

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA APPLICATA E SPERIMENTALE (codice: 11158)

Curriculum: FORENSE



MODIFICAZIONI EPIGENETICHE INDOTTE DA NDM29: POTENZIALI
IMPLICAZIONI PER LA SCIENZA FORENSE

Laureando/a:
Elisa Cifelli

Relatore:
Prof.ssa Laura Vergani
Dott.ssa Hawraa Zbeeb

Correlatore:
Prof. Andrea Amaroli

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

RIASSUNTO/ABSTRACT

Il Neuroblastoma è il tumore solido extracranico più frequente in età pediatrica, caratterizzato da una straordinaria eterogeneità clinica e biologica. La sua patogenesi è complessa e coinvolge molteplici vie molecolari e alterazioni genetiche. Studi recenti hanno dimostrato che l'amplificazione di MYCN, la mutazione di ALK e del promotore TERT, l'inattivazione della via p53 e l'instabilità cromosomica rappresentano meccanismi chiave di questo tumore. Questa tesi si propone di identificare e caratterizzare le possibili alterazioni della morfometria nucleare, dell'architettura del genoma, della condensazione della cromatina e dell'assetto epigenetico correlate all'acquisizione di un fenotipo neuronale da parte di cellule di neuroblastoma altamente maligne, indotta dalla sovraespressione dell'RNA lungo non codificante (lncRNA) NDM29 (*Neuroblastoma Differentiation Marker 29*). Utilizzando come modello sperimentale una linea cellulare umana SK-N-BE(2) stabilmente trasfettata per sovraesprimere NDM29, abbiamo confrontato cellule di controllo trasfettate con un vettore vuoto (*Mock*) e cellule sovraesprimenti NDM29 (*S1.1*), al fine di indagare gli effetti cellulari associati a un incremento di 7,5 volte dell'espressione di NDM29. Le analisi morfologiche hanno rivelato una chiara transizione fenotipica delle cellule S1.1 verso una morfologia neuronale caratterizzata dalla presenza di neuriti, accompagnata da una significativa riduzione del tasso di proliferazione. A livello molecolare, è stato eseguito uno screening sistematico degli enzimi coinvolti nelle modificazioni della cromatina utilizzando piattaforme PCR Array in formato 96 pozzetti. Il profilo trascrizionale ha evidenziato un aumento di 13,5 volte dell'espressione del gene NCOA3 nelle cellule S1.1 rispetto alle cellule Mock, unitamente ad alterazioni a carico di enzimi di tipo "Eraser" e "Writer"; ciò suggerisce una regolazione a valle di NCOA3, un coattivatore trascrizionale nucleare dotato di attività istone-acetiltransferasica che regola l'espressione genica legandosi ai recettori ormonali. Parallelamente, è stato studiato il codice istonico mediante estrazione degli istoni totali per valutare i pattern di metilazione, fosforilazione e acetilazione, nonché le alterazioni a carico degli istoni H3 e H4; l'ubiquitinazione di H2BK120 è stata analizzata tramite Western Blot. Le modificazioni epigenetiche osservate coinvolgono geni deputati alla riparazione del DNA, nello specifico: ERCC5, LIG4, CA9 e SERPINF1. Infine, tali evidenze biologiche sono state contestualizzate nell'ambito dell'epidemiologia forense e ambientale. Da un punto di vista concettuale, queste modificazioni possono essere considerate una forma di "memoria molecolare" dello stato cellulare; Tuttavia, la loro capacità di fungere specificamente da biomarcatori di esposizione ambientale deve essere verificata attraverso studi di esposizione controllata e la

validazione mediante campioni biologici. Tali studi li renderebbero utili per integrare la valutazione dei nessi di causalità nei casi di responsabilità civile, con una potenziale applicabilità ai procedimenti penali per reati ambientali, nonché alla tanatologia forense e alla futura ricerca di medicina legale.

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor of childhood, characterized by striking clinical and biological heterogeneity. Its pathogenesis is complex and involves multiple molecular pathways and genetic alterations. Recent studies have shown that MYCN amplification, ALK and TERT promoter mutations, p53 pathway inactivation, and chromosomal instability are key mechanisms of this tumor. This thesis aims to unveil and characterize the possible alterations of the nuclear morphometry, genome architecture, chromatin condensation and epigenetics being correlated with the recovery of a neuron-like phenotype by highly malignant NB cells through the over-expression of the long non-coding RNA (lncRNA) NDM29 (*Neuroblastoma Differentiation Marker 29*). Utilizing a stably transfected SK-N-BE(2) human cell line overexpressing NDM29 as an experimental model, we compared control cells transfected with an empty vector (*Mock*) with NDM29-overexpressing cells to investigate the cellular effects associated with NDM29 expression by 7.5-fold increase (*S1.1*). Morphological analyses revealed a clear phenotypic transition of S1.1 cells toward a neurite-bearing, neuron-like morphology, coupled with a significant reduction in proliferation rate. At the molecular level, a systematic screening of chromatin modifications enzymes was performed using 96-well PCR Array platforms. Transcriptional profiling revealed a 13.5-fold increase in NCOA3 gene expression in S1.1 cells compared to Mocks cells together with alterations in Erasers and Writers, suggesting a downstream upregulation of NCOA3, a nuclear transcriptional coactivator with histone acetyltransferase activity that regulates gene expression by binding to hormone receptors. Concurrently, the histone code was investigated by extracting total histone to evaluate methylation, phosphorylation and acetylation patterns, alterations in H3 and H4. H2BK120 ubiquitination was investigated by Western Blot. The observed epigenetic modifications involve DNA repair genes which are: ERCC5, LIG4, CA9 AND SERPINF1. Finally, these biological discoveries were contextualized within forensic and environmental epidemiology frameworks. Conceptually, these modifications can be considered a form of “molecular memory” of the cellular state; however, their ability to serve specifically as biomarkers of environmental exposure must be verified through controlled exposure studies and validation using biological samples. Such studies would make them useful for supplementing the assessment of causal links in civil liability cases—with potential applicability to criminal proceedings for environmental offenses, as well as in forensic thanatology and future forensic medical research.

Laboratorio di ricerca:

Mol & Cell Lab di Fisiologia, Palazzo delle Scienze, Corso Europa 26, V piano.

Telefono: +39-0103538403.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Il Neuroblastoma: epidemiologia, eterogeneità clinica e basi genetiche.	1
1.2 Il dogma della biologia e la rivoluzione dei Long Non-Coding RNA (lncRNA)..	5
1.3 L'oncosoppressore lncRNA NDM29 e il fenotipo differenziato.....	7
1.4 Principi di Epigenetica: struttura della cromatina e codice istonico.	9
1.5 Modello sperimentale: la linea cellulare SK-N-BE2.	11
1.6 Analisi dell'espressione dei geni correlati alla riparazione del DNA e all'omeostasi cellulare.	12
1.7 L'epigenetica come prospettiva emergente in ambito forense.	13
2. SCOPO DELLA TESI.....	16
3. MATERIALI E METODI.....	17
3.1 Modello cellulare SK-N-BE2: coltura e trattamento.	17
3.2 Vettori di espressione e ingegnerizzazione genetica (GFP, Puromicina, G418). ..	19
3.3 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA (Retrotrascrizione).	19
3.4 Real-time PCR.	22
3.5 Real-time PCR Array.	24
3.6 Estrazione delle frazioni istoniche totali.	25
3.7 Analisi quantitativa delle modificazioni dell'istone H3.	27
3.8 Analisi quantitativa delle modificazioni dell'istone H4.	29
3.9 Analisi dell'ubiquitinazione dell'istone H2BK120 tramite Western Blot.	32
4. RISULTATI.....	34
4.1 Caratterizzazione morfologica e cinetica di proliferazione: Mock vs S1.1.	34
4.2 Screening della stabilità della transfezione.	35
4.3 Profili di espressione genetica dei geni coinvolti nella riparazione del DNA. ...	36
4.4 Modulazione dell'espressione degli enzimi <i>Eraser</i> and <i>Writers</i>	37
4.5 Analisi biochimica delle modificazioni istoniche di H3 e H4.	39
4.6 Validazione proteica della monoubiquitinazione di H2BK120 mediante Western Blot.....	41
5. DISCUSSIONE.....	43
5.1 L'asse molecolare associato a NDM29 e NCOA3 nella differenziazione neuronale e riprogrammazione trascrizionale.	43

