestinali, e il sangue dell'arteria epatica, ricco di ossigeno. Questi vasi sanguigni afferenti entrano nei lobuli epatici tramite alcune diramazioni, formando vasi capillari che alla fine drenano nella vena centro-lobulare. È interessante come i compiti metabolici degli epatociti variano in base alla loro posizione nel lobulo epatico: gli epatociti più periferici svolgono compiti che richiedono ATP come la sintesi di albumina e glicogeno, la gluconeogenesi e il ciclo dell'urea; gli epatociti più centrali si occupano della produzione di acidi biliari e contribuiscono al metabolismo dell'ammoniaca; gli epatociti che si trovano nel mezzo tra le altre due tipologie svolgono diverse funzioni basate sull'attività del citocromo P450 (CYP) (Berasain, Arechederra,

Argemi, Fernandez-Barrena, & Avila, 2023). Gli enzimi CYP giocano un ruolo chiave in particolare nel metabolismo dei farmaci, ma anche nel metabolismo cellulare e nell'omeostasi generale. Le reazioni del metabolismo dei farmaci possono essere suddivise in reazione di fase I e di fase II. Le reazioni di fase I introducono gruppi reattivi o polari sulle molecole bersaglio, incluse ossidazioni, riduzioni e idrolisi quando i farmaci non possono essere eliminati dal corpo. Le reazioni di fase II coniugano le molecole dei farmaci a molecole polari (sintetizzate da diversi enzimi cellulari) come la uridina-difosfato (UDP)-glucuronosiltransferasi. I farmaci coniugati possono essere ulteriormente processati prima di essere espulsi dalle cellule (M. Zhao et al., 2021). Il fegato ha un enorme potenziale nella generazione di ROS, per via dei diversi processi che li producono, e la cronicizzazione di una produzione eccessiva di ROS può scatenare lo sviluppo di fibrosi, cirrosi o carcinoma epatocellulare. Ad esempio, l'attività degli enzimi CYP produce ROS, nello specifico anione superossido. Lo squilibrio dei processi metabolici del fegato porta ad un aumento nella produzione di ROS, come il sovraccarico di acidi grassi nella NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) che aumenta la produzione di ROS incrementando il trasferimento di elettroni durante la β -ossidazione dei lipidi, ma anche incrementando l'espressione e l'attività dell'enzima CYP2E1. Un aumento di CYP2E1 avviene anche per l'eccessivo consumo di etanolo, che durante il suo metabolismo viene convertito ad acetaldeide, la quale genera stress ossidativo attraverso meccanismi diretti e indiretti. Anche il sovraccarico di ferro costituisce una sorgente di stress ossidativo, in quanto gli epatociti sono il principale deposito di ferro nel corpo. Il ferro, componente fondamentale delle proteine ossigeno-sensibili, dei sistemi di trasporto dell'ossigeno e degli enzimi contenenti centri ferro-zolfo, è un metallo che può essere convertito tra la forma ridotta (Fe^{2+} , ione ferroso) e la forma ossidata (Fe^{3+} , ione ferrico). La maggior parte del ferro è sotto forma Fe^{3+} nelle strutture che contengono ferro, mentre la riduzione a Fe^{2+} è necessaria per il suo trasporto e mobilitazione attraverso le membrane biologiche, nel suo caricamento sulla ferritina e nella sintesi dei gruppi eme. Negli epatociti, la maggior parte del ferro viene depositato nel citoplasma, nel reticolo, nei mitocondri e nei lisosomi sotto forma di Fe^{3+} legato alla ferritina. Tuttavia, vi è una quota libera (tra 0,2% e 5%) sotto forma di Fe^{2+} che è potenzialmente tossica poiché può generare ioni idrossile tramite le reazioni di Fenton o di Haber-Weiss, reagendo rispettivamente con H_2O_2 e anione superossido. Quindi, una perdita di ferro attraverso membrane cellulari alterate può portare alla produzione di ROS, promuovendo la perossidazione lipidica e gravi danni cellulari. I mitocondri sono particolarmente sensibili ai ROS derivati dal ferro, in quanto sono tra i maggiori produttori di ROS durante la

respirazione cellulare e contengono diversi enzimi con centri ferro-zolfo (Mello, Zanieri, Ceni, & Galli, 2016).

3.2 IL BROMATO DI POTASSIO

Il bromato di potassio (KBrO_3) è stato ampiamente utilizzato nella disinfezione delle acque, nella preparazione di prodotti per colorare i capelli, così come il comparto cosmetico e l'industria alimentare. È anche un sottoprodotto del processo di clorinazione dell'acqua potabile. KBrO_3 è un agente ossidante che è stato utilizzato per la preparazione del pane come un additivo alimentare sicuro negli USA. Normalmente, durante il processo di preparazione del pane, viene trasformato in un composto stabile, il bromuro di potassio; tuttavia, non sempre questa conversione avviene completamente, e il KBrO_3 residuo rimane nel pane rendendolo un potenziale carcinogeno per gli umani. Infatti, la International Agency for Research on Cancer (IARC) ha inserito il KBrO_3 come “un potenziale carcinogeno per gli umani” di gruppo 2B, basandosi su evidenze scientifiche che dimostrano la sua capacità di promuovere lo sviluppo del cancro negli animali. In aggiunta, KBrO_3 induce stress ossidativo nelle cellule alterando la loro fisiologia. Lo stress ossidativo indotto da KBrO_3 è capace di provocare danni al DNA sia a livello nucleare che a livello mitocondriale (Al-Mareed, Farah, Al-Anazi, Hailan, & Ali, 2022). KBrO_3 danneggia il DNA attraverso l'ossidazione delle basi azotate degli acidi nucleici, in particolare la guanina viene ossidata a 8-ossio-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxoG). Per attivare questo processo è necessaria la presenza di glutazione e/o cisteina (Cys), in quanto mediano la conversione di KBrO_3 a BrO_2 , il quale viene ridotto a BrO_2^- sottraendo un elettrone alla guanina. L'ossidazione della guanina genera un radicale cationico al sito 5' della guanina nelle sequenze GG e GGG del DNA a doppio filamento. Questo radicale reagisce con una molecola di H_2O formando un radicale addotto C-8 OH, seguito da una ossidazione, che porta alla formazione di 8-oxoG (Kawanishi & Murata, 2006). La 8-oxoG è una comune lesione del DNA indotta dallo stress ossidativo che porta ad errori durante la fase di replicazione sotto forma di sostituzioni $\text{G} > \text{T}$. Le mutazioni indotte dallo stress ossidativo sono riparate dall'attività del BER che elimina la 8-oxoG nel DNA a doppio filamento. Il BER è un meccanismo in grado di riparare forme di danno dovute a ossidazione, deaminazione, alchilazione o formazione di siti abasici (APs) che hanno un effetto praticamente nullo sulla stabilità dell'elica del DNA (**Figura 10**) (Gohil, Sarker, & Roy, 2023).

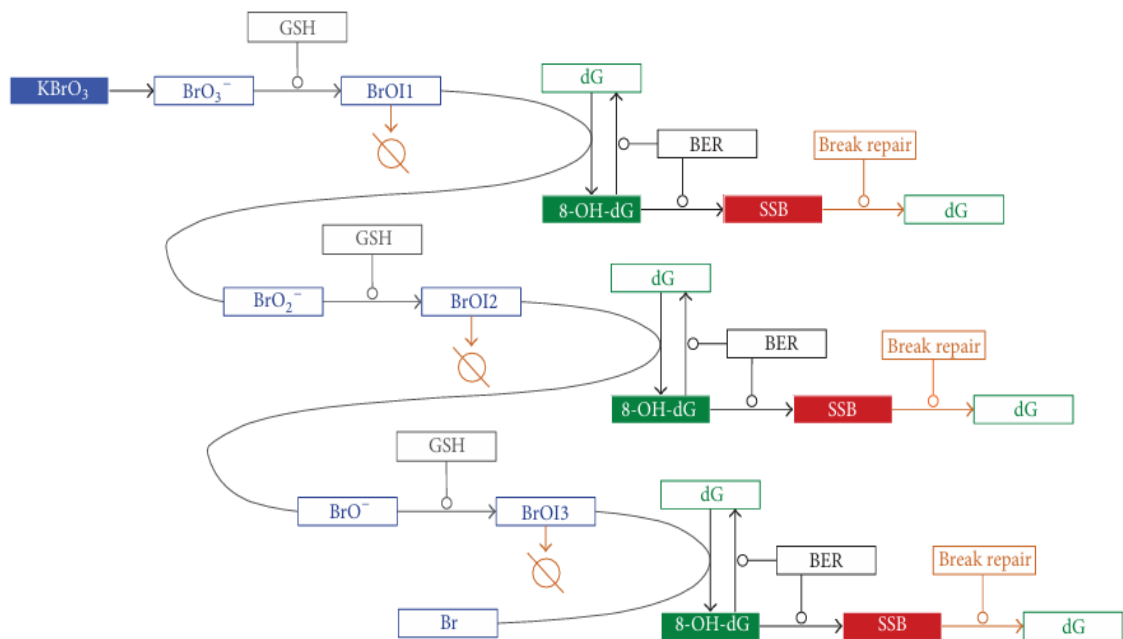


Figura 10. Meccanismo d'azione di $KBrO_3$. Il bromato (BrO_3^-) reagisce con il GSH per formare un intermedio reattivo ($BrOI1$), che sottrae un elettrone alla guanina portando alla formazione di un addotto 8-OH-dG. Ogni molecola di $KBrO_3$ ha tre possibilità di formare un addotto poiché questo ciclo di danno può ripetersi altre due volte con BrO_2^- e BrO^- . La riparazione avviene ad opera del BER che ha una piccola percentuale di errore creando SSB che vengono, a loro volta, riparate dai meccanismi preposti (Spassova, Miller, & Nikolov, 2015).

La 8-oxoG è altamente mutagena per la sua capacità di legarsi alle adenine e ciò può provocare mutagenesi trascrizionale con sostituzione $G > T$ e sostituzione complementare $C > A$. Una caratteristica comune dei tumori negli umani è la SBS18 (*single base substitution signature 18*) che consiste nella transversione $GC > TA$ e si pensa abbia origine da una lesione 8-oxoG non riparata. La SBS18 è una mutazione che è stata riscontrata circa nel 50% dei tumori umani sequenziati e contribuisce a circa 300 mutazioni per genoma (Cordero et al., 2024).

Il BER è un meccanismo di riparazione del DNA che agisce in più fasi: inizialmente vi è il riconoscimento della base danneggiata da parte di una DNA glicosilasi specifica per il danno, con la successiva rimozione di un solo nucleotide o anche di più nucleotidi nel suo intorno. L'attività delle DNA glicosilasi forma siti AP (conosciuti anche come siti apurinici/apirimidinici), che vengono processati da APE1 (*Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) formando rotture a singolo filamento (*single-strand break*, SSB). Infine, una cascata enzimatica che coinvolge diverse DNA polimerasi (POL β , δ , ϵ) e le DNA ligasi I e II completano il processo di riparazione. Negli esseri umani, esistono undici diverse DNA glicosilasi specifiche per diversi tipi di danno, ma che spesso sono ridondanti. L'8-oxoG è

la lesione ossidativa al DNA più abbondante e viene riconosciuta dalla DNA glicosilasi OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase 1*) sia nel nucleo che nel mitocondrio (Renaudin & Campalans, 2025). Nelle cellule il riconoscimento e la rimozione della base da parte di OGG1 è lo step limitante del tasso di riparazione del BER, probabilmente per i limiti di accessibilità alla cromatina. Infatti, è stato precedentemente dimostrato che OGG1, insieme alle proteine coinvolte nel BER, viene reclutato principalmente a livello di regioni meno condensate e ricche in mRNA e RNAPII, mentre viene escluso dalle regioni eterocromatiche, a causa della loro maggiore compattazione (Cordero et al., 2024). Nel 2020 il gruppo di Lebraud et al. ha approfondito il meccanismo di reclutamento di OGG1 ai siti di lesione della 8-oxoG. Da questo studio è emerso che OGG1 necessita dell'intervento di altri due fattori per il riconoscimento della lesione, la coesina e il mediatore. I complessi coesina-mediatore sono coinvolti nella stabilizzazione dell'organizzazione della cromatina. Inizialmente è stato evidenziato il ruolo della coesina nella coesione e nella segregazione cromosomica durante la mitosi, ma la coesina è fondamentale anche nel nucleo interfase dove regola la formazione e la stabilità dei TADs. Le coesine possono essere classificate in due tipologie: quelle associate con i CTCF, e quelle associate con fattori di trascrizione (TFs), mediatori e NIPBL (*Nipped-B-like protein*). Nell'uomo, i mediatori sono circa 30 subunità, suddivise in quattro moduli: testa, corpo centrale, coda e chinasi CDK8. Al fine di identificare le proteine coinvolte con OGG1 nell'associazione con la cromatina è stato svolto un esperimento di screening su loss-of-function delle proteine basato su siRNAs, in cellule HeLa che esprimevano una proteina di fusione OGG1-GFP. Le cellule sono state trasfettate con una libreria di siRNAs e successivamente esposte al trattamento con KBrO₃ per tre ore. In seguito, le cellule sono state fissate e contrastate con Hoechst 33342; la frazione di OGG1-GFP legata alla cromatina è stata quantificata con high-content imaging. Da questa analisi sono risultati 81 geni potenzialmente coinvolti nell'associazione di OGG1 con la cromatina, tra questi figuravano tre componenti dell'anello di coesina (SMC1, SMC3 e Rad21) e due mediatori (MED12 e MED14). Per confermare l'importanza di questa associazione per la riparazione del danno da 8-oxoG, è stato effettuato un esperimento di immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo anti-8-oxoG. Questo esperimento ha confermato che nelle cellule esposte a KBrO₃, in presenza di siRNA contro SMC3 o MED14, il livello di 8-oxoG restava maggiore rispetto alle cellule non trattate con siRNA, dimostrando l'importanza dell'intervento del complesso coesina-mediatore per il riconoscimento del danno da parte della DNA glicosilasi OGG1 (Lebraud et al., 2020). Se OGG1 fallisce nella riparazione del danno, la 8-oxoG può essere appaiata ad una adenina, da parte di una DNA polimerasi, durante la replicazione del DNA. Questo mismatch 8-oxoG:A viene identificato da una

seconda DNA glicosilasi, MUTYH, che rimuove l'adenina lasciando un sito AP che viene rimosso dal BER. A causa del loro ruolo diretto nella rimozione della 8-oxoG o dei mismatch 8-oxoG:A, una perdita di funzione di OGG1 o MUTYH (*MutY homolog*) aumenta la frequenza di mutazione, con sostituzione G > T e complementare C > A (Cordero et al., 2024). Il danno da 8-oxoG, inoltre, se non riparato, può causare errori nella trascrizione, portando a transversioni C > A negli mRNA con conseguente produzione di proteine dalla sequenza alterata, contribuendo allo sviluppo di diverse patologie. Inoltre, la 8-oxoG può anche agire come modifica epigenetica atipica modificando la stabilità dei fattori regolatori della trascrizione al promotore, inclusi i TFs, ma anche alterando la metilazione delle isole CpG e la distribuzione delle modifiche istoniche. Principalmente, la formazione di 8-oxoG compromette l'integrità dei fattori regolatori al promotore, risultando in un minore reclutamento di TFs come NF-κB, SP1 e CREB (*cAMP-response element-binding protein*) (**Figura 11**) (Zheng, Chen, Liu, Wang, & Zhang, 2025).