5.2 Dinamica del codice istonico: rimodulazione delle modificazioni istoniche, modificazioni post-traduzionali e rimodellamento della cromatina.	44
5.3 Possibili implicazioni traslazionali in medicina legale, tossicologia e neuroscienze forensi.....	46
6. CONCLUSIONI.....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	52
8. RINGRAZIAMENTI.....	56

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Neuroblastoma: epidemiologia, eterogeneità clinica e basi genetiche

Il Neuroblastoma (NB) è un tumore neuroendocrino maligno derivante dai neuroblasti, cellule precursori neuronali immature della cresta neurale destinate a formare il sistema nervoso simpatico periferico che controlla funzioni involontarie come respirazione, digestione e battito cardiaco (Schwab et al., 2003; Ponzoni et al., 2022). Essendo i neuroblasti dei precursori all'interno dei nervi, il tumore può diffondere in tutto l'organismo ed insorgere in sedi differenti, soprattutto nelle ghiandole surrenali o nei gangli nervosi lungo la colonna vertebrale a livello di collo, torace, addome e pelvi. Epidemiologicamente si configura come il cancro extracranico solido più diffuso in età neonatale, rappresentando da solo circa il 10% di tutte le neoplasie pediatriche dalla nascita ai 14 anni e configurandosi come la causa del 15% dei decessi totali per cancro nei bambini (Ponzoni et al., 2022). Secondo i dati riportati dall'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM), in Italia ogni anno vengono registrati circa 140 nuovi casi di neuroblastoma con pazienti di età media di circa 18 mesi. La prognosi è fortemente correlata all'età della diagnosi: nei pazienti di età superiore ai 5 anni affetti da forme ad alto rischio, la mortalità può superare il 50%. Per quanto concerne il sesso, l'incidenza è simile tra maschi e femmine.

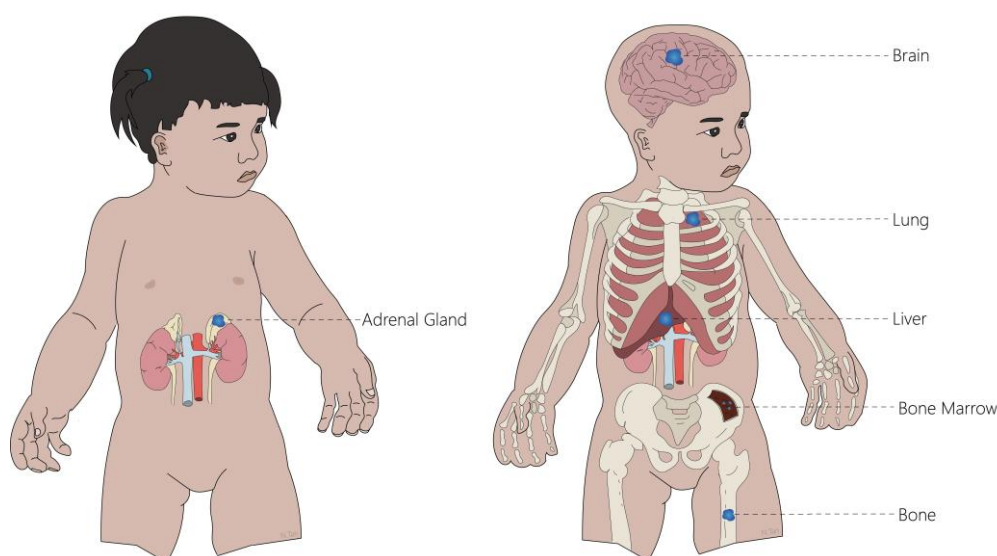


Figura 1 Siti di formazione del Neuroblastoma.

Questa forma tumorale si presenta come forma sporadica non correlata ad una storia familiare: infatti, solo nell'1-2% dei casi un bambino può ereditare dai genitori una mutazione genetica che aumenta il rischio di riscontrare la malattia nel corso della vita rispetto alla media della popolazione. La forma

ereditaria del tumore è associata a modificazioni strutturali o numeriche di geni implicati nella maturazione delle cellule nervose. Secondo quanto riportato dall'AIRC (Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro), non sono ancora noti i ruoli dei fattori ambientali come l'esposizione a determinate sostanze tossiche nella fase prenatale; invece, l'assunzione di acido folico da parte della gestante sembrerebbe essere correlata ad un effetto protettivo.

L'aspetto clinico peculiare del NB risiede nella sua estrema eterogeneità biologica, che spazia da forme capaci di andare incontro a regressione spontanea completa od a differenziazione in ganglioneuromi benigni, a forme chemioresistenti massivamente metastatiche. Tra le principali forme tumorali, comunemente nominate tumori neuroblastici periferici (TNP) si trovano:

- *Ganglioneuroma* (GN), forma differenziata di tumore benigno, curabile con asportazione chirurgica;
- *Ganglioneuroblastoma* (GNB), forma scarsamente differenziata che può manifestarsi con aree maligne tumorali associate ad aree benigne più mature. Tra i GNB si ha un'ulteriore classificazione in forma nodulare e forma mista;
- *Neuroblastoma* forma indifferenziata.

Sotto il profilo genetico, le cause scatenanti classiche comprendono l'amplificazione dell'oncogene MYCN (associata a prognosi infausta) e mutazioni attivanti del recettore tirosin-chinasico ALK (Schwab et al., 2003).

L'amplificazione di MYCN non rappresenta soltanto un marcatore prognostico sfavorevole, ma contribuisce al mantenimento di uno stato cellulare scarsamente differenziato attraverso la deregolazione di programmi trascrizionali ed epigenetici coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso simpatico.

Accanto a MYCN, il profilo citogenetico delle forme aggressive indifferenziate è tipicamente contrassegnato da estese anomalie strutturali non casuali, tra cui spiccano la delezione della regione cromosomica 1p36 e il guadagno del braccio lungo del cromosoma 17 (17q gain) (Schwab et al., 2003).

Tuttavia, tali lesioni geniche non sono sufficienti a spiegare l'intero spettro di aggressività e la plasticità fenotipica del tumore, spostando l'attenzione della comunità scientifica internazionale verso le disregolazioni epigenetiche, attualmente oggetto di intensa attività di ricerca.

I principali sintomi con cui si presenta la malattia sono mancanza di appetito, sensazione di sazietà o dolore addominale uniti a sintomi sistemici come tachicardia, ipertensione, febbre, manifestazioni emorragiche spontanee ed ecchimosi.