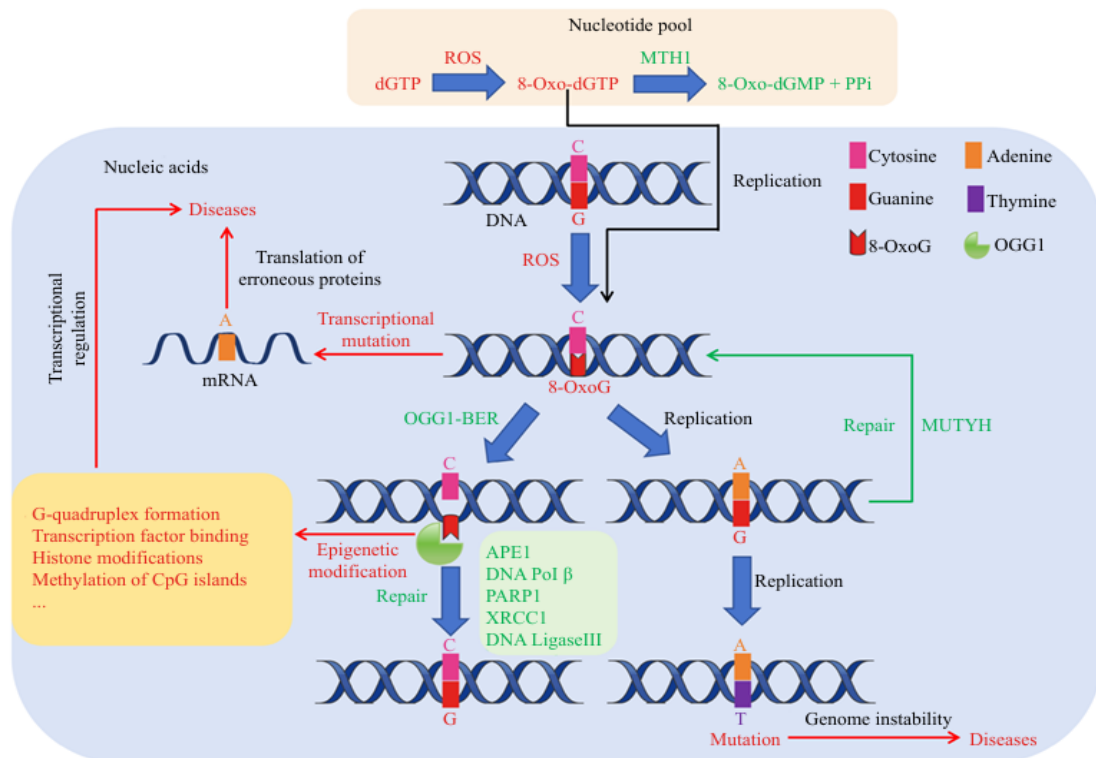


Figura 11. Formazione, patogenesi e riparazione di 8-oxoG. I ROS provocano l'ossidazione della guanina a 8-oxoG. La trascrizione del DNA contenente la 8-oxoG determina transversioni C > A negli mRNA portando a mutagenesi trascrizionale con traduzione di proteine non corrette. La 8-oxoG può essere riconosciuta da OGG1 e riparata dal BER, ripristinando la guanina non ossidata. La replicazione del DNA può comportare un mismatch 8-oxoG:A che viene riparato da MUTYH. Se questo non succede un ulteriore ciclo di replicazione può fissare una mutazione con definitiva conversione GC > TA (Zheng et al., 2025).

4. RISPOSTA CROMATINICA ALLO STRESS OSSIDATIVO

La struttura tridimensionale (3D) del genoma è fondamentale per stabilire il destino cellulare e mantenere le normali funzioni cellulari. Il genoma, nella sua organizzazione 3D, non è un elemento statico, ma altamente dinamico, in quanto questa struttura è soggetta a cambiamenti dinamici durante diversi processi fisiologici, come il differenziamento, lo sviluppo e la senescenza cellulare, oltre che patologici come la neurodegenerazione o il cancro (H. Liu et al., 2023). La dinamicità gioca un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione di specifiche regioni del genoma, quindi nel controllo dell'espressione genica (Magana-Acosta & Valadez-Graham, 2020). Le cellule staminali pluripotenti, aventi la capacità di differenziarsi in qualsiasi cellula somatica dell'organismo, presentano proprietà uniche supportate dal loro profilo epigenetico, caratterizzato da un basso livello di metilazione del DNA e di marcatori eterocromatinici. Inoltre, l'organizzazione 3D del genoma di queste cellule vede una prevalenza di compartimenti di tipo A, favorevoli alla trascrizione, rispetto a quelli di tipo B; in aggiunta sono presenti interazioni a lungo raggio tra regioni del genoma guidate da PRC1/2. Per cui, questo ambiente cromatinico estremamente favorevole alla trascrizione deve essere riorganizzato nel momento in cui una cellula staminale intraprende il processo di differenziamento, per acquisire la definitiva identità cellulare della cellula somatica di arrivo (Pelham-Webb, Murphy, & Apostolou, 2020). La stabilità di una cellula richiede una memoria dei suoi stati precedenti e un modo per valutare se sta deviando dallo stato appropriato. Ci sono due tipologie di memoria ritenute importanti per il mantenimento dell'identità cellulare, la memoria basata su un network (memoria globale o *trans*) e la memoria basata sulla cromatina (memoria locale o *cis*) che si basano su meccanismi di feedback. La memoria globale è rappresentata da complessi networks di geni regolatori (*gene regulatory networks*, GRNs) coordinati da combinazioni di fattori di trascrizione che riconoscono e attivano specifici geni. Questo sistema si basa su un'organizzazione gerarchica, guidata da fattori di trascrizione "master" della regolazione che, a loro volta, sono finemente regolati tramite meccanismi di feedback. La memoria locale è basata sulla cromatina, in particolare è rappresentata dal mantenimento delle regioni di eterocromatina ed eucromatina. L'esempio più classico della stabilità di questa memoria è l'inattivazione di uno dei due cromosomi X durante la vita di un organismo di sesso femminile. Questa memoria è plastica, e può fissare le risposte cellulari agli stimoli se questi perdurano nel tempo. Ad esempio, se un determinato evento riduce l'espressione di un gene, ma è limitato nel tempo, non porterà alla fissazione di questo cambiamento, che verrà ripristinato al livello originario una volta terminato lo stimolo. Tuttavia, se lo stimolo

perdura a lungo, il gene potrebbe essere silenziato e posto in forma di eterocromatina, o al contrario geni sovraespressi dallo stimolo potrebbero diventare più accessibili e facilmente attivabili in futuro; quindi, uno stato che precedentemente risultava instabile potrebbe venire stabilizzato (Arendt et al., 2016; Berry, Dean, & Howard, 2017; Bell, Faulkner, & Gilan, 2024). Un processo fisiologico come l'invecchiamento cellulare, che vede un aumento nella produzione di ROS, porta a cambiamenti nell'organizzazione 3D del genoma. Alcuni studi sull'interazione dei cromosomi, in fibroblasti umani provenienti da giovani e anziani, hanno rivelato che il 15% delle interazioni inter-cromosomiche erano uniche delle cellule giovani o anziane (Braunger, Cammarata, Sornapudi, Uhler, & Shivashankar, 2024). Contestualmente, durante l'invecchiamento, avvengono cambiamenti nella compartimentalizzazione con regioni genomiche che possono passare dai compartimenti di tipo A ai compartimenti di tipo B e viceversa; tuttavia, l'evento più frequente è un cambiamento nello stato di alcune regioni genomiche, che possono diventare più o meno attive senza cambiare compartimento. Inoltre, i confini dei TAD sembrano rimanere piuttosto stabili, nonostante una diminuzione nella loro forza porta a maggiori interazioni tra TADs diversi (inter-TADs) e minori interazioni di elementi regolatori nello stesso TAD (intra-TADs), comportando cambiamenti nell'espressione genica (Ma & Sen, 2026).

Le cellule sono costantemente esposte a diverse tipologie di stress, compresi fattori ambientali (temperatura, patogeni o scarsa disponibilità di nutrienti) e fattori interni (stress cellulare, mutazioni o invecchiamento). Per cui, le cellule sono in grado di rispondere a questi stimoli riprogrammando l'epigenoma, variando le PTMs degli istoni, la metilazione del DNA e l'espressione genica. I fattori di stress ambientali possono essere tradotti in segnali intracellulari, come intermedi metabolici (acetil-CoA, S-adenosilmetionina, succinato, NAD^+) e specie reattive, per indurre l'attivazione di una risposta cellulare adeguata. I mitocondri, ad esempio, sono fondamentali nel fornire intermedi metabolici che servono come donatori nei processi epigenetici (Romero-Bueno, de la Cruz Ruiz, Artal-Sanz, Askjaer, & Dobrzynska, 2019). Tuttavia, determinati agenti chimici possono alterare le normali risposte fisiologiche delle cellule, portando a cambiamenti potenzialmente patologici nell'organizzazione del genoma. I meccanismi epigenetici rispondono ai segnali derivanti da agenti ossidativi con cambiamenti dell'espressione genica. La metilazione del DNA, mediata dalle DNMTs, può essere inibita dall'ossidazione delle guanine a 8-oxoG, riducendo globalmente la densità della metilazione. Infatti, un eccesso di ROS può portare all'esaurimento delle riserve di SAM o all'ossidazione dei residui di cisteina nel sito catalitico delle DNMTs, con la formazione di ponti disolfuro. Al contrario, un'esposizione transiente ad un eccesso di ROS potrebbe, invece, comportare un'iperattivazione degli

enzimi TET con incremento di 5hmC e diminuzione dei livelli di 5mC (Lio & Rao, 2019). Tuttavia, un'esposizione prolungata allo stress ossidativo inibisce l'attività degli enzimi TET, esaurendo le riserve di cofattori come Fe^{2+} e α -chetoglutarato, causando un ipermetilazione sito-specifica dei geni oncosoppressori e riducendo l'espressione di geni coinvolti nella risposta antiossidante (Joshi, Liu, Breslin, & Zhang, 2022). In condizione di stress ossidativo la funzionalità di enzimi coinvolti nell'acetilazione e deacetilazione degli istoni può essere profondamente alterata. Ad esempio, in alcuni disturbi neurodegenerativi l'attivazione delle proteine PARP-1 durante la riparazione dei danni al DNA porta all'esaurimento dei livelli di NAD^+ , determinando la soppressione dell'attività di SIRT1, una deacetilasi istonica NAD^+ -dipendente, risultando in una iperacetilazione degli istoni H3 e H4 che altera l'espressione genica (Basavarajappa & Subbanna, 2021). Al contrario, Mercado et al. hanno mostrato che in cellule epiteliali umane lo stress ossidativo può attivare le HDACs di classe I e II causando ipoacetilazione e soppressione dei geni antiossidanti (Mercado et al., 2011). Inoltre, i ROS possono alterare anche le HDMs come KDM6B causando un aumento di marcatori repressivi come H3K9me3 e H3K27me3 (Niu, DesMarais, Tong, Yao, & Costa, 2015).

La 8-oxoG potrebbe essere considerata una modifica epigenetica atipica, in quanto la sua presenza a livello di alcuni promotori può promuovere o reprimere la trascrizione di determinati geni. Il suo ruolo nell'espressione genica sembra essere indiretto, in quanto è il legame della DNA glicosilasi OGG1 e dell'enzima APE1, coinvolti nel riconoscimento e nella riparazione di questa lesione, a reclutare o respingere i fattori di trascrizione. Ad esempio, 8-oxoG al promotore del gene VEGF recluta OGG1 e APE1 che favoriscono il legame di TFs come HIF-1 α . Al contrario, ai promotori dei geni degli interferoni $\lambda 2/\lambda 3$ il legame di OGG1 promuove il reclutamento di complessi di repressione della trascrizione (Endutkin, Dvornikova, & Zharkov, 2025). Le sequenze PQSs (*potential quadruplex-forming sequences*) sono ricche di guanine e, quindi, naturali siti di ossidazione delle guanine. Le PQSs si trovano spesso a livello di promotori di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e accumulano alti livelli di 8-oxoG, i quali alterano la struttura dei G-quadruplex. In queste sequenze, OGG1 può legarsi promuovendo il reclutamento di TFs e il successivo intervento di APE1 può rimuovere la base lesionata, formando un sito AP, ma permettere ad APE1 di rimanere legato al DNA partecipando al richiamo di TFs (Fleming, Ding, & Burrows, 2017). Al contrario, come mostrato dai gruppi di Zhu et al. e Omega et al. se la 8-oxoG nei G-quadruplex non viene rimossa, la trascrizione dei geni viene repressa ai promotori di geni come NEIL3 e RAD17 (Omega, Fleming, & Burrows, 2018; J. Zhu, Fleming, & Burrows, 2018).

Lo stress ossidativo può causare altre tipologie di danno alla sequenza di DNA, tra le più pericolose vi sono i DSBs che possono portare a riarrangiamenti cromosomici se non riparati. Le cellule rispondono mettendo in atto meccanismi di difesa che possono portare ad una temporanea riorganizzazione della cromatina. Uno dei primi eventi che avviene a livello dei DSBs è la formazione di γ -H2AX; la fosforilazione della serina 139 di H2AX richiede l'attivazione della famiglia di proteine chinasi PIKK (*phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like*), ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM and Rad3-related*) o DNA-PKs (*DNA-dependent protein kinases*). Vista la rappresentanza di questa variante istonica nella cromatina si stima che questa modifica possa diffondersi su larghi domini (fino a 2 Mb) formando foci di danno che servono sia a segnalare di attivare la riparazione del danno al DNA sia a reclutare i checkpoint del ciclo cellulare sensibili al danno al DNA. Nonostante non sia ancora stato ben chiarito perché si formino questi domini su larga scala, un'ipotesi è che servano a mobilitare il DNA danneggiato attraverso il nucleoplasma. È interessante notare come i confini dei domini in larga scala di γ -H2AX coincidano spesso con i domini dei TADs, ed è stato suggerito che l'estrusione dei loop mediata dalla coesina sia fondamentale per la diffusione di γ -H2AX a partire dai DSBs (**Figura 12**) (Millan-Zambrano et al., 2022).

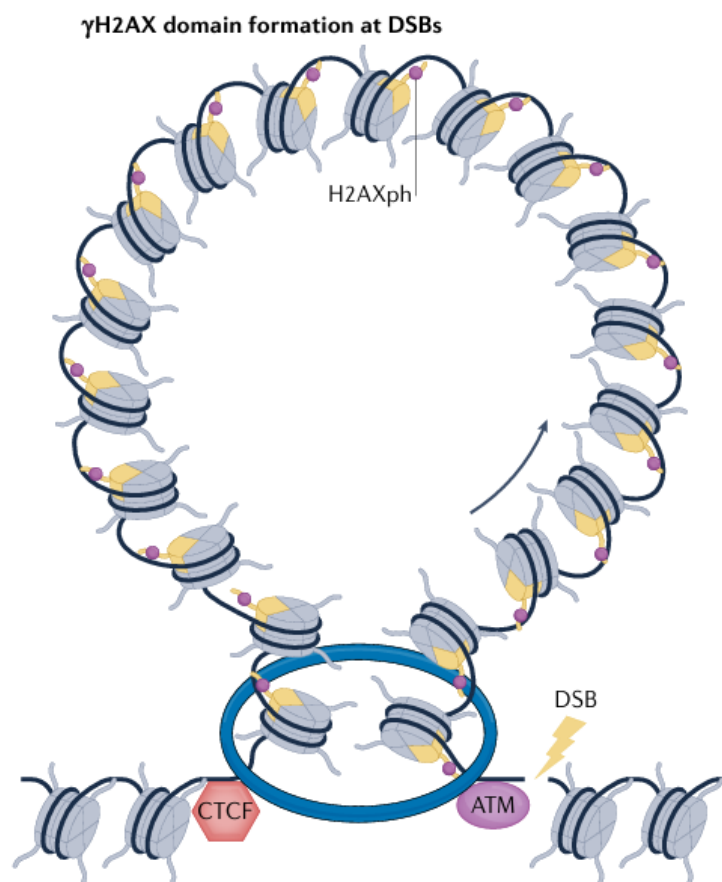


Figura 12. Formazione dei domini di γ -H2AX a seguito di DSBs. In accordo con il modello di formazione di larghi domini (fino a 2Mb) a seguito di DSBs, i nucleosomi che presentano H2AX

vengono fosforilati da una chinasi, come ATM, mentre passano attraverso il loop di cromatina estruso dal complesso CTCF-coesina (Millan-Zambrano et al., 2022).

L'interazione tra γ -H2AX e MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) è riconosciuto come il primo evento a livello dei DSBs per la segnalazione e la riparazione del DNA. In seguito, γ -H2AX promuove il reclutamento di proteine di segnalazione e riparazione del danno come 53BP1 (*TP53-binding protein 1*) e BRCA1 sul sito di DSB. La fosforilazione di H2AX, inoltre, determina la formazione del complesso MRN (MRE11-Rad50-NBS1) che gioca un ruolo cruciale nella risposta al danno e nel mantenimento dell'integrità cromosomica (Kopp, Khoury, & Audebert, 2019). In aggiunta, uno studio ha evidenziato che la variante istonica H2AX risulta avere un ruolo anche nelle ESCs murine dove viene depositata a livello dei promotori di rDNA, qui recluta complessi di rimodellamento nucleolare per reprimere la trascrizione dell'rDNA e limitare la proliferazione cellulare, indipendentemente dalla fosforilazione della serina 139 (Talbert & Henikoff, 2021).