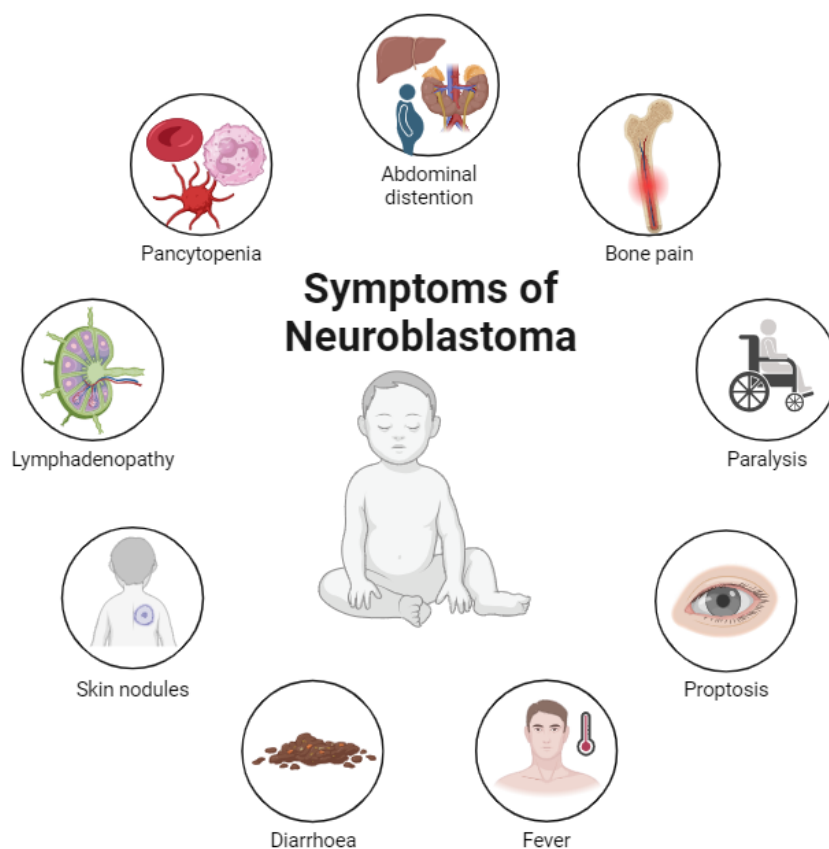


Figura 2 Sintomi correlati al Neuroblastoma.

La diagnosi viene effettuata mediante esami ematici o delle urine, valutando soprattutto le catecolamine urinarie e i loro metaboliti ovvero gli ormoni prodotti dalle cellule nervose simpatiche. Oltre agli esami sopracitati, il NB può essere identificato con tecniche di diagnostica per immagini come tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica per valutare la densità della massa tumorale oppure mediante immagini scintigrafiche con metaiodobenzilguanidina (MIBG), indispensabile per valutare le risposte alle terapie. Tramite analisi ecografica delle gestanti è possibile diagnosticare il neuroblastoma ancor prima della nascita.

In ogni caso, il gold standard diagnostico rimane la biopsia che consiste in un prelievo cellulare dalla massa tumorale da cui è possibile stabilire la tipologia di tumore e il grado di differenziamento. Da questi campioni è anche possibile effettuare l'analisi molecolare genetica che valuta il numero di copie del gene MYCN.

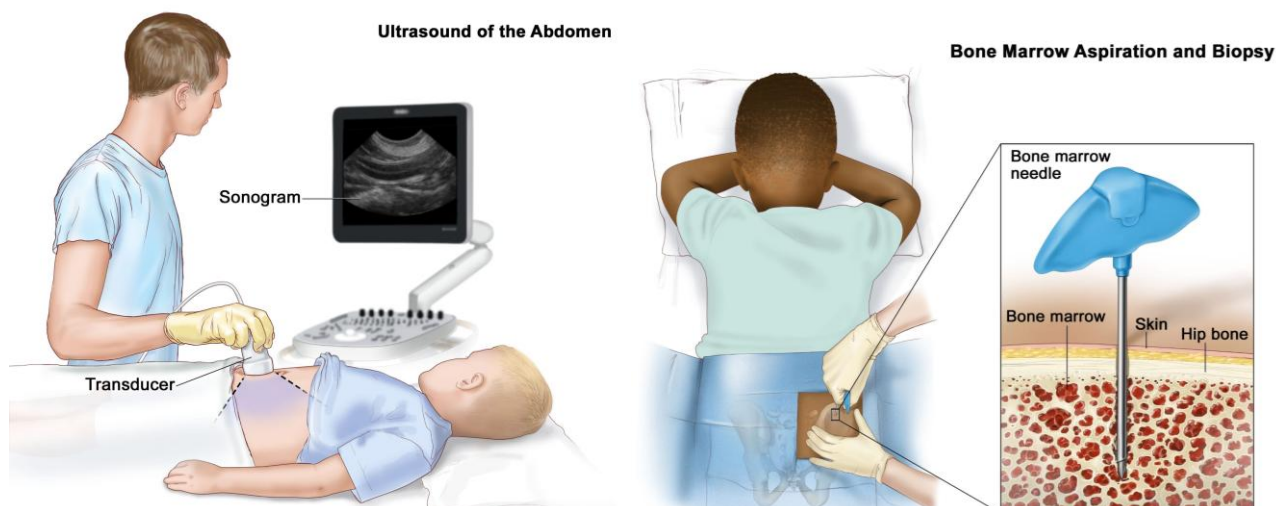


Figura 3 Tecniche di diagnosi: diagnostica per immagini e biopsia.

Per quanto concerne la stadiazione del tumore, questa risulta essenziale. Stando a quanto riportato dall'AIRC, questo passaggio viene fatto con il sistema INSS (International Neuroblastoma Staging System) risalente agli anni Novanta del secolo scorso. Secondo questa classificazione esistono quattro stadi che identificano la malattia localizzata da quella diffusa ad altri organi, fino ad arrivare allo stadio 4S in cui il NB si è diffuso a fegato, cute o midollo di pazienti di età inferiore ad un anno.

La stadiazione può essere anche effettuata mediante diagnostica per immagini seguendo l'International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS):

1. Stadio L1: forma localizzata ed operabile;
2. Stadio L2: forma localizzata e non operabile all'esordio;
3. Stadio M: malattia metastatica;
4. Stadio MS: tumore metastatico in pazienti di età inferiore di 18 mesi a livello di fegato, midollo o cute.

La diagnosi clinica più infausta del NB è inoltre associata a meccanismi di immunoevasione (immune escape), attraverso i quali le cellule neoplasiche eludono la sorveglianza dei linfociti Natural Killer (NK) riducendo l'espressione dei ligandi attivatori di superficie e rilasciando citochine immunosoppressive nel microambiente tumorale (Bottino et al., 2014).

International Neuroblastoma Staging System (INSS)	International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)
STAGE 1- tumour can be removed by surgery	L1- tumour has not spread; image-defined risk factors absent.
STAGE 2A- tumour cannot be completely removed by surgery	L2- tumour has not spread; image-defined risk factors present
STAGE 2B- tumour may or may not be completely removed by surgery; it has spread to lymph nodes	STAGE M- tumour has spread to other parts of the body
STAGE 3- tumour cannot be removed by surgery; it has spread to other areas near the tumour	STAGE MS- tumour has spread to skin, liver and/or bone marrow in patients <18 months
STAGE 4- tumour has spread to distant lymph nodes, bones, bone marrow, liver, skin.	
STAGE 4S- tumour is located where it started and it has spread only to the skin, liver, and/or bone marrow, in infants younger than one	

Figura 4 Confronto tra sistema INSS e INRGSS.

La cura del tumore, soprattutto nello stadio L1, avviene mediante ablazione chirurgica; negli stadi più avanzati invece si procede con la cura chemioterapica utilizzando il trapianto di cellule staminali emopoietiche autologhe per ridurre le dimensioni del tumore.