I marcatori epigenetici dell'eterocromatina sono coinvolti, non solo nel silenziamento genico, ma anche nella scelta del pathway di riparazione del danno. Ad esempio H3K9me3, una PTM degli istoni, è stata riscontrata sia in regioni eterocromatiniche che eucromatiniche in cui si verificano DSBs e promuove la riparazione favorendo il pathway della ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR) che sfrutta sequenze omologhe per riparare il danno. Invece in *Drosophila melanogaster*, in regioni eterocromatiniche pericentromeriche, è stato osservato il reclutamento della lisina demetilasi KDM4A con conseguente riduzione di marcatori come H3K9me3 e H3K56me3, promuovendo la riparazione per mezzo del pathway non-homologous end-joining (NHEJ), che lega le estremità del DSB rischiando di introdurre errori come piccole delezioni o inserzioni (Caron, Pobega, & Polo, 2021). In diversi organismi come topi e *Drosophila melanogaster* è stata evidenziata la rilocalizzazione delle estremità di rottura alla periferia dei domini di eterocromatina per permettere il riconoscimento del sito di danno da parte delle proteine coinvolte nei pathway di riparazione (Hauer & Gasser, 2017; A. Janssen, Colmenares, & Karpen, 2018). In aggiunta, i siti di DSBs in regioni pericentriche, dopo essere stati spostati alla periferia del dominio eterocromatinico, sono soggetti ad un ancoraggio ai NPCs dipendente dalla SUMOilazione. Nei topi, questa rilocalizzazione dei DSBs è dipendente dalla resezione del DNA, seguita dal legame di Rad51/BRCA2 che impedisce la riparazione attraverso il pathway SSA (*single-strand annealing*) che è altamente deleterio (Hauer & Gasser, 2017). L'accumulo dei fattori di riparazione ai foci di danno è un evento che è stato

studiato per anni nei mammiferi, mentre lo spostamento dei DSBs per la riparazione è stato inizialmente descritto in lievito e, più recentemente, anche nei mammiferi, in particolare per i DSBs che avvengono in regioni eterocromatiniche (Hauer & Gasser, 2017). Ad esempio, nei mammiferi la riparazione dei DSBs nei domini eterocromatinici ad opera del NHEJ attiva la mobilità della cromatina mediata dai microtubuli che viene promossa da 53BP1 attraverso il complesso LINC (Caron et al., 2021). In organismi come lievito la mancanza della metiltransferasi di H3K4 o una mutazione in H3K4 compromette la riparazione dei DSBs attraverso il pathway NHEJ limitando il passaggio alla fase S del ciclo cellulare. Ai DSBs indotti in cellule di mammifero il reclutamento di questa metiltransferasi è dipendente dal complesso di rimodellamento della cromatina RSC; infatti, una deplezione di questo complesso intacca in modo significativo il reclutamento e la metilazione di H3K4 limitando la riparazione attraverso NHEJ. In letteratura è anche descritto che l'induzione di danni utilizzando sostanze come fleomicina o neocarzinostatina non incrementa i livelli globali di H3K4me3, ma determina solo un aumento locale di H3K4me3 ai siti di rottura, contribuendo alla segnalazione del danno al DNA (Mushtaq et al., 2021). La deposizione di H3K4me3 al sito di danno è dipendente dall'ubiquitinazione dell'istone H2B (McGinty, Kim, Chatterjee, Roeder, & Muir, 2008; R. Liu et al., 2023). Inoltre, H3K4me3 sembrerebbe importante per il reclutamento di ING1 (*inhibitor of growth 1*) per stimolare la riparazione del danno causato da raggi UV e promuovere l'apoptosi quando il danno è irreparabile. Tuttavia, è stato anche osservato, in cellule umane, che la modifica H3K4me3 può essere rimossa attraverso le demetilasi istoniche per promuovere il reclutamento del complesso ZMYND8-NuRD ai siti di danno per reprimere la trascrizione attorno ai DSBs, quando per la riparazione viene scelto il pathway HR (Wei et al., 2018; Mushtaq et al., 2021).

I DSBs che cadono in regioni eucromatiniche, contenenti geni attivamente trascritti, provocano la deposizione di modifiche epigenetiche repressive della trascrizione, generando una eterocromatinizzazione transiente del sito danneggiato. I marcatori di eterocromatina giocano un ruolo chiave, ad esempio, Kakarougkas et. al hanno evidenziato come la monoubiquitinazione della lisina 119 dell'istone H2A (H2AK119ub) è indotta nelle vicinanze dei DSBs governando lo spegnimento della trascrizione (Kakarougkas et al., 2014). La deposizione di H2AK119ub è dipendente dall'attività della chinasi ATM che determina anche l'estensione della condensazione cromatinica. La fosforilazione ATM-dipendente di ENL, un fattore di trascrizione che controlla la fase di allungamento dell'RNA ad opera della RNAPII, permette la sua conversione da fattore stimolante a inibitore tramite il reclutamento di PRC1, e questo è fondamentale sia per l'inserimento della modifica H2AK119ub che per mantenere lo stato repressivo della cromatina (Lu, Yang, & Zhou,

2023). Inoltre, è interessante che la rimozione di H2AK119ub coinvolga la deubiquitinasi peptidasi 16 ubiquitina-specifica (USP16), che è cruciale per la ripresa dell'attività trascrizionale dopo la riparazione dei DSBs. In aggiunta, il silenziamento genico locale è garantito anche dal marcatore H3K27me3, depositato dall'asse PARP1-EZH2. Tuttavia, come questa marcatura sia rimossa dai siti di danno una volta avvenuta la riparazione non è ancora stato chiarito (Abu-Zhayia, Awwad, Ben-Oz, Khoury-Haddad, & Ayoub, 2018). PARP1 è coinvolto, anche, nel reclutamento di proteine chinasi per trasdurre il segnale di risposta al danno; ad esempio, recluta la chinasi DYRK1B che fosforila la metiltransferasi G9a per la deposizione della modifica H3K9me2, fondamentale per promuovere la formazione di un ambiente repressivo della trascrizione e reclutare complessi co-repressori come le HDACs (Khurana et al., 2014; Lu et al., 2023).

II. SCOPO DEL LAVORO

Le modifiche nell'organizzazione della cromatina svolgono un ruolo determinante nella regolazione dell'espressione genica. Parallelamente, la fedeltà dei processi di trascrizione e di maturazione degli RNA risulta fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a fattori di stress. Quindi, una caratterizzazione dell'organizzazione della cromatina e della sua dinamica di risposta a fattori di stress endogeni o esogeni risulta fondamentale per chiarire i meccanismi molecolari alla base di numerose patologie.

Su queste premesse, il seguente lavoro di Tesi è stato finalizzato all'analisi della risposta cellulare, in particolare ai cambiamenti nell'architettura cromatinica, ai cambiamenti del profilo epigenetico e dell'attività trascrizionale, che vengono provocati dallo stress ossidativo indotto da bromato di potassio (KBrO_3) in un modello cellulare *in vitro* di epatociti murini.

A tale scopo sono state utilizzate diverse tecniche di imaging di biologia cellulare, tra cui microscopia elettronica a trasmissione (TEM), microscopia a fluorescenza e live-cell imaging.

III. MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTO

Per questo progetto sono state utilizzate cellule epatiche murine AML-12 (ATCC® CRL-2254). Tali cellule sono state coltivate in terreno di coltura Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 1% di penicillina/streptomicina, 1% di desametasone e 0,001% di insulina/transferrina/selenio a 37 °C in atmosfera umidificata (95% aria/5% CO₂). Le cellule sono state coltivate in flask da 75 cm² e, una volta raggiunto circa il 70% della confluenza, sono state staccate tramite tripsina 0.25% in PBS contenente 0.05% EDTA, divise in un numero di flask o multi-well adeguato all'esperimento d'interesse e lasciate a riposo per 48 ore.

Come da protocollo definito in precedenti analisi, il trattamento è avvenuto utilizzando una concentrazione di KBrO₃ di 10 mM disciolto in terreno per 1 ora; il controllo è stato effettuato utilizzando esclusivamente terreno fresco. Al termine dell'ora, le cellule utilizzate per la condizione recovery sono state incubate nuovamente con terreno fresco per 1 ora. Per le analisi che hanno previsto l'incorporazione di bromouridina (BrU), le cellule sono state incubate per 30 minuti in BrU 1 mM disciolta in terreno di coltura.

2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

L'analisi è stata svolta sulle tre condizioni precedentemente descritte: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery di 1 ora post-trattamento. I campioni sono stati fissati con paraformaldeide al 4% in terreno di coltura per 2 ore, di cui 30 minuti a temperatura ambiente e 1 ora e 30 minuti a 4 °C. Come fissativo è stata utilizzata la paraformaldeide, in quanto permette una buona fissazione delle proteine senza alterare eccessivamente l'immunoreattività dei campioni per le analisi TEM. A seguito della fissazione sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti in PBS 1X, al termine dei lavaggi i campioni sono stati pre-inclusi in agarosio al 2%. Successivamente, le cellule sono state incubate in cloruro di ammonio (NH₄Cl) 0.5 M per 30 minuti a temperatura ambiente, in quanto la paraformaldeide presenta un gruppo aldeidico e l'utilizzo di NH₄Cl permette di legare i gruppi aldeidici liberi ed evitare interazioni aspecifiche con gli anticorpi. Infine, i campioni sono stati disidratati mediante scala ascendente di etanolo e inclusi in resina acrilica (LR White). Tramite sezionamento all'ultramicrotomo, dalle inclusioni sono state ricavate delle sezioni ultrasottili (60-80 nm) poi raccolte o su reti di nichel (per immunocitochimica) o su reti d'oro

(per ammina d'osmio). I campioni sono stati osservati con microscopio elettronico a trasmissione JEM 1200 EX II operante a 100 kV e dotato di telecamera CCD MegaView G2.

3. IMMUNOCITOCHIMICA PER MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE: IMMUNOGOLD

L'immunocitochimica è una tecnica che prevede l'utilizzo di anticorpi per la rilevazione di antigeni di interesse. Questa tecnica può essere realizzata con due metodi, quello diretto o quello indiretto: il metodo diretto prevede l'utilizzo di un anticorpo primario legante direttamente l'antigene di interesse e coniugato ad un marcatore, mentre il metodo indiretto prevede l'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato ad un marcatore e che si lega alla regione Fc dell'anticorpo primario dopo il suo legame con l'antigene. Per questi esperimenti è stato utilizzato il metodo indiretto, il quale, per la microscopia elettronica, prevede l'utilizzo di anticorpi secondari coniugati con grani di oro colloidale (immunogold labelling). Per prima cosa, le reti per le analisi di immunocitochimica sono state posizionate su una goccia di Normal Goat Serum (NGS) e, successivamente, incubate su una goccia di anticorpi primari a 4 °C overnight. A seguito di lavaggi in PBS 1X/Tween20 0.04% e PBS 1X, i campioni sono stati incubati con NGS e, dopo, sono stati incubati su una goccia di anticorpi secondari coniugati con grani di oro colloidale diluiti 1:20 in PBS 1X per 30 minuti. Terminata l'incubazione con gli anticorpi secondari sono stati eseguiti lavaggi in PBS 1X e acqua distillata (dH₂O). Gli anticorpi utilizzati, antigeni e diluizioni, insieme alle diluizioni e tempistiche dell'NGS sono riportate nella tabella sottostante.

Anticorpo primario	Anticorpo secondario	Antigene	NGS	Diluizione
Anti- γ H2AX (mouse)	Anti-mouse 6 nm (Goat)	γ -H2AX	1:200 in PBS 1x x 2'	1:10 in PBS/BSA/TWEEN
Anti-hnRNP A/B (mouse)	Anti-mouse 6 nm (Goat)	hnRNP A/B	1:100 in PBS 1x x 3'	1:20 in PBS/BSA/TWEEN
Anti-5hmC (mouse)	Anti-mouse 6 nm (Goat)	5hmC	1:200 in PBS 1x x 2'	1:150 in PBS/BSA/TWEEN
Anti-5mC (rabbit)	Anti-rabbit 12 nm (Goat)	5mC	1:200 in PBS 1x x 2'	1:500 in PBS/BSA/TWEEN
Anti-H3K4me3 (rabbit)	Anti-rabbit 12 nm (Goat)	H3K4me3	1:200 in PBS 1x x 2'	1:50 in PBS/BSA/TWEEN
Anti-DNMT3A (rabbit)	Anti-rabbit 12 nm (Goat)	DNMT3A	1:100 in PBS 1x x 3'	1:20 in PBS/BSA/TWEEN

4. TECNICHE DI STAINING PER LA MICROSCOPIA ELETTRONICA

Le tecniche di staining permettono di aumentare il contrasto delle strutture cellulari grazie all'alto peso atomico dei metalli pesanti che, generalmente, vengono utilizzati per la contrastazione. Questi metalli a causa della loro elettrondensità permettono di deviare il fascio di elettroni formando le regioni più scure dell'immagine. In questo progetto sono state utilizzate due diverse tecniche di staining sulla base delle analisi da eseguire.

4.1 EDTA REGRESSIVE TECHNIQUE

A seguito delle reazioni di immunocitochimica, i campioni sono stati contrastati con la EDTA regressive technique (Bernhard, 1969) che permette di contrastare le ribonucleoproteine decolorando la cromatina, questo permette la visualizzazione "negativa" del nucleo cellulare, in cui la cromatina risulta sbiancata, favorendo l'analisi della distribuzione dei marcatori nei diversi stati della cromatina stessa.

Inizialmente, è stata eseguita l'incubazione dei campioni in acetato di uranile per 10 minuti, seguita dall'incubazione in EDTA per 15 secondi. L'EDTA è un agente chelante che rimuove l'acetato di uranile, con una preferenza per l'uranile legato alla cromatina piuttosto che per quello legato all'RNA, rendendo la tempistica di incubazione critica per ottenere un contrasto ottimale. Infine, è stata svolta un'incubazione dei campioni in citrato di piombo per 2 minuti. A seguito di ogni incubazione sono stati svolti lavaggi in dH₂O.

4.2 AMMINA D'OSMIO

Lo staining con ammina d'osmio (*osmium ammine*, OA) permette di evidenziare unicamente il DNA, rendendolo l'unico elemento elettrondenso del campione. L'assenza di contrasto di altre strutture nucleari permette una precisa analisi sulla cromatina, facilitando nel distinguere la cromatina fortemente condensata dalla cromatina poco compattata.

Il procedimento prevede un primo step di idrolisi acida con HCl 5N per 30 minuti a temperatura ambiente, seguita da un'incubazione di 1 ora con ammina d'osmio. Dopo ogni incubazione sono stati eseguiti lavaggi per rimuovere ogni residuo di acido o eccesso di reagente.

5. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E IMMUNOCITOCHIMICA PER MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Sono state svolte reazioni di immunofluorescenza volte a marcare BrU, un analogo dell'uridina e quindi incorporata nell'RNA nascente, per investigare possibili alterazioni dei livelli trascrizionali. Per l'analisi di immunofluorescenza le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto e lasciate attaccare per almeno 24 ore e trattate come precedentemente descritto. Al termine del tempo di trattamento o recovery, le cellule sono state fissate in formalina al 4% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente per poi essere post-fissate in etanolo 70% a -20 °C per almeno 24 ore. Per l'analisi della BrU, le cellule sono state incubate in PBS ed in PBS/BSA 3%/TWEEN 0,04% e, successivamente, in anticorpo primario anti-BrU (GTX636326, Genetex, Irvine, California, Stati Uniti) diluito 1:1500 in PBS/BSA 1%/TWEEN 0,04% per 1 ora a temperatura ambiente.

A seguito dell'incubazione in anticorpo primario, i campioni sono stati soggetti a lavaggi in PBS e successivamente incubati con anticorpo secondario (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary antibody DyLight™ 594, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) diluito 1:200 in PBS/BSA 1%. Infine, i campioni sono stati controcolorati con Hoechst 33258 e montati utilizzando Mowiol. L'osservazione è stata condotta utilizzando un microscopio Olympus BX51 Microscope (Evident Europe GmbH, Hamburg, Germany) equipaggiato con una camera Olympus MagnaFire e software Olympus Cell F (versione 3.1).

6. LIVE-CELL IMAGING

Per l'analisi di live-cell imaging, le cellule sono state seminate in petri dish con fondo di vetro e sono state lasciate attaccare per almeno 24 ore. Successivamente sono state colorate con Spy505-DNA (Spy505-DNA Spirochrome, Stein am Rhein, Switzerland) 1:1000 diluito in terreno e incubate per 2 ore a 37 °C in atmosfera umidificata (95% aria/5% CO₂). Lo Spy505-DNA è un colorante non tossico per le cellule capace di legare il solco minore del DNA e di emettere nello spettro del verde. L'osservazione è stata condotta tramite un microscopio confocale Leica TCS SP8, mantenendo temperatura controllata e atmosfera umidificata per tutta la durata dell'osservazione. L'imaging è stato effettuato comprendendo un periodo iniziale di almeno 30 minuti pre-trattamento, 1 ora di trattamento con KBrO₃ 10 mM e un periodo di recovery di almeno 2 ore. Sono stati acquisiti almeno 10 campi, con z-stack di 7 piani a 1.5 µm di distanza e frame ogni 5 minuti.

7. ANALISI STATISTICHE E PROCESSAMENTO DATI

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando Graphpad Prism. L'analisi tra i gruppi sperimentali è stata effettuata tramite ANOVA ad una via con test *post hoc* di Tukey, considerando significativi valori di p-value minori di 0.05.

Gli antigeni di interesse negli esperimenti di immunogold labelling sono stati rilevati attraverso il conteggio dei grani di oro colloidale da almeno due operatori indipendenti. Sono state selezionate cellule con caratteristiche simili in termini di dimensione, estensione dell'involucro nucleare e rapporto eucromatina/eterocromatina all'interno delle medesime condizioni sperimentali, per escludere potenziali differenze puramente tecniche. Per uniformare il dato con l'effettiva dimensione del nucleoplasma, i valori sono stati indicati in relazione all'estensione del nucleo in sezione analizzato (n° grani d'oro/ μm^2).

L'analisi sulla condensazione della cromatina nelle tre condizioni sperimentali, svolta tramite OA, è stata effettuata attraverso un metodo stereologico usando Fiji (v2.16.0/1.54p). Le immagini TEM sono state processate con un filtro "Gaussian blur" di raggio 1, e l'estensione dell'eterocromatina è stata calcolata con thresholding usando l'algoritmo "Triangle". Sono stati almeno analizzati 15 nuclei con area e dimensioni comparabili per ogni condizione.

Per tutte le analisi in fluorescenza di BrU, i campi sono stati acquisiti con esposizione costante, al fine di garantire quantificazioni di densità ottica coerenti tra le diverse condizioni sperimentali e le corrispondenti quantificazioni sono state effettuate utilizzando Fiji.

IV. RISULTATI

1. IL TRATTAMENTO CON KBrO_3 INDUCE $\gamma\text{-H2AX}$ OLTRE A 8-oxoG

Il trattamento con il KBrO_3 genera come danno primario la formazione di 8-oxoG, tuttavia, induce anche altre forme di danno come i DSBs. $\gamma\text{-H2AX}$ è un marcatore di DSBs, oltre ad essere un indicatore di stress replicativo. L'analisi mediante immunogold labelling ha evidenziato un aumento significativo di questo segnale di danno nelle cellule trattate con KBrO_3 10 mM, e una loro diminuzione nella successiva ora di recovery (**Figura 13**).

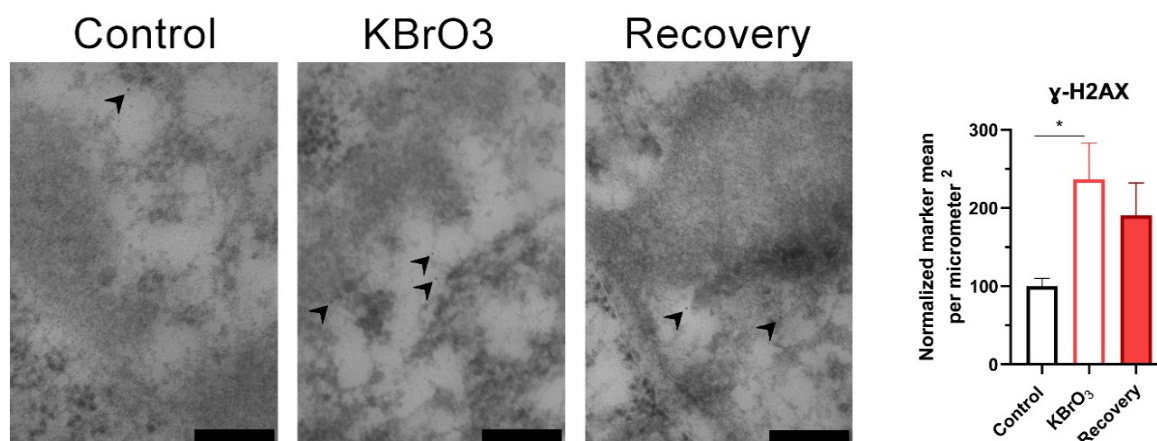


Figura 13. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro ($\gamma\text{-H2A.X}$), indicati dalla punta di freccia. Barra 200 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di $\gamma\text{-H2A.X}$ per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO_3 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati. *: $p < 0.05$.

2. IL TRATTAMENTO CON KBrO_3 ALTERA LO STATO DELLA CROMATINA

Inizialmente, è stata valutata la distribuzione della cromatina nelle cellule sottoposte a trattamento con KBrO_3 . Per fare ciò è stata svolta una reazione con ammina d'osmio (OA) (**Figura 14**). È stata dunque effettuata un'idrolisi acida e, successivamente una colorazione con OA, che, contrastando selettivamente il DNA, permette di distinguere la cromatina, la quale appare fortemente contrastata su sfondo chiaro. L'analisi ha mostrato un aumento significativo dell'eterocromatina (rappresentata dalle regioni più scure) nel nucleo delle cellule trattate con KBrO_3 10 mM (**Figura 14c**). Oltre all'aumento della cromatina condensata, l'analisi ha evidenziato un aumentato numero di clusters di eterocromatina

(clumps) causato dal trattamento (**Figura 14d**), senza variazione nella loro estensione nucleoplasmatica (**Figura 14e**).

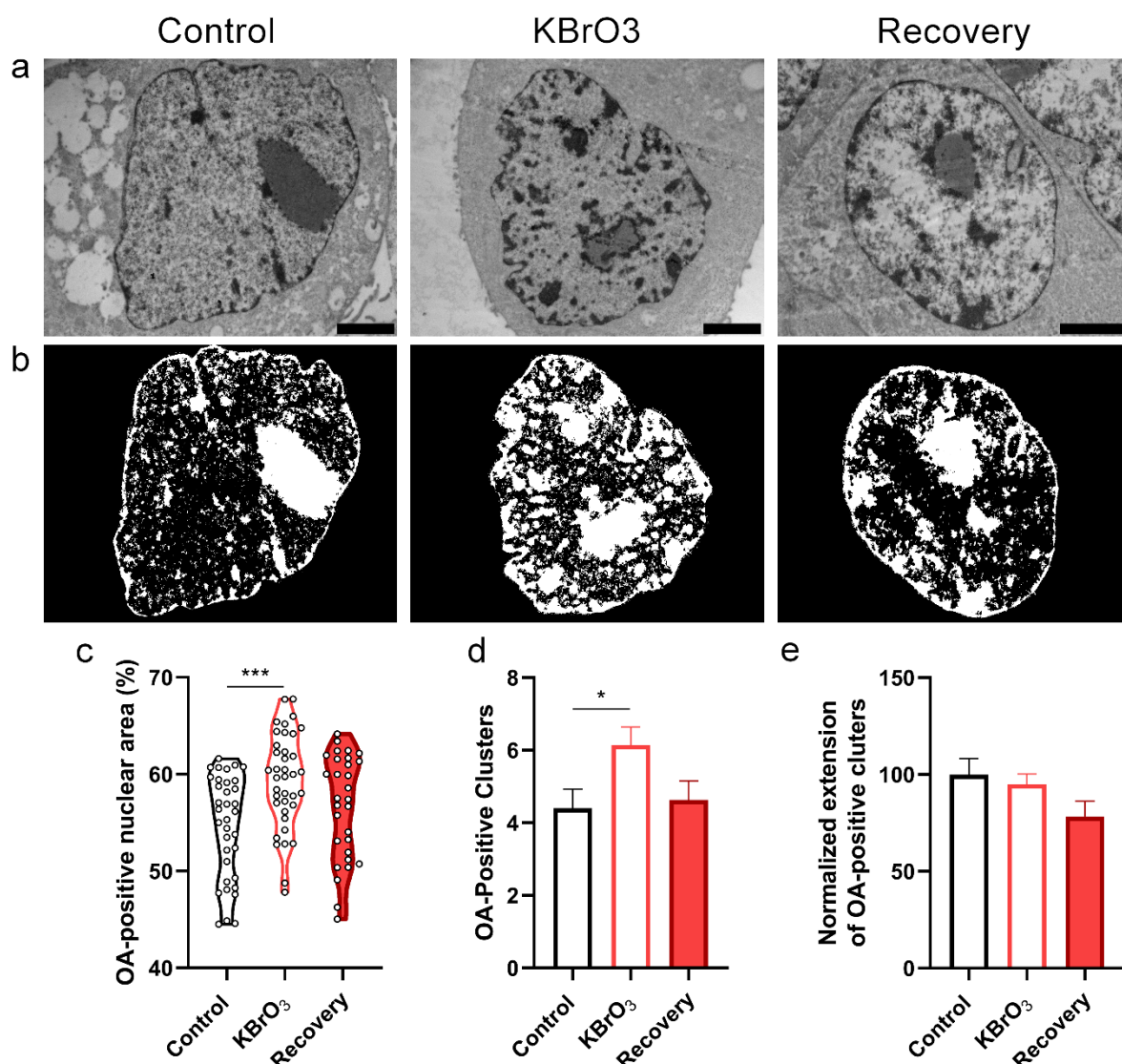


Figura 14. *Distribuzione eterocromatina.* a) Immagini rappresentative al TEM dei nuclei di cellule AML-12 nelle condizioni: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery; contrastate con OA. Le regioni più scure rappresentano l'eterocromatina. Barra 2 μm. b) Segmentazione delle immagini in a) per le successive quantificazioni. c) Il grafico a violino mostra la percentuale di area occupata dalla eterocromatina nelle tre condizioni considerate. I punti mostrano la distribuzione dei valori osservati. ***:p < 0.001. d) L'istogramma mostra la media ± SEM del numero di cluster di eterocromatina nelle diverse condizioni analizzate. *:p < 0.05. e) L'istogramma mostra la media ± SEM dell'estensione dei cluster di eterocromatina nelle condizioni considerate.

3. RIDUZIONE DI MARCATORI EPIGENETICI ISTRUTTIVI PER L'ESPRESSIONE GENICA

La 5hmC è una modifica epigenetica del DNA, intermedio nel passaggio da 5mC a citosina non modificata. La sua presenza è correlata ad una minore compattazione della cromatina e all'aumento di accessibilità della cromatina al macchinario della trascrizione, rappresentando un marcatore epigenetico positivo per la decondensazione della cromatina. L'analisi mediante immunogold labelling ha evidenziato una localizzazione a livello della regione pericromatinica, coerente con la sua funzione, e significativa riduzione di questo marcatore in seguito al trattamento con KBrO₃ 10 mM e un ulteriore calo nella condizione di recovery (Figura 15).

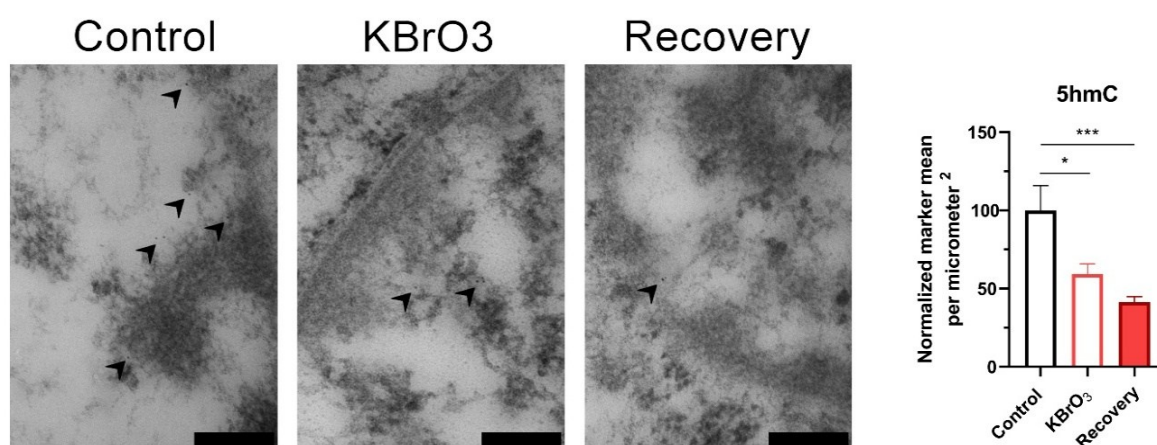


Figura 15. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro (5hmC), indicati dalla punta di freccia. Barra 200 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di 5hmC per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati.

*: $p < 0.05$. ***: $p < 0.001$

Gli istoni sono sottoposti a modifiche epigenetiche post-traduzionali; tra queste, H3K4me3 è localizzata prevalentemente a livello delle regioni regolatorie dei geni e la sua presenza è associata ad uno stato di trascrizione attiva. Mediante un'analisi di immunogold labelling, è stata riscontrata una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di H3K4me3 nelle cellule trattate con KBrO₃ 10 mM. Nella successiva ora di recovery i livelli di questo marcatore hanno mostrato un lieve incremento, mantenendosi comunque inferiori rispetto alla condizione di controllo iniziale (Figura 16). Anche in questo caso, il marker localizza nella regione pericromatinica, coerentemente con la funzione istruttiva per la trascrizione.

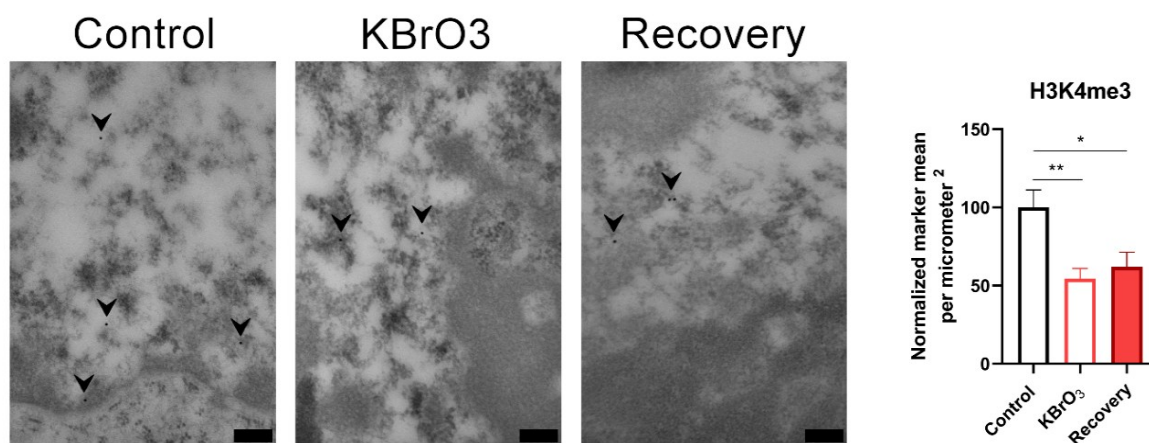


Figura 16. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro (H3K4me3), indicati dalla punta di freccia. Barra 500 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di H3K4me3 per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati.

*:p < 0.05. **:p < 0.01

4. IL TRATTAMENTO CON KBrO₃ ALTERA LA TRASCRIZIONE E IL PROCESSAMENTO DEGLI RNA

Per valutare se il trattamento con KBrO₃ 10 mM alterasse la trascrizione nelle cellule AML-12, è stato effettuato un esperimento di pulse-chase con BrU, analogo dell'uridina, e per questo incorporato nell'RNA nascente. L'analisi ha evidenziato una riduzione significativa del segnale fluorescente della BrU nelle cellule trattate rispetto al controllo, mentre nell'ora successiva di recovery i livelli di BrU sono tornati ad aumentare (**Figura 17**).

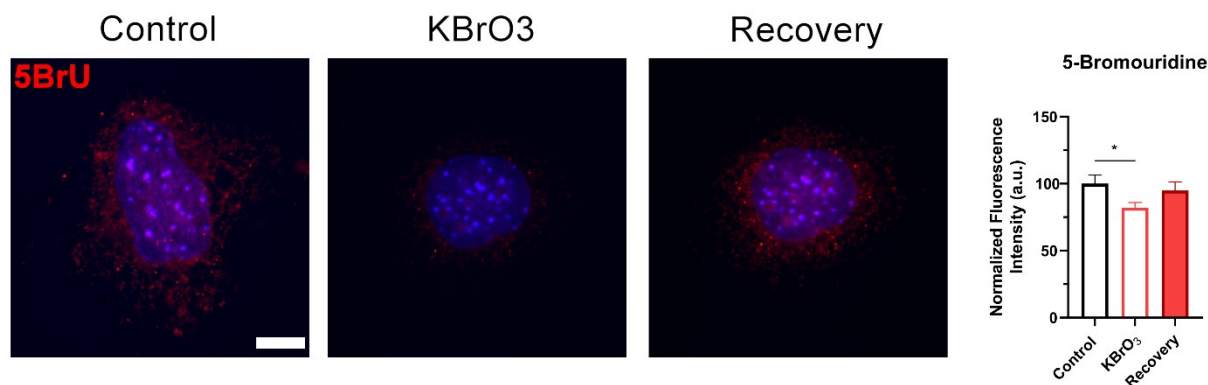


Figura 17. Le immagini rappresentative, in microscopia a fluorescenza, per le diverse condizioni sperimentali, evidenziano una diminuzione nella densità ottica della BrU (in rosso) a seguito dell'ora di trattamento con KBrO₃ 10 mM. Il nucleo delle cellule AML-12 è stato controcolorato con Hoechst

33258 (in blu). Barra 10 μm . L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM dell'intensità di fluorescenza di BrU per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO_3 10 mM e recovery.

*: $p < 0.05$.