In seguito al trapianto, i pazienti più a rischio possono essere sottoposti a radioterapia anche con MIBG somministrato a dose superiore rispetto a quanto utilizzato al momento della diagnosi.

A scopo preventivo, vengono prescritti ai pazienti i retinoidi (composti analoghi alla vitamina A) per ridurre la probabilità di recidiva. Ad oggi, è possibile trattare il NB con cure immunoterapiche con anticorpi anti-GD2 ovvero un ganglioside presente sulla superficie delle cellule tumorali (Bottino et al, 2014).

1.2 Il dogma della biologia e la rivoluzione dei Long Non-Coding RNA (lncRNA)

Il dogma centrale della biologia molecolare ha storicamente postulato un flusso lineare di informazione in cui il DNA viene trascritto in RNA messaggero (mRNA), il quale funge da stampo per la traduzione delle proteine. Ciononostante, il sequenziamento del genoma umano ha rivelato che meno del 2% del DNA codifica effettivamente per sequenze proteiche, mentre la stragrande maggioranza del genoma viene trascritta in RNA non codificanti (ncRNA). I ncRNA si dividono in categorie strutturali classiche (tRNA, rRNA) e molecole regolatorie, a loro volta classificate in base alla lunghezza nucleotidica.

Mentre i microRNA (miRNA) sono corti filamenti (21-25 nt) deputati al silenziamento genico, i Long Non-Coding RNA (lncRNA) sono trascritti di lunghezza superiore alle 200 paia di basi (bp) privi di potenziale codificante proteico (ORF) (Rinn and Chang, 2012).

I progetti di sequenziamento e i microarray genomici hanno rivelato che il genoma trascrive un numero di lncRNA paragonabile o superiore ai geni codificanti le proteine. Molti lncRNA si trovano in regioni intergeniche e vengono definiti large intervening non-coding RNAs (lincRNA); sono stati identificati mediante specifici domini cromatinici K4-K36 tipici dei geni trascritti dalla polimerasi II. Non si tratta di semplici sottoprodotti trascrizionali ma di molecole che possono agire come componenti chiave di complessi ribonucleoproteici (RNP) modulatori dei regolatori della cromatina e classificati in tre principali categorie:

- *Decoys*: esche molecolari che si legano a proteine regolatrici o fattori di trascrizione, impedendo loro di accedere al DNA bersaglio;
- *Signal*: ruolo nella regolazione genica nello spazio e nel tempo e vie di segnalazione che esprimono l'azione dei fattori di trascrizione;
- *Scaffolds*: impalcature strutturali per assemblare fisicamente due o più complessi proteici distinti, coordinando le loro attività enzimatiche;
- *Guides*: guide necessarie per reclutare e localizzare i complessi modificatori della cromatina verso loci genomici specifici, sia in cis (prossimi al sito di trascrizione) che in trans (su cromosomi distanti).

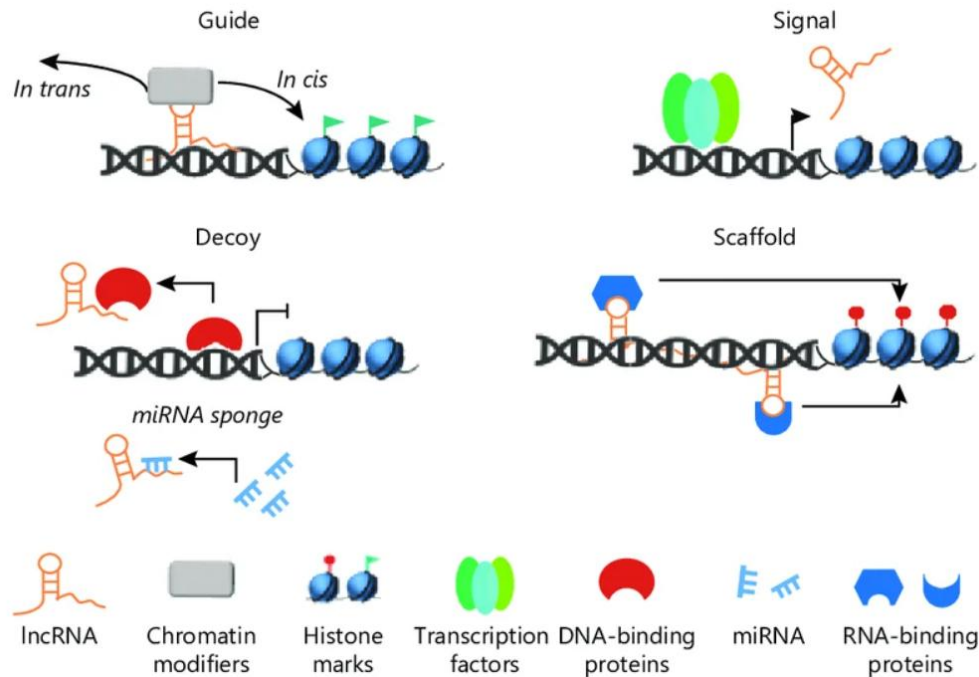


Figura 5 Diversi meccanismi di azione dei lncRNA (Coellar et al., 2021).

Secondo quanto riportato dagli autori (Rinn and Chang, 2012; Engreitz et al., 2016), l'alterazione dei lncRNA è strettamente correlata alla patogenesi di diverse malattie, in primis il cancro, e spesso la loro espressione forzata può contribuire alla progressione metastatica del tumore, rendendoli promettenti biomarcatori e bersagli terapeutici.

Recentemente è emerso che i lncRNA fungono da regolatori epigenetici partecipando alla regolazione dell'architettura nucleare, al reclutamento di complessi rimodellatori della cromatina e alla stabilità dei trascritti, contribuendo alla regolazione del destino e del differenziamento cellulare durante lo sviluppo embrionale.

Inoltre, è stata ridefinita la complessità di questi loci regolatori, dimostrando che l'attività biologica in cis dei lncRNA può prescindere dal trascritto maturo, venendo invece veicolata dall'attività simil-enhancer del promotore stesso, dall'atto fisico della trascrizione o dal processo di splicing del locus (Engreitz et al., 2016).

1.3 L'oncosoppressore lncRNA NDM29 (Neuroblastoma Differentiation Marker 29)

Nel contesto del neuroblastoma, il lncRNA NDM29 rappresenta uno dei principali regolatori molecolari studiati. La sequenza genica di questo lungo RNA non codificante è localizzata sul braccio corto del cromosoma 11 (regione 11p15.3) localizzato all'interno del primo introne del gene ASCL3 (*Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 3*). La sua trascrizione è operata in modo

specifico ed esclusivo dall'apparato della RNA polimerasi III (Massone et al., 2012; Castelnuevo et al., 2010).

Nelle cellule tumorali e ad alta proliferazione, l'espressione di NDM29 è virtualmente assente o estremamente ridotta, coerentemente con l'ipotesi di un suo ruolo di oncosoppressore (Baldini et al., 2025). Al contrario, l'espressione di NDM29 promuove un fenotipo differenziato con riduzione delle caratteristiche staminali. L'espressione di questo lncRNA in modelli sperimentali determina un drastico cambiamento fenotipico: le cellule perdono la tipica morfologia tumorale circolare ed indifferenziata per acquisire un fenotipo neuronale maturo. Questo processo è macroscopicamente e microscopicamente caratterizzato dall'arresto del ciclo cellulare e dall'estensione di lunghi neuriti e ramificazioni dendritiche.