A seguito dell'esperimento di pulse-chase con BrU, è stata analizzata l'eventuale alterazione di fattori coinvolti nel processamento degli RNA. Per fare ciò, è stata condotta un'analisi sulla densità delle hnRNPs A/B, coinvolte nella maturazione degli RNA attraverso il processo di splicing alternativo, nel loro trasporto verso citoplasma e nella traduzione in proteine. È stato svolto un esperimento di immunogold labelling, al fine di valutare solo la frazione nucleare, che ha evidenziato un calo nei livelli delle hnRNPs A/B nelle cellule trattate con KBrO_3 10 mM, persistente anche durante la successiva fase di recovery (**Figura 18**).

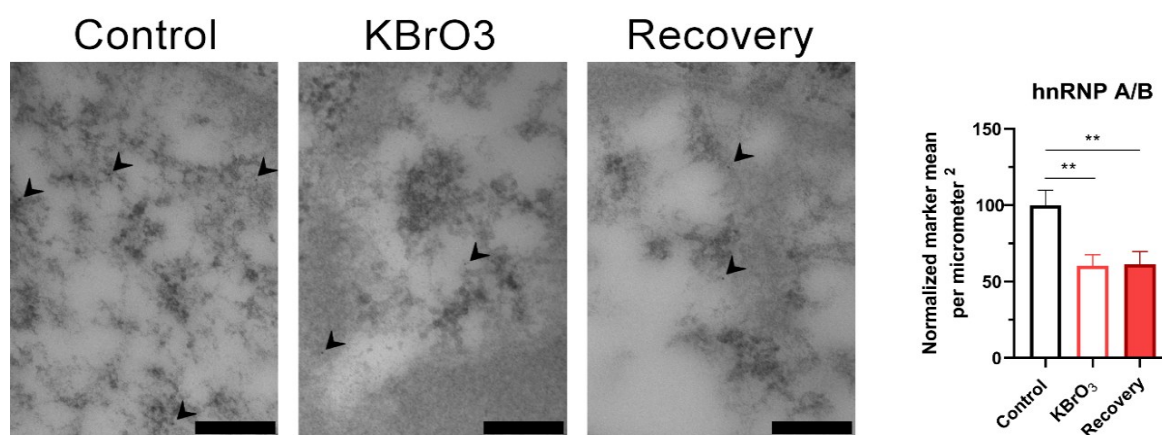


Figura 18. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro (hnRNP A/B), indicati dalla punta di freccia. Barra 200 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di hnRNP A/B per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO_3 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati. **: $p < 0.01$

5. RIDUZIONE NEI LIVELLI DI METILAZIONE NELLA FORMA DELLA 5mC

La DNMT3A è coinvolta nella metilazione *de novo* e di mantenimento del DNA, formando 5mC. Attraverso immunogold labelling è stata valutata la sua localizzazione, nuovamente presso la regione pericromatinica, ed il marcaggio che, a seguito del trattamento con KBrO_3 10 mM, riporta una riduzione statisticamente significativa. Inoltre, questi valori non vengono ripristinati durante la successiva ora di recovery, ma risultano equiparabili alla condizione di trattamento (**Figura 19**).

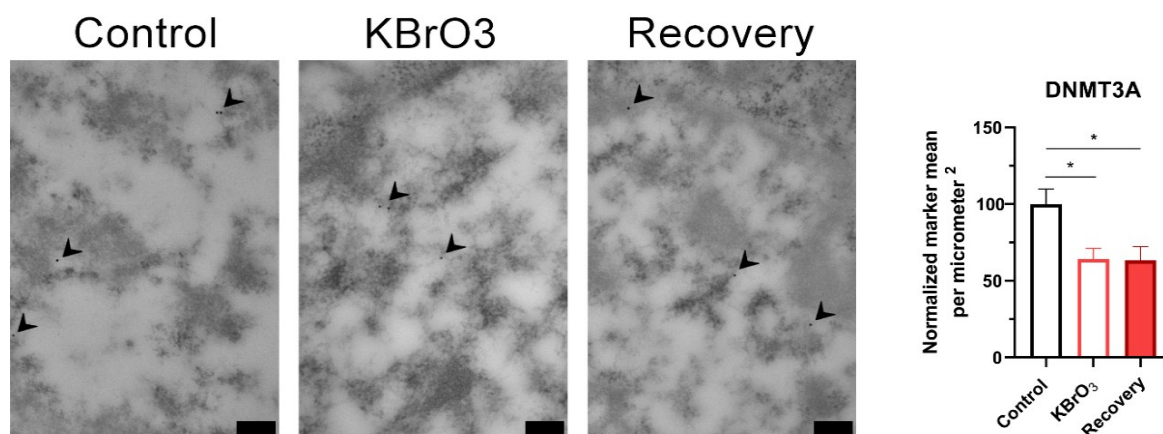


Figura 19. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro (DNMT3A), indicati dalla punta di freccia. Barra 500 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di DNMT3A per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati. *:p < 0.05.

La 5mC è tipicamente una marcatura epigenetica del DNA che induce il silenziamento dei geni, tuttavia può essere depositata anche sulle citosine dei trascritti di RNA. L'analisi mediante immunogold labelling riporta, coerentemente, un marcaggio prevalente a livello dell'eterocromatina, riconoscibile grazie alla tecnica regressiva dell'EDTA, e rivela una diminuzione della presenza di questo marcatore nel nucleo delle cellule trattate con KBrO₃ 10 mM, senza ripristino nei livelli pre-stress durante la successiva ora di recovery (**Figura 20**).

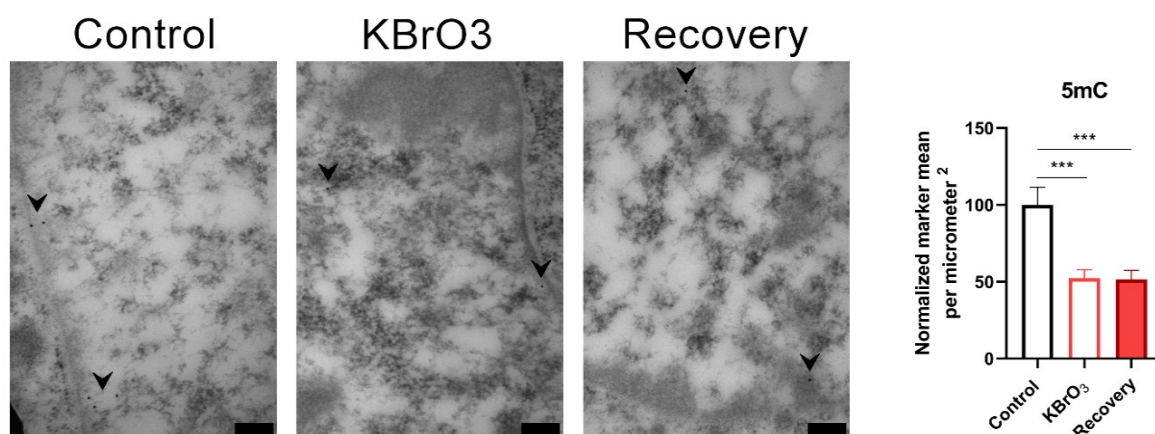


Figura 20. Micrografie elettroniche delle cellule AML-12 nelle tre condizioni sperimentali. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani d'oro (5mC), indicati dalla punta di freccia. Barra 500 nm. L'istogramma, sulla destra, mostra la media $\pm$ SEM della densità di 5mC per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO₃ 10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati. ***:p < 0.001

6. ANALISI DEI CLUMPS DI ETEROCROMATINA

A seguito del trattamento con KBrO_3 10 mM, nei nuclei delle cellule AML-12 vengono a formarsi nuovi clumps di eterocromatina, come riportato dalle analisi ultrastrutturali. È stato, quindi, interessante verificare se i clumps fossero arricchiti per alcuni dei marcatori precedentemente analizzati. È risultato che i clumps sono arricchiti per i marcatori $\gamma\text{-H2AX}$ e H3K4me3 , nonostante il calo generalizzato di questo marcatore che, dunque, risulta mantenuto quasi esclusivamente nei pressi di questi cluster di eterocromatina. Nel dettaglio, $\gamma\text{-H2AX}$ e H3K4me3 aumentano esclusivamente durante la fase di trattamento con KBrO_3 10 mM, in modo particolare alla periferia dei clumps (Figura 21).

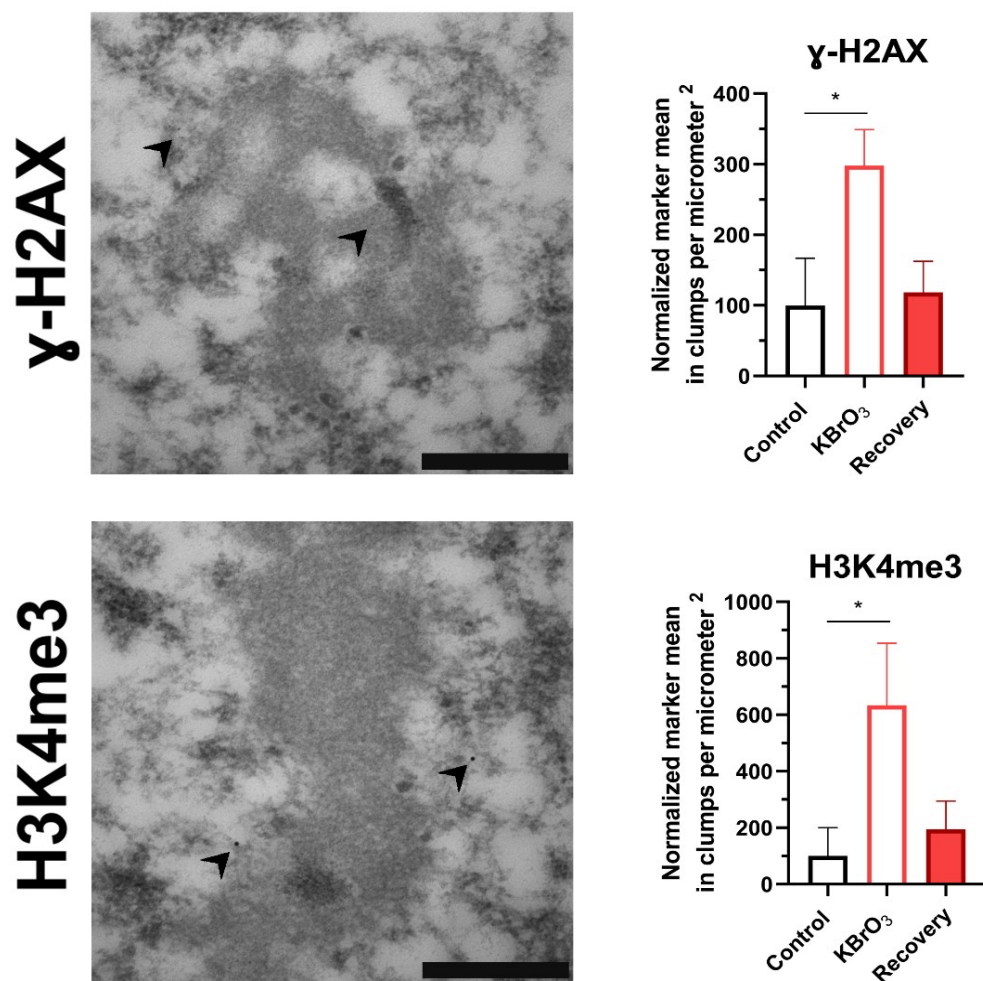


Figura 21. Micrografie elettroniche rappresentanti clumps di cromatina condensata nei nuclei di cellule AML-12 nella condizione di trattamento con KBrO_3 10 mM. Le immagini sono state processate per evidenziare la presenza dei grani di oro, indicati con la punta di freccia. Barra 500 nm. A fianco delle immagini rappresentative, sulla destra, i rispettivi istogrammi rappresentanti la media $\pm$ SEM della densità dei marcatori nei clumps per le condizioni: controllo, trattamento con KBrO_3

10 mM e recovery. La significatività statistica è stata valutata attraverso un t-test per dati non appaiati. *:p < 0.05

Successivamente, è stata effettuata un'analisi di live-cell imaging per confermare, anche tramite timelapse, la formazione di nuovi clumps dopo il trattamento con KBrO₃ 10 mM e studiare eventuali variazioni dinamiche del loro posizionamento nelle diverse condizioni sperimentali. Per questa analisi, sono state considerate come cellule di controllo le catture effettuate nei 30 minuti pre-trattamento, e a seguito dell'ora di trattamento con KBrO₃ 10 mM è stato considerato un tempo di recovery di 1 ora. In parallelo, è stato effettuato un esperimento di controllo conducendo la stessa analisi, ma effettuando cambiamenti di terreno in assenza di KBrO₃ 10mM, così da poter misurare e riportare eventuali diminuzioni significative nell'intensità di fluorescenza dovute a fenomeni di fading o photobleaching durante l'acquisizione.

Le immagini in **Figura 22a** mostrano la stessa cellula acquisita a 5 minuti dall'inizio dell'esperimento (a sinistra), quindi nella fase pre-trattamento, e a 100 minuti (a destra), nella fase di trattamento. Le frecce bianche indicano i clumps di cromatina condensata che si formano durante la fase di trattamento e la linea viola ne attraversa due. La **Figura 22b** rappresenta il grafico dell'intensità di fluorescenza lungo la linea viola nell'immagine della **Figura 22a**; i due picchi rappresentano i clumps che sono nettamente distinguibili dal resto della cromatina.

Il grafico a punti e la heatmap nella **Figura 22c** mostrano, infine, il cambiamento nella distanza media dei clumps dall'involucro nucleare a seguito del trattamento. L'analisi sulla distanza dei clumps ha evidenziato un progressivo avvicinamento al NE. In particolare, nel controllo la maggior frequenza è registrata ad una distanza nell'intervallo 3-4 µm, e nessun clumps posizionato ad una distanza inferiore ad 1 µm. A seguito del trattamento, invece, la distanza più frequente è riscontrata nell'intervallo 1-2 µm, così come durante il recovery.

I dati sono congruenti con le osservazioni svolte in ultrastruttura.

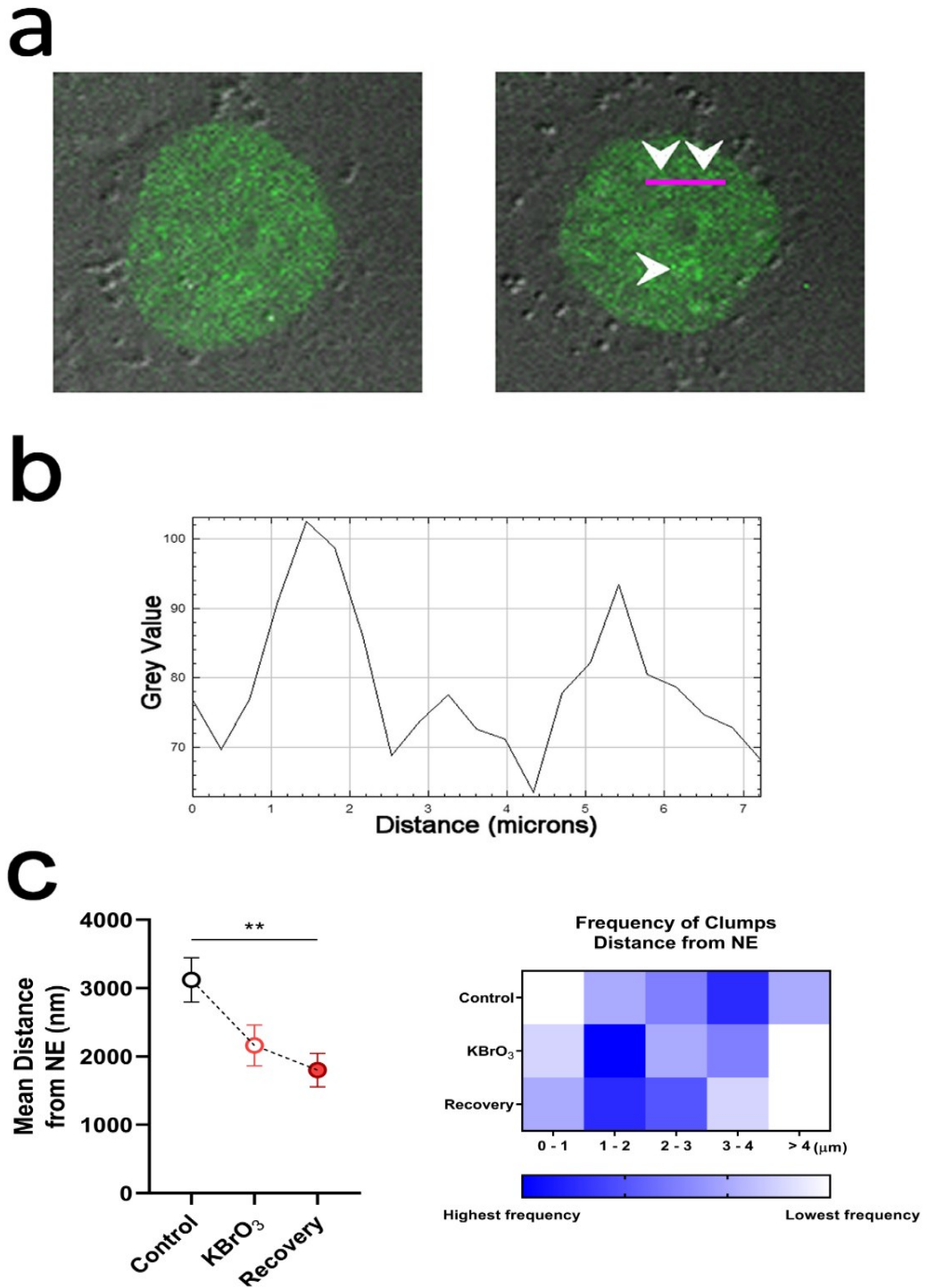


Figura 22. a) Immagini rappresentative del live-cell imaging mostranti la stessa cellula acquisita a 5 minuti (a sinistra) e a 100 minuti (a destra). Le frecce bianche indicano i clumps di eterocromatina appena formati. La linea viola attraversa due clumps ed è importante per l'analisi al punto b). b) Il grafico riporta il profilo di intensità di fluorescenza lungo la linea viola, presentando sull'asse delle ascisse la distanza (lungo la linea viola) e sull'asse delle ordinate l'intensità del segnale fluorescente. c) A sinistra, il grafico a punti mostra la distanza media $\pm$ SEM dei cluster di eterocromatina dal NE nelle diverse condizioni sperimentali durante l'esperimento di live-cell imaging. **: $p < 0.01$. A destra, la heatmap mostra la frequenza con cui i clumps sono posizionati in un certo intervallo di

distanza dal NE nelle diverse condizioni sperimentali nell'esperimento di live-cell imaging. Sulle righe sono indicate le tre condizioni: controllo, trattamento con KBrO_3 10 mM e recovery. Sulle colonne sono indicati i cinque intervalli di distanza espressi in micrometri (μm): 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, > 4. L'intensità di blu rappresenta la frequenza, in particolare bianco o azzurro chiaro riflettono la frequenza minore, mentre il blu intenso la frequenza maggiore.

V. DISCUSSIONE

Nelle cellule, l'integrità del genoma viene minacciata costantemente da diversi fattori, sia esogeni che endogeni. Lo stress ossidativo provoca una moltitudine di danni, colpendo severamente la vitalità cellulare, la fedeltà delle informazioni genetiche ereditate e l'espressione genica, potendo potenzialmente contribuire allo sviluppo di varie patologie (Casali, Siciliani, Galgano, & Biggiogera, 2022). KBrO_3 è un agente ossidante, che da un punto di vista molecolare è in grado di generare come danno primario l'ossidazione delle guanine a 8-oxoG, e in quantità minore altri danni come SSBs, DSBs e generazione di siti AP. Nelle corrette condizioni sperimentali è una sostanza ideale per studiare gli effetti dello stress ossidativo limitatamente all'ambiente nucleare (Spasova et al., 2015). Ancora oggi l'ampio utilizzo di KBrO_3 come additivo alimentare in diversi Paesi nel mondo, il suo utilizzo nell'industria cosmetica e farmaceutica, e la sua produzione come sottoprodotto nella disinfezione delle acque rendono particolarmente interessante lo studio degli effetti di questa sostanza ossidante (Al-Mareed et al., 2022), in particolare negli epatociti, fondamentali per la detossificazione dell'organismo (Berasain et al., 2023).

Per questo studio sono state utilizzate cellule epatiche murine AML-12 (alpha mouse liver 12), in considerazione di più motivi: gli epatociti presentano un alto livello trascrizionale rendendoli un modello ideale per lo studio dell'alterazione dell'espressione genica; gli epatociti presentano elevati livelli di glutathione, fondamentale per lo sviluppo di queste cellule, e che rappresenta un intermedio nel processo di ossidazione delle guanine a 8-oxoG tramite KBrO_3 ; le cellule AML-12 sono considerate un gold standard come modello di studio di fegato ed epatociti per le loro caratteristiche metaboliche, strutturali e morfologiche che le rendono paragonabili ad epatociti primari (Nagarajan et al., 2019).

In questo progetto di Tesi sono stati valutati gli effetti dello stress ossidativo indotto da KBrO_3 sui cambiamenti epigenetici e sulle modifiche all'organizzazione della cromatina, che giocano un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica.

Precedentemente a questo lavoro di Tesi, nel nostro laboratorio, era stata confermata la formazione di 8-oxoG in cellule AML-12 trattate con KBrO_3 . A seguito di tale dato è stata analizzata la presenza di DSBs, danni secondari dello stress ossidativo indotto da KBrO_3 , attraverso l'analisi del marcatore $\gamma\text{-H2AX}$ (dati precedenti escludono aumentato stress replicativo, del quale lo stesso $\gamma\text{-H2AX}$ è un indicatore). Coerentemente con le aspettative, i dati del trattamento con KBrO_3 10 mM indicano un aumento del segnale di $\gamma\text{-H2AX}$ nelle cellule AML-12, che diminuisce nell'ora di recovery post-trattamento. La fosforilazione della serina 139 dell'istone H2AX ($\gamma\text{-H2AX}$) rappresenta, infatti, uno degli eventi primari a

seguito della formazione di DSBs, ed è una modifica chiave per la segnalazione e la riparazione di questa tipologia di danno al DNA (Talbert & Henikoff, 2021). Anche altri studi, in linee cellulari differenti dalle cellule AML-12, evidenziano l'incremento del marker γ -H2AX a seguito del trattamento con agenti ossidanti come il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Yang, Lin, Xu, & Zhang, 2026).

Gli effetti di $KBrO_3$ sulle modifiche epigenetiche e sull'organizzazione della cromatina in cellule epatiche non sono ancora stati investigati, nonostante il fegato rappresenti un organo fondamentale per lo svolgimento di una moltitudine di processi cellulari.

Le analisi ultrastrutturali svolte tramite staining con ammina d'osmio (OA) hanno evidenziato che il trattamento con $KBrO_3$ induce un aumento della condensazione della cromatina, accompagnata dalla formazione di nuovi cluster di eterocromatina (clumps), che tuttavia presentano un'estensione paragonabile ai clumps già presenti nella condizione di controllo. Nella successiva ora di recovery la cromatina va incontro a decondensazione con riduzione nel numero di clumps. La formazione di clumps a seguito del trattamento con $KBrO_3$ è in linea con i risultati ottenuti sull'organizzazione della cromatina nelle cellule HeLa, in cui il trattamento ha portato alla condensazione della cromatina in cluster, i quali sono diminuiti, dopo aver rimosso l'agente ossidante $KBrO_3$ (Casali et al., 2022). In aggiunta, anche alcuni studi sullo stress termico in cellule HeLa hanno evidenziato la formazione di cluster di cromatina condensata in risposta a ipertermia o ipotermia (McCaw, Stevenson, & Lancaster, 2020; Casali et al., 2024).

L'iniziale condensazione della cromatina ha suggerito una potenziale riduzione dell'attività trascrizionale nelle cellule AML-12 trattate con $KBrO_3$. In letteratura, la condensazione della cromatina con conseguente riduzione dell'espressione genica a seguito del trattamento con $KBrO_3$ è stata già riscontrata sia utilizzando cellule HeLa (Amouroux, Campalans, Epe, & Radicella, 2010) sia in uno studio su fibroblasti embrionali murini (Gassman, Coskun, Jaruga, Dizdaroglu, & Wilson, 2016). Per confermare questa ipotesi è stato realizzato un esperimento di pulse-chase con la 5-bromouridina (BrU), che viene incorporata negli RNA nascenti, al posto dell'uracile, permettendone così la quantificazione. Le analisi di immunofluorescenza hanno evidenziato un calo nell'intensità del segnale fluorescente della BrU nelle cellule a seguito del trattamento, e una graduale ripresa nell'ora di recovery. È stata anche analizzata la presenza nel nucleo delle ribonucleoproteine hnRNP A/B, coinvolte in diversi processi di maturazione degli RNA nascenti, come lo splicing alternativo (Liu & Shi, 2021). L'analisi di immunogold labelling ha confermato la diminuzione del marcaggio per le hnRNP A/B nelle cellule trattate con $KBrO_3$ in linea con la riduzione dell'attività trascrizionale. È stato descritto in letteratura che il trattamento con agenti ossidanti come

H₂O₂ può determinare un calo nell'espressione delle hnRNP A/B attraverso la loro degradazione (Cote et al., 2012); inoltre, la presenza di stress cellulare può attivare un pathway che porta alla fosforilazione delle hnRNP A/B comportando un loro accumulo nel citoplasma, in forma di granuli di stress, e diminuendone la quota nucleare (Guil, Long, & Caceres, 2006; H. Chen et al., 2023). Questi risultati sono, quindi, coerenti con il cambiamento nell'organizzazione della cromatina ottenuto con il trattamento, suggerendo il delineamento di un profilo epigenetico sfavorevole alla trascrizione.

I dati ottenuti sul profilo epigenetico sembrano supportare le osservazioni su condensazione della cromatina e riduzione dell'attività trascrizionale. Infatti, l'analisi di una PTM degli istoni, H3K4me3, e di una modifica epigenetica del DNA, 5hmC, sostengono il quadro fino ad ora descritto. Questi due marcatori sono associati ad un profilo generalmente favorevole alla trascrizione (Shi et al., 2017; H. Wang & Helin, 2025), e i risultati hanno mostrato una riduzione significativa del marcaggio per H3K4me3 e 5hmC a seguito del trattamento con KBrO₃. La produzione in eccesso di ROS potrebbe alterare il metabolismo fisiologico della cellula, riducendo i livelli di α -chetoglutarato, ed ossidando il Fe²⁺ a Fe³⁺, sottraendo agli enzimi TET cofattori fondamentali per il loro funzionamento (Niu et al., 2015; Gonzalez Acevedo et al., 2026). Tuttavia, alcuni studi con agenti esogeni che inducono stress ossidativo hanno evidenziato comportamenti discordanti nel pattern globale di 5hmC: ad esempio, l'utilizzo di sostanze come l'idrochinone (derivante dal benzene e carcinogeno nel fumo di sigaretta) o altri inquinanti ambientali determina un aumento dell'attività degli enzimi TET1, con conseguente incremento della 5hmC in cellule umane (Coulter, O'Driscoll, & Bressler, 2013; B. Zhao et al., 2014); mentre Delatte et al. usando un modello cellulare *in vitro* di neuroblastoma trattato con agenti ossidanti come la butionina sulfoximina hanno riportato una perdita globale di 5hmC, ma con un aumento locus-specifico di 5hmC in geni e miRNA coinvolti nei pathways di risposta allo stress cellulare (Delatte et al., 2015; Tommasi & Besaratinia, 2019).

La perdita di 5hmC nel presente studio, tuttavia, sembra in contrasto con gli altri dati ottenuti sulla metilazione del DNA, che vedono invece una perdita globale di 5mC e dell'enzima DNMT3A che inserisce i gruppi metile sulle citosine. Questi dati inseriti nel contesto di condensazione cromatinica, con la formazione di clumps, e la riduzione dell'attività trascrizionale introducono un quadro generale piuttosto complesso. La perdita globale di 5mC potrebbe avere diverse spiegazioni: (I) le DNMTs, introducono il gruppo metile sulle citosine utilizzando come donatore SAM, e lo stress ossidativo può ossidare i residui di cisteina nel sito catalitico delle DNMTs ed esaurire il donatore SAM portando ad una ipometilazione globale e intaccando i processi di mantenimento della metilazione

(Davletgildeeva & Kuznetsov, 2024; Gonzalez Acevedo et al., 2026); (II) i dinucleotidi CpG, in cui la guanina viene ossidata ad 8-oxoG, possono non essere riconosciuti dalle DNMTs, impedendo il mantenimento del profilo di metilazione del DNA (Hahm, Park, Jang, & Chi, 2022); (III) essendo una modifica presente anche sui trascritti di RNA, il calo dell'attività trascrizionale potrebbe comportare una riduzione nei livelli di 5mC (Z. Liu et al., 2026). Tuttavia, la metilazione delle citosine negli mRNA in contesti di stress ossidativo è un campo ancora poco esplorato in letteratura, con studi principalmente focalizzati sulla metilazione delle adenine (m6A) nei trascritti di RNA (Ponzetti, Rucci, & Falone, 2023). Presa singolarmente, la 5mC, modifica associata al silenziamento genico e ad una cromatina più compatta, non può, quindi, giustificare in questo scenario la formazione di cluster di cromatina condensata dovuta al trattamento con KBrO₃. Probabilmente la 5mC non rappresenta la modifica trainante della compattazione della cromatina, suggerendo che altre modifiche epigenetiche, ad oggi non investigate, possano esserne la causa.

Infine, l'analisi sui clumps di eterocromatina, rivelati dall'analisi ultrastrutturale, ha evidenziato che sono arricchiti alla loro periferia per i marcatori γ -H2AX e H3K4me3. La deposizione di γ -H2AX, spesso per mano della chinasi ATM, è una delle prime azioni che la cellula mette in atto per segnalare la formazione di DSBs e attivare il reclutamento dei macchinari coinvolti nei processi di riparazione (Berger, Stanley, Moore, & Goodarzi, 2017). Questo evento può reclutare enzimi con il compito di modificare il profilo epigenetico locale, infatti, la condensazione della cromatina in cluster in seguito alla formazione di DSBs in regioni eucromatiniche, con geni attivamente trascritti, è un evento riportato in letteratura. La deposizione di modifiche istoniche post-traduzionali di silenziamento genico porta ad una eterocromatinizzazione transiente del sito di danno. Il gruppo di Kakarougkas et al. ha descritto il coinvolgimento di modifiche come la monoubiquitinazione della lisina 119 dell'istone H2A (H2AK119ub) fondamentale per il reclutamento del complesso di rimodellamento PBAF (Kakarougkas et al., 2014), ma è stata anche evidenziata la deposizione di H3K27me3 e di H3K9me2 (Caron et al., 2021). La localizzazione periferica di γ -H2AX potrebbe essere spiegata attraverso la dinamica della cromatina all'interno di questi cluster. In letteratura è ampiamente riportato come i foci di danno marcati con γ -H2AX vengano spostati alla periferia dei clumps per facilitare l'accesso del macchinario di segnalazione e riparo ai siti di DSBs e ridurre la probabilità di errori nella riparazione. Questo accade anche nei cluster di eterocromatina contenenti sequenze ripetute, soprattutto per ottenere una riparazione più fedele quando il danno viene riparato tramite ricombinazione omologa che sfrutta cromosomi omologhi o cromatidi fratelli (Hauer & Gasser, 2017; A. Janssen et al., 2018; Caron et al., 2021).

Il mantenimento del marcatore H3K4me3 alla periferia dei clumps potrebbe essere coinvolto nel processo di riparazione del danno tramite NHEJ (*non-homologous end-joining*). È stato osservato che, in lievito, H3K4me3 ha la funzione di mantenere l'integrità del genoma e può essere anche depositato ai siti di danno da DSBs per favorire la riparazione della rottura a doppio filamento tramite il pathway NHEJ. Una funzionalità analoga è stata riscontrata anche in cellule di mammifero e in altri vertebrati, in cui il reclutamento della HMT di H3K4 al sito di danno è dipendente dal complesso di rimodellamento della cromatina RSC. Difetti nella metilazione di H3K4 o nel complesso RSC riducono drasticamente il tasso di successo nella riparazione da parte del pathway NHEJ (Wei et al., 2018; Mushtaq et al., 2021).

Le analisi di live-cell imaging sulla dinamica dei cluster di eterocromatina hanno preso in considerazione clumps già visibili nella condizione di controllo, e quindi non indotti dal trattamento, i quali potrebbero rappresentare regioni contenenti sequenze altamente ripetute (Podgornaya, Ostromyshenskii, & Erukashvily, 2018). In organismi modello come lievito, *Drosophila* e topi è stato riportato che i DSBs, se ricadono in queste regioni condensate, vengono prima spostati alla periferia dei clumps, dove avvengono una serie di modifiche: tra queste, la SUMOilazione di alcuni substrati, la modifica della proteina HP1 e la rimozione di alcuni nucleosomi nei pressi del sito di rottura (Tsouroula et al., 2016; A. Janssen et al., 2018). Tali modifiche permettono lo spostamento e l'ancoraggio dei clumps ai NPCs o a proteine con domini di legame SUN a ridosso della membrana nucleare interna dove, infine, avviene la riparazione controllata delle sequenze ripetute, spesso tramite ricombinazione omologa (Ryu et al., 2015; Hauer & Gasser, 2017). In questo contesto, il meccanismo che determina il movimento dei clumps potrebbe essere analogo ed essere necessario per ottenere una riparazione corretta e non aberrante di queste sequenze.