L'over-espressione di NDM29 in linea cellulare umana di neuroblastoma induce una riprogrammazione trascrizionale da cellule tumorali verso un fenotipo neuronale. In particolare, studi sperimentali hanno evidenziato che l'up-regulation di NDM29 riduce la quota di Cellule Inizianti il Tumore (TIC), inibisce la formazione di neurosfere in vitro ed è associata ad una riduzione del potenziale tumorigenico e della crescita della massa neoplastica in vivo (Castelnuevo et al., 2010). Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato come la sovraespressione di NDM29 in cellule di neuroblastoma sia associata a un rimodellamento epigenetico caratterizzato da alterazioni della metilazione globale del DNA e delle modificazioni istoniche, evidenziando il coinvolgimento di NDM29 nella riprogrammazione epigenetica delle cellule di neuroblastoma (Baldini et al., 2025).

A livello molecolare e fisiologico, la maturazione neuronale regolata da NDM29 è strettamente coordinata con una profonda riprogrammazione dell'eccitabilità cellulare e del profilo biochimico della cellula:

- *Modulazione dei canali ionici*: la sovraespressione di NDM29 determina un incremento significativo dell'espressione e della densità dei canali ionici voltaggio-dipendenti, con particolare riferimento ai canali per il Potassio (K^+) e per il Calcio (Ca^{2+}), indispensabili per l'instaurazione delle proprietà bioelettriche neuronali (Alloisio et al., 2017).
- *Secrezione di peptidi amiloidi*: il differenziamento guidato da questo lncRNA si associa a un incremento della secrezione nel mezzo extracellulare dei peptidi amiloidi β , markers intimamente connessi alla fisiologia cellulare e ai processi di maturazione del sistema nervoso (Massone et al., 2012).
- *Soppressione della chemioresistenza* (down-regulation dei trasportatori ABC): sotto il profilo farmacologico, NDM29 esercita un ruolo terapeutico chiave inducendo una massiva down-

regulation dei trasportatori a cassetta leganti l'ATP (trasportatori ABC), tra cui spiccano la P-glicoproteina (P-gp, codificata dal gene MDR1) e la proteina di resistenza multifarmaco MRP1. Poiché queste pompe di efflusso riducono drasticamente l'efficacia dei trattamenti espellendo i farmaci chemioterapici, il loro spegnimento mediato da NDM29 ripristina la vulnerabilità della cellula neoplastica agli agenti citotossici (Castelnuovo et al., 2010).

1.4 Principi di Epigenetica: struttura della cromatina e codice istonico

L'epigenetica definisce l'insieme delle modificazioni ereditabili che alterano l'espressione genica e l'accessibilità del DNA senza modificarne la sequenza nucleotidica primaria. Nel neuroblastoma le alterazioni epigenetiche svolgono un ruolo rilevante nella progressione tumorale, contribuendo alla deregolazione dell'espressione genica, al mantenimento dello stato staminale e alla plasticità cellulare.

All'interno del nucleo cellulare il DNA è impacchettato sotto forma di cromatina, la cui unità fondamentale è rappresentata dal nucleosoma. Il nucleosoma è composto da un core proteico ottamerico costituito da due copie di ciascuno dei quattro istoni nucleari core: H2A, H2B, H3 e H4. E' presente un tetramero centrale formato da due eterodimeri H3-H4, al quale si associano successivamente due dimeri H2A-H2B, dando origine all'ottamero istonico. La stabilità globale di questo super-avvolgimento è ulteriormente garantita dall'istone linker H1, che si posiziona in corrispondenza dell'ingresso e dell'uscita del nucleosoma, contribuendo alla stabilizzazione della struttura cromatinica (Luger et al., 1997; Liu et al., 2025).

Le code N-terminali degli istoni sporgono dal core nucleosomico e sono soggette a una vasta gamma di modificazioni post-traduzionali (PTM) reversibili, la cui combinazione contribuisce a costituire il cosiddetto "codice istonico" (Jenuwein and Allis, 2001). Queste modificazioni contribuiscono a regolare in modo dinamico la transizione tra eucromatina (struttura decondensata, accessibile e trascrizionalmente attiva) ed eterocromatina (struttura compatta, inaccessibile e trascrizionalmente silente).

Il codice istonico è finemente regolato dall'azione regolata da tre classi principali di complessi proteici:

- *Writers* (scrittori): enzimi deputati all'aggiunta covalente delle PTM sugli aminoacidi target degli istoni;
- *Erasers* (cancellatori): enzimi responsabili della rimozione di tali modificazioni, ripristinando lo stato originario;

- *Readers* (lettori): proteine dotate di domini di riconoscimento specifici (es. domini chromodomain o bromodomain) capaci di riconoscere specifiche modificazioni istoniche e reclutare complessi trascrizionali o di rimodellamento della cromatina.

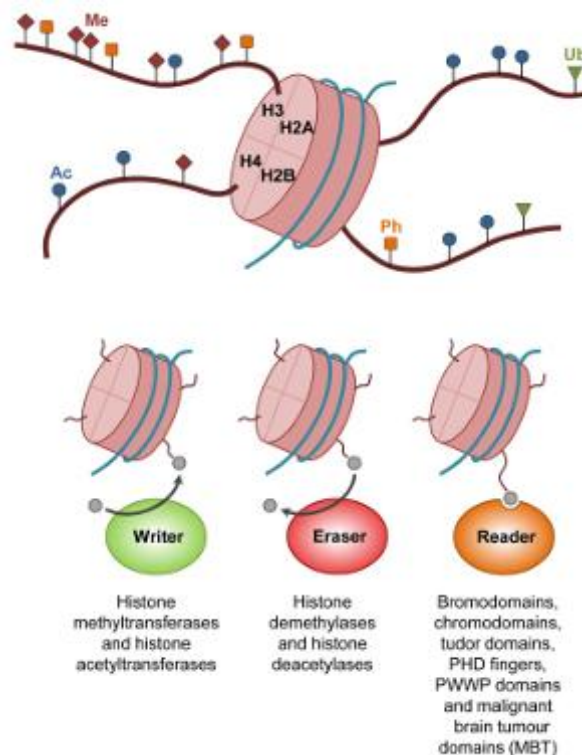


Figura 6 *Writers, erasers e reader* (Simó-Riudalbas I and Esteller, 2014).

Le principali modificazioni istoniche comprendono:

- *Acetilazione*: regolata dall'equilibrio dinamico tra l'istone acetiltrasferasi (HAT) (Writers) e l'istone deacetilasi (HDAC) (Erasers). L'aggiunta di gruppi acetile riduce la carica positiva dei residui di lisina, allentando l'interazione elettrostatica tra le code istoniche e lo scheletro fosfodiesterico del DNA a carica negativa. Questo processo favorisce un'architettura cromatinica aperta ed accessibile ai fattori di trascrizione e alla RNA polimerasi II. Al contrario, l'azione di deacetilasi come HDAC2 e HDAC9 rimuove i gruppi acetile, ripristinando le cariche positive e promuovendo la condensazione eterocromatica ed il silenziamento trascrizionale.
- *Metilazione*: catalizzata dall'istone metiltrasferasi (HMT) e rimossa dall'istone demetilasi (KDM), riguarda principalmente residui di lisina ed arginina. A differenza dell'acetilazione, la metilazione non altera la carica elettrica complessiva del nucleosoma, ma agisce come una piattaforma di reclutamento molecolare regolata da specifiche metiltrasferasi e demetilasi (Park et al., 2024). L'effetto trascrizionale della metilazione (attivazione o repressione)

dipende dal residuo specifico modificato e dal grado di metilazione (mono-, di- o tri-metilazione).

- *Fosforilazione*: aggiunta dalle chinasi istoniche e rimossa dalle fosfatasi, avviene tipicamente su residui di serina, treonina e tirosina. Introducendo cariche negative sulla coda istonica, la fosforilazione svolge un ruolo importante non solo nella regolazione trascrizionale, ma anche nei processi di risposta al danno al DNA e di condensazione dei cromosomi durante la mitosi.

L'ubiquitinazione degli istoni rappresenta una modificazione post-traduzionale di notevole ingombro sterico, dovuto all'aggiunta covalente del peptide ubiquitina (76 amminoacidi). A livello dell'istone H2B, l'aggiunta covalente di una singola molecola di ubiquitina sul residuo di Lisina 120 (H2BK120ub) è finemente regolata dall'azione di complessi ubiquitina ligasi E3 (come il dimerico RNF20/RNF40).

Anziché promuovere la degradazione proteosomiale (come avviene tipicamente per molte proteine citoplasmatiche), la monoubiquitinazione dell'istone H2B agisce come un marcatore topologico essenziale per la trascrizione attiva (Weake and Workman, 2008). La presenza di H2BK120ub altera il compattamento delle fibre cromatiniche e facilita il reclutamento dei complessi di rimodellamento nucleosomico, consentendo la progressione e l'allungamento efficiente dell'RNA Polimerasi II lungo i loci genici.

Inoltre, la monoubiquitinazione di H2BK120 rappresenta un importante mediatore del cross-talk epigenetico trans-istonico. La sua presenza favorisce la successiva metilazione di H3K4 e H3K79, modificazioni generalmente associate alla trascrizione attiva. Nel contesto del presente lavoro, tale meccanismo potrebbe contribuire all'attivazione dei programmi differenziativi associati all'over-espressione di NDM29 (Strikoudis et al., 2017; Northam and Trujillo, 2016).

1.5 Modello sperimentale: la linea cellulare SK-N-BE2

Per la valutazione dei cambiamenti epigenetici associati alla sovra-espressione di NDM29 nel NB, è stata impiegata come modello sperimentale la linea cellulare umana SK-N-BE2. Quest'ultima è stata originariamente isolata nel 1972 da un aspirato midollare di un paziente pediatrico affetto da neuroblastoma disseminato refrattario ai trattamenti chemio-radioterapici standard.

La linea cellulare deriva da una lesione metastatica di NB umano ed è ampiamente riconosciuta in letteratura come uno dei principali modelli sperimentali dei neuroblastomi ad alto rischio e scarsamente differenziati. Le principali caratteristiche delle cellule in questione sono infatti:

- Amplificazione dell'oncogene MYCN, marcatore biologico associato a prognosi sfavorevole ed a elevata aggressività tumorale.

- Fenotipo indifferenziato e maligno contraddistinto da elevata capacità proliferativa e spiccata chemio-resistenza.

Tali peculiarità rendono SK-N-BE2 uno dei modelli in vitro maggiormente utilizzati per lo studio delle forme tumorali pediatriche ad alto rischio (Baldini et al., 2021; Garbati et al., 2020; Alloisio et al., 2017; Gavazzo et al., 2011).

Per valutare gli effetti dell'over-espressione di NDM29 e le modificazioni epigenetiche associate, la linea cellulare parentale è stata sottoposta ad ingegnerizzazione genetica tramite trasfezione stabile. Tale processo ha portato alla generazione di due cloni derivati dalla medesima linea parentale messi a confronto diretto nel corso dello studio:

- (A) *Cellule di controllo* (Mock): trasfettate in modo stabile con il vettore plasmidico “vuoto” (pEGFP-N1) ovvero privo della sequenza codificante per NDM29. Questo clone cellulare rappresenta il controllo negativo fondamentale per escludere eventuali alterazioni fenotipiche o molecolari causate dal semplice processo di trasfezione o dal mantenimento della selezione antibiotica.
- (B) *Clone sovraesprimente NDM29* (S1.1): trasfettato con un vettore contenente la sequenza di NDM29 sotto il controllo di un promotore forte (pEGFP-N1-NDM29). Nel clone S1.1 è stato ottenuto un aumento stabile e significativo dei livelli del lncRNA pari ad un incremento di circa 7.5 volte rispetto ai livelli basali delle cellule Mock.

La scelta di utilizzare cloni stabilmente trasfettati ha consentito di valutare modificazioni fenotipiche ed epigenetiche che richiedono un'espressione prolungata di NDM29, comprese variazioni del profilo delle modificazioni istoniche e dell'assetto trascrizionale.

1.6 Analisi dell'espressione dei geni correlati alla riparazione del DNA e all'omeostasi cellulare

I meccanismi di riprogrammazione epigenetica e transizione verso uno stato cellulare differenziato possono essere associati al controllo della stabilità genomica e al rimodellamento del microambiente tumorale. Nel contesto del Neuroblastoma, l'acquisizione di un fenotipo meno aggressivo è associata al controllo della proliferazione, al miglioramento dei sistemi di riparazione del DNA ed alla modulazione dei pathway coinvolti nel mantenimento della staminalità e dell'adattamento metabolico all'ipossia. Tra i geni coinvolti in questi processi figurano SERPINF1, CA9, LIG4 ed ERCC5, che codificano rispettivamente per fattori secreti, enzimi coinvolti nell'omeostasi del pH e proteine implicate nei meccanismi di riparazione del DNA.

La progressione tumorale e l'aggressività delle cellule staminali del NB sono influenzate dalla loro capacità di interagire con la nicchia microambientale:

- *SERPINF1* (Serpin Family F Member 1): codifica per il fattore PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), una glicoproteina multifunzionale. Oltre alla nota attività anti-angiogenica, PEDF contribuisce alla regolazione del microambiente neoplastico, influenzando la progressione tumorale, i processi di invasione e la plasticità cellulare associata al mantenimento dello stato staminale (Song et al., 2023).
- *CA9* (Carbonic Anhydrase IX): è un enzima transmembrana appartenente alla famiglia delle anidrasi carboniche, la cui espressione è direttamente guidata dai fattori di risposta all'ipossia come HIF-1 α . CA9 catalizza la reversibile idratazione dell'anidride carbonica in bicarbonato e protoni, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio del pH intracellulare ed extracellulare (Said et al., 2010). Tale meccanismo favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali all'interno di nicchie microambientali ipossiche e acide, contribuendo alla chemioresistenza e alla capacità invasiva (Lučiūnaitė et al., 2025).

Il mantenimento della stabilità genomica e l'efficienza dei sistemi di riparazione del DNA sono processi che possono contribuire alla transizione da un fenotipo neoplastico indifferenziato a uno stato più differenziato. Alterazioni o deficit in queste vie di segnalazione aumentano la suscettibilità al danno genomico e all'accumulo di mutazioni:

- *LIG4* (DNA Ligase 4): rappresenta una componente enzimatica cruciale nel pathway di giunzione delle estremità non omologhe (canonical Non-Homologous End Joining, c-NHEJ). LIG4 catalizza il passaggio finale di sigillatura delle rotture a doppio filamento del DNA (Double-Strand Breaks, DSBs), contribuendo al ripristino della continuità del DNA e riducendo il rischio di riarrangiamenti cromosomici (Newman et al., 2015).
- *ERCC5* (Excision Repair Cross-Complementing Group 5/XPG): codifica per un'endonucleasi fondamentale del sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, NER). ERCC5 agisce effettuando l'incisione al 3' della lesione e permettendo la successiva rimozione del tratto danneggiato e la sintesi del nuovo filamento di DNA (Zuo et al., 2022; Tsutakawa et al., 2020).