Future investigazioni, sulla base dei dati ottenuti, potranno riguardare altre modifiche epigenetiche per delineare con maggiore precisione il cambiamento del profilo epigenetico che determina la riorganizzazione cromatinica e l'alterazione dell'espressione genica. Inoltre, sarà importante proseguire lo studio dei cluster di eterocromatina, definendo da quali sequenze sono composti, quali altre modifiche epigenetiche li caratterizzano e quali proteine potrebbero essere reclutate da H3K4me3 e γ -H2AX alla loro periferia. Infine, potrebbe essere interessante approfondire quali geni siano coinvolti nella regolazione dell'espressione genica analizzando potenziali RNA di interesse.

Nel complesso, la comprensione del legame tra stress ossidativo e regolazione dell'espressione genica può aiutare a chiarire i meccanismi alla base dello sviluppo di diverse patologie, nelle quali l'alterazione dell'espressione genica svolge un ruolo fondamentale.

VI. CONCLUSIONE

Lo stress ossidativo determina un'ampia gamma di alterazioni cellulari che interferiscono con i meccanismi di regolazione dell'espressione genica, e causano danni alle macromolecole biologiche compromettendo la vitalità cellulare e promuovendo processi patogenetici correlati allo sviluppo di diverse patologie. Il bromato di potassio (KBrO_3) rappresenta un agente ossidante che, in opportune condizioni sperimentali, induce stress ossidativo localizzato prevalentemente a livello nucleare, risultando particolarmente utile per indagini focalizzate sul compartimento nucleoplasmatico.

In questo progetto di Tesi è stato indotto stress ossidativo mediante KBrO_3 principalmente a livello del nucleo nel modello cellulare *in vitro* di epatociti murini AML-12, analizzando le alterazioni dello stato della cromatina, i cambiamenti del profilo epigenetico e la variazione dell'attività trascrizionale.

I risultati indotti dalla sostanza ossidante hanno evidenziato interessanti cambiamenti, tra cui una diminuzione dell'attività trascrizionale, una riduzione dei marcatori epigenetici istruttivi per l'espressione genica, una diminuzione della metilazione del DNA nella forma della 5mC e un incremento della cromatina condensata accompagnato dalla formazione di nuovi cluster di eterocromatina.

Tuttavia, lo studio presenta una serie di limitazioni tra cui il delineamento non ancora completo del profilo epigenetico indotto dalla sostanza ossidante, così come l'analisi solo preliminare dei cluster di eterocromatina presenti nel nucleoplasma. Future analisi potranno essere indirizzate a delineare in modo più completo il cambiamento del profilo epigenetico, e ad una caratterizzazione più approfondita dei cluster di eterocromatina. Inoltre, potrebbe essere utile studiare il coinvolgimento di specifici geni e RNA di interesse nella risposta allo stress ossidativo indotto dal bromato di potassio, per approfondire sempre di più il legame tra stress ossidativo, organizzazione della cromatina e regolazione dell'espressione genica.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Zhayia, E. R., Awwad, S. W., Ben-Oz, B. M., Khoury-Haddad, H., & Ayoub, N. (2018). CDYL1 fosters double-strand break-induced transcription silencing and promotes homology-directed repair. *J Mol Cell Biol*, 10(4), 341-357. doi:10.1093/jmcb/mjx050
- Al-Mareed, A. A., Farah, M. A., Al-Anazi, K. M., Hailan, W. A. Q., & Ali, M. A. (2022). Potassium bromate-induced oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity in the blood and liver cells of mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 878, 503481. doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503481
- Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J., von Bulow, V., Harb, H., Alhamdan, F., . . . Potaczek, D. P. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 39. doi:10.1186/s13223-018-0259-4
- Amouroux, R., Campalans, A., Epe, B., & Radicella, J. P. (2010). Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res*, 38(9), 2878-2890. doi:10.1093/nar/gkp1247
- Anwar, S., Alharbi, H. O. A., Babiker, A. Y., & Rahmani, A. H. (2026). Oxidative Stress in Health and Disease: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci*, 27(6). doi:10.3390/ijms27062681
- Arendt, D., Musser, J. M., Baker, C. V. H., Bergman, A., Cepko, C., Erwin, D. H., . . . Wagner, G. P. (2016). The origin and evolution of cell types. *Nat Rev Genet*, 17(12), 744-757. doi:10.1038/nrg.2016.127
- Baccarelli, A., & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*, 21(2), 243-251. doi:10.1097/mop.0b013e32832925cc
- Basavarajappa, B. S., & Subbanna, S. (2021). Histone Methylation Regulation in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*, 22(9). doi:10.3390/ijms22094654
- Bascom, G., & Schlick, T. (2017). Linking Chromatin Fibers to Gene Folding by Hierarchical Looping. *Biophys J*, 112(3), 434-445. doi:10.1016/j.bpj.2017.01.003
- Bell, C. C., Faulkner, G. J., & Gilan, O. (2024). Chromatin-based memory as a self-stabilizing influence on cell identity. *Genome Biol*, 25(1), 320. doi:10.1186/s13059-024-03461-x

- Berasain, C., Arechederra, M., Argemi, J., Fernandez-Barrena, M. G., & Avila, M. A. (2023). Loss of liver function in chronic liver disease: An identity crisis. *J Hepatol*, 78(2), 401-414. doi:10.1016/j.jhep.2022.09.001
- Berger, N. D., Stanley, F. K. T., Moore, S., & Goodarzi, A. A. (2017). ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1731). doi:10.1098/rstb.2016.0283
- Berry, S., Dean, C., & Howard, M. (2017). Slow Chromatin Dynamics Allow Polycomb Target Genes to Filter Fluctuations in Transcription Factor Activity. *Cell Syst*, 4(4), 445-457 e448. doi:10.1016/j.cels.2017.02.013
- Bersaglieri, C., & Santoro, R. (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells*, 8(6). doi:10.3390/cells8060579
- Braunger, J. M., Cammarata, L. V., Sornapudi, T. R., Uhler, C., & Shivashankar, G. V. (2024). Transcriptional changes are tightly coupled to chromatin reorganization during cellular aging. *Aging Cell*, 23(3), e14056. doi:10.1111/accel.14056
- Caron, P., Pobega, E., & Polo, S. E. (2021). DNA Double-Strand Break Repair: All Roads Lead to HeterochROMatin Marks. *Front Genet*, 12, 730696. doi:10.3389/fgene.2021.730696
- Casali, C., Galgano, L., Zannino, L., Siciliani, S., Cavallo, M., Mazzini, G., & Biggiogera, M. (2024). Impact of heat and cold shock on epigenetics and chromatin structure. *Eur J Cell Biol*, 103(1), 151373. doi:10.1016/j.ejcb.2023.151373
- Casali, C., Siciliani, S., Galgano, L., & Biggiogera, M. (2022). Oxidative Stress and Nuclear Reprogramming: A Pilot Study of the Effects of Reactive Oxygen Species on Architectural and Epigenetic Landscapes. *Int J Mol Sci*, 24(1). doi:10.3390/ijms24010153
- Chen, H., Liu, Y., Zhang, T., Huang, T., Lang, Y., Sheng, Q., . . . Lv, Z. (2023). Inhibition of the lncRNA 585189 prevents podocyte injury and mitochondria dysfunction by promoting hnRNP A1 and SIRT1 in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol*, 578, 112065. doi:10.1016/j.mce.2023.112065
- Chen, P., Li, W., & Li, G. (2021). Structures and Functions of Chromatin Fibers. *Annu Rev Biophys*, 50, 95-116. doi:10.1146/annurev-biophys-062920-063639
- Chojnowski, A., Ong, P. F., & Dreesen, O. (2015). Nuclear lamina remodelling and its implications for human disease. *Cell Tissue Res*, 360(3), 621-631. doi:10.1007/s00441-014-2069-4
- Cordero, C., Mehta, K. P. M., Weaver, T. M., Ling, J. A., Freudenthal, B. D., Cortez, D., & Roberts, S. A. (2024). Contributing factors to the oxidation-induced mutational

- landscape in human cells. *Nat Commun*, 15(1), 10722. doi:10.1038/s41467-024-55497-z
- Cote, G. J., Zhu, W., Thomas, A., Martin, E., Murad, F., & Sharina, I. G. (2012). Hydrogen peroxide alters splicing of soluble guanylyl cyclase and selectively modulates expression of splicing regulators in human cancer cells. *PLoS One*, 7(7), e41099. doi:10.1371/journal.pone.0041099
- Coulter, J. B., O'Driscoll, C. M., & Bressler, J. P. (2013). Hydroquinone increases 5-hydroxymethylcytosine formation through ten eleven translocation 1 (TET1) 5-methylcytosine dioxygenase. *J Biol Chem*, 288(40), 28792-28800. doi:10.1074/jbc.M113.491365
- Crawford, R., Charlesworth, T., Riffle, S., Yardley, K., & Osborne, R. (2026). 5mC and 5hmC methylation sequencing: the power of 6-base sequencing in a multiomic era. *Epigenomics*, 18(1), 101-115. doi:10.1080/17501911.2025.2586452
- Cremer, M., & Cremer, T. (2019). Nuclear compartmentalization, dynamics, and function of regulatory DNA sequences. *Genes Chromosomes Cancer*, 58(7), 427-436. doi:10.1002/gcc.22714
- Cremer, T., & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(3), a003889. doi:10.1101/cshperspect.a003889
- Cremer, T., Cremer, M., & Cremer, C. (2018). The 4D Nucleome: Genome Compartmentalization in an Evolutionary Context. *Biochemistry (Mosc)*, 83(4), 313-325. doi:10.1134/S000629791804003X
- Cremer, T., Cremer, M., Hubner, B., Silaharoglu, A., Hendzel, M., Lanctot, C., . . . Cremer, C. (2020). The Interchromatin Compartment Participates in the Structural and Functional Organization of the Cell Nucleus. *Bioessays*, 42(2), e1900132. doi:10.1002/bies.201900132
- da Costa-Nunes, J. A., & Noordermeer, D. (2023). TADs: Dynamic structures to create stable regulatory functions. *Curr Opin Struct Biol*, 81, 102622. doi:10.1016/j.sbi.2023.102622
- Davletgildeeva, A. T., & Kuznetsov, N. A. (2024). The Role of DNMT Methyltransferases and TET Dioxygenases in the Maintenance of the DNA Methylation Level. *Biomolecules*, 14(9). doi:10.3390/biom14091117
- De Magistris, P., & Antonin, W. (2018). The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. *Curr Biol*, 28(8), R487-R497. doi:10.1016/j.cub.2018.01.073

- Delatte, B., Jeschke, J., Defrance, M., Bachman, M., Creppe, C., Calonne, E., . . . Fuks, F. (2015). Genome-wide hydroxymethylcytosine pattern changes in response to oxidative stress. *Sci Rep*, 5, 12714. doi:10.1038/srep12714
- Du, Q., Luu, P. L., Stirzaker, C., & Clark, S. J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*, 7(6), 1051-1073. doi:10.2217/epi.15.39
- Duan, X., Xing, Z., Qiao, L., Qin, S., Zhao, X., Gong, Y., & Li, X. (2024). The role of histone post-translational modifications in cancer and cancer immunity: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Front Immunol*, 15, 1495221. doi:10.3389/fimmu.2024.1495221
- Endutkin, A. V., Dvornikova, A. P., & Zharkov, D. O. (2025). 8-Oxoguanine: A Lesion, an Epigenetic Mark, or a Molecular Signal? *Int J Mol Sci*, 26(24). doi:10.3390/ijms262411799
- Fleming, A. M., Ding, Y., & Burrows, C. J. (2017). Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(10), 2604-2609. doi:10.1073/pnas.1619809114
- Fritz, A. J., Sehgal, N., Pliss, A., Xu, J., & Berezney, R. (2019). Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes Chromosomes Cancer*, 58(7), 407-426. doi:10.1002/gcc.22732
- Fujishiro, S., Sasai, M., & Maeshima, K. (2025). Chromatin domains in the cell: Phase separation and condensation. *Curr Opin Struct Biol*, 91, 103006. doi:10.1016/j.sbi.2025.103006
- Gabriella, D., Luca, N., & Alessandra, V. (2026). The Oxidative Stress: Origin and Role in Aging and Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 15(5). doi:10.3390/antiox15050597
- Gassman, N. R., Coskun, E., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., & Wilson, S. H. (2016). Combined Effects of High-Dose Bisphenol A and Oxidizing Agent (KBrO₃) on Cellular Microenvironment, Gene Expression, and Chromatin Structure of Ku70-deficient Mouse Embryonic Fibroblasts. *Environ Health Perspect*, 124(8), 1241-1252. doi:10.1289/EHP237
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*, 135(8), 851-867. doi:10.1007/s00439-016-1683-5
- Gohil, D., Sarker, A. H., & Roy, R. (2023). Base Excision Repair: Mechanisms and Impact in Biology, Disease, and Medicine. *Int J Mol Sci*, 24(18). doi:10.3390/ijms241814186

- Gonzalez Acevedo, M. K., Powers, M., & Cucullo, L. (2026). Oxidative Stress, Environmental Pollutants, Aging, and Epigenetic Regulation: Mechanistic Insights and Biomarker Advances. *Antioxidants (Basel)*, 15(4). doi:10.3390/antiox15040494
- Guil, S., Long, J. C., & Caceres, J. F. (2006). hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol*, 26(15), 5744-5758. doi:10.1128/MCB.00224-06
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(10), 621-637. doi:10.1038/s41580-018-0028-8
- Hahm, J. Y., Park, J., Jang, E. S., & Chi, S. W. (2022). 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med*, 54(10), 1626-1642. doi:10.1038/s12276-022-00822-z
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., . . . Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 11(3). doi:10.3390/cells11030552
- Hampoezl, B., Andres-Pons, A., Kastiris, P., & Beck, M. (2019). Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex. *Annu Rev Biophys*, 48, 515-536. doi:10.1146/annurev-biophys-052118-115308
- Hansen, A. S., Cattoglio, C., Darzacq, X., & Tjian, R. (2018). Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus*, 9(1), 20-32. doi:10.1080/19491034.2017.1389365
- Hassan, H. A., Ahmed, H. S., & Hassan, D. F. (2024). Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets. *Hum Antibodies*, 32(4), 151-167. doi:10.3233/HAB-240011
- Hauer, M. H., & Gasser, S. M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev*, 31(22), 2204-2221. doi:10.1101/gad.307702.117
- Hennen, J., Saunders, C. A., Mueller, J. D., & Luxton, G. W. G. (2018). Fluorescence fluctuation spectroscopy reveals differential SUN protein oligomerization in living cells. *Molecular Biology of the Cell*, 29(9), 1003-1011. doi:10.1091/mbc.E17-04-0233
- Heride, C., Ricoul, M., Kieu, K., von Hase, J., Guillemot, V., Cremer, C., . . . Sabatier, L. (2010). Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 23), 4063-4075. doi:10.1242/jcs.066498

- Honer, M. A., Ferman, B. I., Gray, Z. H., Bondarenko, E. A., & Whetstine, J. R. (2024). Epigenetic modulators provide a path to understanding disease and therapeutic opportunity. *Genes Dev*, 38(11-12), 473-503. doi:10.1101/gad.351444.123
- Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., & Foulkes, N. S. (2024). Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants (Basel)*, 13(3). doi:10.3390/antiox13030312
- Hua, L., Yan, D., Wan, C., & Hu, B. (2022). Nucleolus and Nucleolar Stress: From Cell Fate Decision to Disease Development. *Cells*, 11(19). doi:10.3390/cells11193017
- Janssen, A., Colmenares, S. U., & Karpen, G. H. (2018). Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34, 265-288. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062653
- Janssen, S. M., & Lorincz, M. C. (2022). Interplay between chromatin marks in development and disease. *Nat Rev Genet*, 23(3), 137-153. doi:10.1038/s41576-021-00416-x
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484-492. doi:10.1038/nrg3230
- Joshi, K., Liu, S., Breslin, S. J. P., & Zhang, J. (2022). Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cell Mol Life Sci*, 79(7), 363. doi:10.1007/s00018-022-04396-x
- Kaimori, J. Y., Maehara, K., Hayashi-Takanaka, Y., Harada, A., Fukuda, M., Yamamoto, S., . . . Isaka, Y. (2016). Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep*, 6, 24318. doi:10.1038/srep24318
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A. L., Riballo, E., Herbert, A. D., Kunzel, J., . . . Downs, J. A. (2014). Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Mol Cell*, 55(5), 723-732. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.028
- Kawanishi, S., & Murata, M. (2006). Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology*, 221(2-3), 172-178. doi:10.1016/j.tox.2006.01.002
- Khurana, S., Kruhlak, M. J., Kim, J., Tran, A. D., Liu, J., Nyswaner, K., . . . Oberdoerffer, P. (2014). A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance. *Cell Rep*, 8(4), 1049-1062. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.024
- Kohwi-Shigematsu, T., Kohwi, Y., Takahashi, K., Richards, H. W., Ayers, S. D., Han, H. J., & Cai, S. (2012). SATB1-mediated functional packaging of chromatin into loops. *Methods*, 58(3), 243-254. doi:10.1016/j.ymeth.2012.06.019