1.7 L'epigenetica come prospettiva emergente in ambito forense

L'epigenetica forense rappresenta un'estensione delle metodiche tradizionali di genetica forense, con l'obiettivo di utilizzare variazioni epigenetiche per rispondere a quesiti che non possono essere risolti mediante il solo profilo genetico convenzionale. Tale metodica è rappresentata dall'analisi degli Short

Tandem Repeats (STR) o dei Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), i quali costituiscono marcatori informativi ma intrinsecamente statici. Tra le applicazioni maggiormente studiate rientrano l'identificazione del tessuto di origine, la stima dell'età biologica e la discriminazione tra gemelli monozioti (Vidaki and Kayser, 2018).

In particolare, i pattern di metilazione del DNA sono stati studiati per l'identificazione dell'origine tissutale e dei fluidi biologici, rappresentando un possibile strumento complementare alle metodiche forensi convenzionali (Kader et al., 2020; Gerra et al., 2024). L'interesse verso tali marcatori deriva dalla loro capacità di riflettere l'interazione tra patrimonio genetico, sviluppo embrionale ed esposizioni ambientali, costituendo un possibile ponte biologico tra genoma e ambiente. In questo contesto, la cromatina agisce come una matrice sensibile in grado di registrare gli eventi fisiopatologici pre-mortem, traducendo gli stress microambientali e la presenza di molecole citotossiche in alterazioni strutturali persistenti, quali le modificazioni post-traduzionali degli istoni (PTM) e la rimodulazione dell'espressione di RNA non codificanti.

Questa "memoria ambientale", riflessa nelle modificazioni epigenetiche, apre potenziali scenari applicativi in ambito investigativo e giudiziario:

1. *Valutazione della responsabilità civile e danno ambientale* (nesso di causa): in procedimenti giudiziari legati a zone industriali o territori contaminati, l'analisi delle modificazioni epigenetiche del tessuto tumorale neuroblastico può fungere da potenziale biomarcatore di esposizione ambientale. Le caratterizzazioni tumorali epigenetiche, che includono la riprogrammazione dei marker istonici e la regolazione epigenetica guidata da ncRNA, sono oggi proposte come potenziali biomarcatori di esposizione ambientale e di rischio biologico. Sebbene, allo stato attuale delle conoscenze, non consentano di dimostrare autonomamente il nesso causale individuale, esse possono contribuire, insieme ai dati clinici, epidemiologici e tossicologici, alla ricostruzione del rapporto tra esposizioni ambientali e alterazioni biologiche osservate, rappresentando un promettente ambito di ricerca per la medicina legale e la tossicologia forense.
2. *Medicina legale clinica, oncologica e responsabilità medica*: i livelli di espressione dei lncRNA come NDM29 e le modificazioni istoniche a carico dei nucleosomi (es. la monoubiquitinazione dell'istone H2B sulla lisina 120, H2BK12Oub, o l'acetilazione/metilazione di H3 e H4) possono influenzare la risposta del neuroblastoma e di altre neoplasie del sistema nervoso ai protocolli chemioterapici. In casi di decessi pediatrici sospetti, la quantificazione post-mortem di molecole quali NDM29 unitamente al profilo di compattamento della cromatina potrebbe, in prospettiva, contribuire alla ricostruzione del profilo di farmacoresistenza del tumore, fornendo un elemento biologico aggiuntivo da

integrare con la documentazione clinica, istopatologica e terapeutica nell'ambito della valutazione medico-legale.

3. *Diagnostica post-mortem e tanatologia molecolare*: l'analisi dei profili di degradazione e di espressione dell'RNA stabile (come i lncRNA) e la stabilità dei pattern di metilazione e di ubiquitinazione istonica offrono potenziali elementi predittivi per la caratterizzazione bio-cronologica dei tessuti prelevati post-mortem e per l'autopsia molecolare. Questi potrebbero essere potenzialmente utili per l'identificazione di neoplasie misconosciute e, in prospettiva, per contribuire alla stima dell'intervallo post-mortem (PMI) anche in campioni biologici in cui l'RNA totale risulta parzialmente degradato.
4. *Neuroetica ed imputabilità penale*: nei casi di sopravvissuti a tumori del sistema nervoso che presentano esiti neurologici cronici o alterazioni cognitive comportamentali stabili, lo studio dell'interazione ambiente-epigenoma e delle neuroplasticità guidata da ncRNA e modificazioni della cromatina può fornire uno spunto per discutere la vulnerabilità acquisita. Tali analisi possono offrire spunti di riflessione sul possibile ruolo delle informazioni biologiche nei procedimenti di valutazione della capacità di intendere e di volere, tema già affrontato nel dibattito giuridico italiano anche a seguito del caso Bayout. La sentenza Bayout costituisce un precedente storico nella giurisprudenza penale europea per l'introduzione delle neuroscienze e della genetica molecolare nella valutazione dell'imputabilità. Nel 2009, la Corte d'Assise d'appello di Trieste ha riconosciuto un'ulteriore riduzione della pena all'imputato Abdelmalek Bayout sulla base di una perizia neuroscientifica e genetica. La consulenza tecnica evidenziò la presenza di polimorfismi genetici a rischio (tra cui la variante a bassa attività del gene MAOA, noto come "gene guerriero"), considerati fattori di vulnerabilità genetica capaci di rendere il soggetto maggiormente incline a reazioni aggressive in risposta a situazioni di stress o provocazione ambientale. L'integrazione dei dati neuro-epigenetici si configura quindi come un potenziale supporto tecnico volto a caratterizzare scientificamente l'impatto dei danni neurologici strutturali sul piano neurocognitivo e comportamentale.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi sperimentale si colloca nell'ambito delle ricerche traslazionali sul Neuroblastoma e si propone di caratterizzare alcune modificazioni epigenetiche associate all'over-espressione dell'IncRNA NDM29, valutandone inoltre le possibili implicazioni in ambito medico-legale e forense.

Specificamente, lo studio si articola nei seguenti punti sperimentali ed analitici:

1. *Caratterizzazione morfologica e fenotipica*: verificare l'impatto dell'espressione stabile di NDM29 sulla cinetica di proliferazione cellulare e sui cambiamenti morfologici tridimensionali della linea di neuroblastoma umano SK-N-BE2, valutando l'effettiva acquisizione di un fenotipo neuronale più differenziato.
2. *Screening enzimatico epigenetico (PCR Array)*: identificare in modo sistematico le variazioni trascrizionali a carico di 180 geni codificanti per enzimi modificatori istonici e rimodellatori della cromatina indotte dal differenziamento cellulare.
3. *Analisi del codice istonico (H3 e H4)*: estrarre biochimicamente la frazione istonica H3 dalle cellule Mock e S1.1 per analizzare i principali pattern di metilazione e acetilazione, integrando e confrontando i dati con le modificazioni epigenetiche determinate per l'istone H4.
4. *Ubiquitinazione di H2BK120*: analizzare mediante tecnica Western Blot i livelli di monoubiquitinazione della lisina 120 dell'istone H2B, valutandone il possibile coinvolgimento nell'organizzazione della cromatina e nei meccanismi di trascrizione e riparazione del DNA associati al differenziamento cellulare tumorale.
5. *Elaborazione del modello forense*: strutturare un quadro teorico-argomentativo che colleghi la plasticità epigenetica osservata nel neuroblastoma alla diagnostica medico-legale, valutando criticamente il potenziale contributo dei biomarcatori epigenetici nell'interpretazione di potenziali problematiche di interesse medico-legale e ambientale.