- Kopp, B., Khoury, L., & Audebert, M. (2019). Validation of the gammaH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Archives of Toxicology*, 93(8), 2103-2114. doi:10.1007/s00204-019-02511-9
- Kuehner, J. N., Pearson, E. L., & Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(5), 283-294. doi:10.1038/nrm3098
- Lakadamyali, M., & Cosma, M. P. (2020). Visualizing the genome in high resolution challenges our textbook understanding. *Nat Methods*, 17(4), 371-379. doi:10.1038/s41592-020-0758-3
- Lebraud, E., Pinna, G., Siberchicot, C., Depagne, J., Busso, D., Fantini, D., . . . Campalans, A. (2020). Chromatin recruitment of OGG1 requires cohesin and mediator and is essential for efficient 8-oxoG removal. *Nucleic Acids Res*, 48(16), 9082-9097. doi:10.1093/nar/gkaa611
- Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *Febs Letters*, 589(20 Pt A), 2893-2904. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.023
- Li, Y., Ge, S., Liu, J., Sun, D., Xi, Y., & Chen, P. (2024). Nuclear Structure, Size Regulation, and Role in Cell Migration. *Cells*, 13(24). doi:10.3390/cells13242130
- Lima, M. F., Lisboa, M. O., Terceiro, L. E. L., Rangel-Pozzo, A., & Mai, S. (2022). Chromosome Territories in Hematological Malignancies. *Cells*, 11(8). doi:10.3390/cells11081368
- Lio, C. J., & Rao, A. (2019). TET Enzymes and 5hmC in Adaptive and Innate Immune Systems. *Front Immunol*, 10, 210. doi:10.3389/fimmu.2019.00210
- Liu, H., Jiao, Y., Wang, P. C., Chen, Y., Xu, M., Zhang, X., . . . Yang, Z. (2026). Oxidative stress and antioxidant therapeutic mechanisms. *Pharmacol Ther*, 278, 108962. doi:10.1016/j.pharmthera.2025.108962
- Liu, H., Tsai, H., Yang, M., Li, G., Bian, Q., Ding, G., . . . Dai, J. (2023). Three-dimensional genome structure and function. *MedComm (2020)*, 4(4), e326. doi:10.1002/mco2.326
- Liu, R., Wu, J., Guo, H., Yao, W., Li, S., Lu, Y., . . . Zhang, H. (2023). Post-translational modifications of histones: Mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm (2020)*, 4(3), e292. doi:10.1002/mco2.292
- Liu, Y., & Shi, S. L. (2021). The roles of hnRNP A2/B1 in RNA biology and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 12(2), e1612. doi:10.1002/wrna.1612

- Liu, Z., Zhang, H., Xie, Y., Wang, D., Liang, P., & Yang, K. (2026). 5-mC RNA methylation: a key regulator in cancer development and treatment. *J Transl Med*, 24(1). doi:10.1186/s12967-026-07824-9
- Lu, H., Yang, M., & Zhou, Q. (2023). Reprogramming transcription after DNA damage: recognition, response, repair, and restart. *Trends Cell Biol*, 33(8), 682-694. doi:10.1016/j.tcb.2022.11.010
- Ma, F., & Sen, R. (2026). Physiological aging in three dimensions. *Trends Cell Biol*, 36(3), 230-245. doi:10.1016/j.tcb.2025.08.002
- Magana-Acosta, M., & Valadez-Graham, V. (2020). Chromatin Remodelers in the 3D Nuclear Compartment. *Front Genet*, 11, 600615. doi:10.3389/fgene.2020.600615
- Malyavantham, K. S., Bhattacharya, S., Alonso, W. D., Acharya, R., & Berezney, R. (2008). Spatio-temporal dynamics of replication and transcription sites in the mammalian cell nucleus. *Chromosoma*, 117(6), 553-567. doi:10.1007/s00412-008-0172-6
- Mao, Y. S., Zhang, B., & Spector, D. L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet*, 27(8), 295-306. doi:10.1016/j.tig.2011.05.006
- Masiello, I., Siciliani, S., & Biggiogera, M. (2018). Perichromatin region: a moveable feast. *Histochem Cell Biol*, 150(3), 227-233. doi:10.1007/s00418-018-1703-8
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 108-121. doi:10.1038/nrm3742
- McCaw, B. A., Stevenson, T. J., & Lancaster, L. T. (2020). Epigenetic Responses to Temperature and Climate. *Integrative and Comparative Biology*, 60(6), 1469-1480. doi:10.1093/icb/icaa049
- McGinty, R. K., Kim, J., Chatterjee, C., Roeder, R. G., & Muir, T. W. (2008). Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature*, 453(7196), 812-816. doi:10.1038/nature06906
- McStay, B. (2023). The p-Arms of Human Acrocentric Chromosomes Play by a Different Set of Rules. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 24, 63-83. doi:10.1146/annurev-genom-101122-081642
- Mello, T., Zanieri, F., Ceni, E., & Galli, A. (2016). Oxidative Stress in the Healthy and Wounded Hepatocyte: A Cellular Organelles Perspective. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8327410. doi:10.1155/2016/8327410
- Mercado, N., Thimmulappa, R., Thomas, C. M., Fenwick, P. S., Chana, K. K., Donnelly, L. E., . . . Barnes, P. J. (2011). Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 406(2), 292-298. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.035

- Millan-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A. J., & Schneider, R. (2022). Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function. *Nat Rev Genet*, 23(9), 563-580. doi:10.1038/s41576-022-00468-7
- Mushtaq, A., Mir, U. S., Hunt, C. R., Pandita, S., Tantray, W. W., Bhat, A., . . . Pandita, T. K. (2021). Role of Histone Methylation in Maintenance of Genome Integrity. *Genes (Basel)*, 12(7). doi:10.3390/genes12071000
- Nagarajan, S. R., Paul-Heng, M., Krycer, J. R., Fazakerley, D. J., Sharland, A. F., & Hoy, A. J. (2019). Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 316(4), E578-E589. doi:10.1152/ajpendo.00365.2018
- Niu, Y., DesMarais, T. L., Tong, Z., Yao, Y., & Costa, M. (2015). Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med*, 82, 22-28. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.028
- Omega, C. A., Fleming, A. M., & Burrows, C. J. (2018). The Fifth Domain in the G-Quadruplex-Forming Sequence of the Human NEIL3 Promoter Locks DNA Folding in Response to Oxidative Damage. *Biochemistry*, 57(20), 2958-2970. doi:10.1021/acs.biochem.8b00226
- Padeken, J., Methot, S. P., & Gasser, S. M. (2022). Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23(9), 623-640. doi:10.1038/s41580-022-00483-w
- Parmar, J. J., & Padinhateeri, R. (2020). Nucleosome positioning and chromatin organization. *Curr Opin Struct Biol*, 64, 111-118. doi:10.1016/j.sbi.2020.06.021
- Patil, S., & Sengupta, K. (2021). Role of A- and B-type lamins in nuclear structure-function relationships. *Biol Cell*, 113(7), 295-310. doi:10.1111/boc.202000160
- Paulson, J. R., Hudson, D. F., Cisneros-Soberanis, F., & Earnshaw, W. C. (2021). Mitotic chromosomes. *Semin Cell Dev Biol*, 117, 7-29. doi:10.1016/j.semcdb.2021.03.014
- Paulson, J. R., & Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3), 817-828. doi:10.1016/0092-8674(77)90280-x
- Pelham-Webb, B., Murphy, D., & Apostolou, E. (2020). Dynamic 3D Chromatin Reorganization during Establishment and Maintenance of Pluripotency. *Stem Cell Reports*, 15(6), 1176-1195. doi:10.1016/j.stemcr.2020.10.012
- Petrovic, S., Mobbs, G. W., Bley, C. J., Nie, S., Patke, A., & Hoelz, A. (2022). Structure and Function of the Nuclear Pore Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 14(12). doi:10.1101/cshperspect.a041264

- Podgornaya, O. I., Ostromyshenskii, D. I., & Erukashvily, N. I. (2018). Who Needs This Junk, or Genomic Dark Matter. *Biochemistry (Mosc)*, 83(4), 450-466. doi:10.1134/S0006297918040156
- Ponzetti, M., Rucci, N., & Falone, S. (2023). RNA methylation and cellular response to oxidative stress-promoting anticancer agents. *Cell Cycle*, 22(8), 870-905. doi:10.1080/15384101.2023.2165632
- Rancourt, A., & Satoh, M. S. (2009). Delocalization of nucleolar poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the nucleoplasm and its novel link to cellular sensitivity to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 8(3), 286-297. doi:10.1016/j.dnarep.2008.11.018
- Rao, S. S., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., . . . Aiden, E. L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), 1665-1680. doi:10.1016/j.cell.2014.11.021
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447(7143), 425-432. doi:10.1038/nature05918
- Renaudin, X., & Campalans, A. (2025). Modulation of OGG1 enzymatic activities by small molecules, promising tools and current challenges. *DNA Repair (Amst)*, 149, 103827. doi:10.1016/j.dnarep.2025.103827
- Robinson, P. J., & Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*, 16(3), 336-343. doi:10.1016/j.sbi.2006.05.007
- Romero-Bueno, R., de la Cruz Ruiz, P., Artal-Sanz, M., Askjaer, P., & Dobrzynska, A. (2019). Nuclear Organization in Stress and Aging. *Cells*, 8(7). doi:10.3390/cells8070664
- Ryu, T., Spatola, B., Delabaere, L., Bowlin, K., Hopp, H., Kunitake, R., . . . Chiolo, I. (2015). Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nat Cell Biol*, 17(11), 1401-1411. doi:10.1038/ncb3258
- Shan, L., Li, P., Yu, H., & Chen, L. L. (2024). Emerging roles of nuclear bodies in genome spatial organization. *Trends Cell Biol*, 34(7), 595-605. doi:10.1016/j.tcb.2023.10.012
- Shandilya, J., & Roberts, S. G. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta*, 1819(5), 391-400. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.010

- Sharda, A., & Humphrey, T. C. (2022). The role of histone H3K36me3 writers, readers and erasers in maintaining genome stability. *DNA Repair (Amst)*, 119, 103407. doi:10.1016/j.dnarep.2022.103407
- Shi, D. Q., Ali, I., Tang, J., & Yang, W. C. (2017). New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Front Genet*, 8, 100. doi:10.3389/fgene.2017.00100
- Shilatifard, A. (2012). The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem*, 81, 65-95. doi:10.1146/annurev-biochem-051710-134100
- Sims, R. J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C. F., Lewis, B. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., . . . Reinberg, D. (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 28(4), 665-676. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.010
- Sobo, J. M., Alagna, N. S., Sun, S. X., Wilson, K. L., & Reddy, K. L. (2024). Lamins: The backbone of the nucleocytoskeleton interface. *Curr Opin Cell Biol*, 86, 102313. doi:10.1016/j.ceb.2023.102313
- Spassova, M. A., Miller, D. J., & Nikolov, A. S. (2015). Kinetic Modeling Reveals the Roles of Reactive Oxygen Species Scavenging and DNA Repair Processes in Shaping the Dose-Response Curve of KBrO(3)-Induced DNA Damage. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 764375. doi:10.1155/2015/764375
- Stanley, R. F., & Abdel-Wahab, O. (2022). Dysregulation and therapeutic targeting of RNA splicing in cancer. *Nat Cancer*, 3(5), 536-546. doi:10.1038/s43018-022-00384-z
- Svetlov, V., & Nudler, E. (2013). Basic mechanism of transcription by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta*, 1829(1), 20-28. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.009
- Szczepinska, T., Rusek, A. M., & Plewczynski, D. (2019). Intermingling of chromosome territories. *Genes Chromosomes Cancer*, 58(7), 500-506. doi:10.1002/gcc.22736
- Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2021). Histone variants at a glance. *Journal of Cell Science*, 134(6). doi:10.1242/jcs.244749
- Tanabe, H., Habermann, F. A., Solovei, I., Cremer, M., & Cremer, T. (2002). Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res*, 504(1-2), 37-45. doi:10.1016/s0027-5107(02)00077-5
- Thibault, P. A., Ganesan, A., Kalyanamoorthy, S., Clarke, J. W. E., Salapa, H. E., & Levin, M. C. (2021). hnRNP A/B Proteins: An Encyclopedic Assessment of Their Roles in Homeostasis and Disease. *Biology (Basel)*, 10(8). doi:10.3390/biology10080712

- Tibben, B. M., & Rothbart, S. B. (2024). Mechanisms of DNA Methylation Regulatory Function and Crosstalk with Histone Lysine Methylation. *J Mol Biol*, 436(7), 168394. doi:10.1016/j.jmb.2023.168394
- Tommasi, S., & Besaratinia, A. (2019). DNA Hydroxymethylation at the Interface of the Environment and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Environ Res Public Health*, 16(15). doi:10.3390/ijerph16152791
- Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., . . . Soutoglou, E. (2016). Temporal and Spatial Uncoupling of DNA Double Strand Break Repair Pathways within Mammalian Heterochromatin. *Mol Cell*, 63(2), 293-305. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.002
- Varley, K. E., Gertz, J., Bowling, K. M., Parker, S. L., Reddy, T. E., Pauli-Behn, F., . . . Myers, R. M. (2013). Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*, 23(3), 555-567. doi:10.1101/gr.147942.112
- Vinayak, V., Lakadamyali, M., & Shenoy, V. B. (2026). Architecture and regulation of nanoscale chromatin domains. *Nat Commun*, 17(1). doi:10.1038/s41467-026-71213-5
- Vorlander, M. K., Pacheco-Fiallos, B., & Plaschka, C. (2022). Structural basis of mRNA maturation: Time to put it together. *Curr Opin Struct Biol*, 75, 102431. doi:10.1016/j.sbi.2022.102431
- Wang, H., & Helin, K. (2025). Roles of H3K4 methylation in biology and disease. *Trends Cell Biol*, 35(2), 115-128. doi:10.1016/j.tcb.2024.06.001
- Wang, M., & Lin, H. (2021). Understanding the Function of Mammalian Sirtuins and Protein Lysine Acylation. *Annu Rev Biochem*, 90, 245-285. doi:10.1146/annurev-biochem-082520-125411
- Wei, S., Li, C., Yin, Z., Wen, J., Meng, H., Xue, L., & Wang, J. (2018). Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years. *J Cancer*, 9(12), 2072-2081. doi:10.7150/jca.23427
- Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Curr Opin Genet Dev*, 43, 31-37. doi:10.1016/j.gde.2016.11.001
- Wong, X., Loo, T. H., & Stewart, C. L. (2021). LINC complex regulation of genome organization and function. *Curr Opin Genet Dev*, 67, 130-141. doi:10.1016/j.gde.2020.12.007
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., . . . Allis, C. D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 442(7098), 86-90. doi:10.1038/nature04815

- Xie, J., Libri, D., & Porrua, O. (2023). Mechanisms of eukaryotic transcription termination at a glance. *Journal of Cell Science*, 136(1). doi:10.1242/jcs.259873
- Yang, L., Lin, Y., Xu, W., & Zhang, Y. (2026). Protective effect of Pyripyropene A on H(2)O(2)-induced DNA oxidative damage in L02 cells. *Toxicol Mech Methods*, 36(1), 122-133. doi:10.1080/15376516.2025.2561734
- Zhang, X., Zhang, Y., Wang, C., & Wang, X. (2023). TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 297. doi:10.1038/s41392-023-01537-x
- Zhao, B., Yang, Y., Wang, X., Chong, Z., Yin, R., Song, S. H., . . . Wang, H. (2014). Redox-active quinones induces genome-wide DNA methylation changes by an iron-mediated and Tet-dependent mechanism. *Nucleic Acids Res*, 42(3), 1593-1605. doi:10.1093/nar/gkt1090
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., . . . Qin, S. (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci*, 22(23). doi:10.3390/ijms222312808
- Zheng, Y., Chen, J., Liu, Z., Wang, K., & Zhang, H. (2025). The role of 8-OxoG and its repair systems in liver diseases progression: responsible mechanisms and promising natural products. *Chin J Nat Med*, 23(7), 815-823. doi:10.1016/S1875-5364(25)60848-X
- Zhu, J., Fleming, A. M., & Burrows, C. J. (2018). The RAD17 Promoter Sequence Contains a Potential Tail-Dependent G-Quadruplex That Downregulates Gene Expression upon Oxidative Modification. *ACS Chem Biol*, 13(9), 2577-2584. doi:10.1021/acscchembio.8b00522
- Zhu, M., Lu, X., Wang, D., Ma, J., Wang, Y., Wang, R., . . . Zhu, Y. (2025). A narrative review of epigenetic marker in H3K27ac and its emerging potential as a therapeutic target in cancer. *Epigenomics*, 17(4), 263-279. doi:10.1080/17501911.2025.2460900