3. MATERIALI E METODI

Kit/reagente	Produttore	Codice	Applicazione sperimentale
TRIzol reagent	Thermo Fisher Scientific	/	Estrazione RNA totale da pellet cellulari
Chromo4™ System	Bio-Rad	/	Real Time PCR
RT ² SYBR Green mastermix	QIAGEN	#330502	Real-time PCR Array
EpiQuik™ Total histone extraction kit	EpigenTek	#OP-0006	Estrazione frazioni istoniche totali
EpiQuik™ Histone H3 modification multiplex assay	EpigenTek	#P-3100	Quantificazione colorimetrica modificazioni H3
EpiQuik™ Histone H4 modification multiplex assay	EpigenTek	#P-3102	Quantificazione colorimetrica modificazioni H4

Tabella 1 Kit commerciali e reagenti chiave.

3.1 Modello cellulare SK-N-BE2: coltura e trattamento

Per il mantenimento in coltura delle cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE2, sia nella variante di controllo che in quella ingegnerizzata, è stato utilizzato come terreno di coltura basale l'RPME 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*). Questo terreno sintetico è ampiamente utilizzato per sostenere la crescita e la vitalità di linee cellulari umane in sospensione e in monostrato. Contiene amminoacidi essenziali, vitamine, sali inorganici e glucosio, che rappresenta una delle principali fonti energetiche per le cellule in coltura; inoltre, è presente un sistema tampone a base di bicarbonato di sodio per il mantenimento del pH fisiologico.

Per garantire un microambiente ottimale alla proliferazione e all'adesione cellulare, il terreno basale RPMI 1640 è stato opportunamente supplementato con i seguenti additivi:

- *10% di Siero Fetale Bovino* (FBS, Fetal Bovine Serum): rappresenta una miscela complessa e insostituibile di fattori di crescita, ormoni, lipidi, proteine di adesione (come la fibronectina) ed oligoelementi. L'FBS fornisce numerosi fattori di crescita e segnali mitogenici che

favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione cellulare in vitro, oltre ad esercitare un effetto protettivo nei confronti dello stress meccanico e delle variazioni osmotiche.

- *2 mM di L-Glutammina*: un amminoacido fondamentale che agisce come fonte primaria di azoto per la sintesi di nucleotidi e peptidi, nonché come importante substrato metabolico che, attraverso la glutaminolisi, alimenta il ciclo degli acidi tricarbossilici per far fronte all'elevato metabolismo energetico delle cellule tumorali.
- *Miscela di antibiotici* (100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomycin): aggiunta allo scopo di prevenire contaminazioni batteriche accidentali della coltura. La penicillina agisce inibendo la sintesi della parete cellulare dei batteri Gram-positivi, mentre la streptomycin interferisce con la sintesi proteica dei batteri Gram-negativi legandosi alla subunità ribosomiale 30S.

Tutte le linee cellulari (Mock e S1.1) sono state mantenute in condizioni ambientali controllate all'interno di un incubatore termostatico a 37 °C, con un'atmosfera umidificata e satura al 5% di CO₂. La presenza del 5% di anidride carbonica consente di interagire con il tampone bicarbonato presente nel terreno RPMI 1640, mantenendo il pH della coltura stabile all'interno del range fisiologico (pH 7,2 – 7,4).

Per mantenere la selezione dei cloni stabilmente trasfettati nel tempo, il terreno di coltura è stato integrato con una combinazione selettiva di due antibiotici:

- *Geneticina* (G418, 200 µg/mL): antibiotico selettivo per la resistenza conferita dal gene neo-presente nel costrutto plasmidico pEGFP-N1.
- *Puromicina* (0,5 µg/mL): impiegata per rafforzare la pressione selettiva sui cloni stabilmente trasfettati.

Componente/reagente	Concentrazione finale	Ruolo sperimentale
RPMI 1640	Terreno basale	Terreno sintetico basale (amminoacidi, vitamine, glucosio, tampone bicarbonato)
Siero Fetale Bovino (FBS)	10%	Fattori di crescita, ormoni, lipidi, proteine di adesione e protezione da stress
L-Glutammina	2 mM	Fonte di azoto e substrato per la glutaminolisi

Penicillina	100 U/mL	Prevenzione contaminazioni batteriche (↓ gram-positivi)
Streptomicina	100 µg/mL	Prevenzione contaminazioni batteriche (↓ gram-positivi)
Geneticina (G418)	200 µg/mL	Agente selettivo per il gene neo
Puromicina	0.5 µg/mL	Pressione selettiva

Tabella 2 Terreni di coltura e selezione cellulare.

3.2 Vettori di espressione e ingegnerizzazione genetica (GFP, Puromicina, G418)

Al fine di studiare gli effetti biologici dell'espressione di NDM29, è stato utilizzato un vettore plasmidico contenente la sequenza codificante per la eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), che consente l'identificazione delle cellule trasfettate mediante microscopia a fluorescenza. La trasfezione stabile è stata condotta mediante l'ausilio di polietilenimmina (PEI), impiegando due differenti costrutti plasmidici:

- *Cellule Mock* (gruppo di controllo): cellule SK-N-BE2 stabilmente trasfettate con il vettore plasmidico vuoto pEGFP-N1, privo della sequenza codificante per NDM29.
- *Cellule S1.1* (campione in esame): cellule SK-N-BE2 stabilmente trasfettate con il medesimo vettore plasmidico contenente la sequenza genica codificante per NDM29 (pEGFP-N1-NDM29).

Per consentire la selezione, l'isolamento clonale e la distinzione in coltura tra le cellule trasfettate con il vettore sperimentale e quelle di controllo, sono stati integrati due geni di resistenza agli antibiotici:

- *Geneticina* (G418): il gene di resistenza per la geneticina è presente nel backbone plasmidico; di conseguenza, la resistenza a G418 è espressa ed attiva sia nelle cellule Mock sia nelle cellule S1.1, garantendo l'eliminazione delle cellule non trasfettate sensibili alla geneticina.
- *Puromicina*: la sequenza di resistenza per la puromicina è stata inserita all'interno della cassetta d'espressione specifica dell'IncRNA NDM29. La puromicina è stata impiegata durante la fase di selezione clonale per consentire l'isolamento delle cellule S1.1 resistenti, eliminando le cellule prive del gene di resistenza.

3.3 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA (Retrotrascrizione)

L'RNA totale è stato estratto adottando tutte le precauzioni necessarie per evitare la contaminazione da RNasi, impiegando esclusivamente DPI, puntali e provette Eppendorf certificate RNase-free. I pellet cellulari di Mock e S1.1, raccolti in triplicato biologico, sono stati risospesi in 1 mL di reagente

TRIzol (Thermo Fisher Scientific), un sistema monofasico di fenolo e guanidina isotiocianato. Dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente per consentire la completa lisi cellulare e la dissociazione dei complessi nucleoproteici, sono stati addizionati 200 μ L di cloroformio (CHCl_3). La miscela è stata agitata vigorosamente mediante vortex per 15 secondi, incubata a temperatura ambiente per 15 minuti e successivamente centrifugata a 12.000 rcf per 15 minuti alla temperatura costante di 4°C.

La centrifugazione permette la separazione netta dell'omogeneizzato in tre fasi distinte:

1. Una *fase superiore* acquosa incolore, contenente la maggior parte dell'RNA totale.
2. Una *fase intermedia* (interfase), contenente il DNA genomico.
3. Una *fase inferiore* organica (fenolo-cloroformio), contenente le proteine cellulari.

La fase acquosa superiore è stata accuratamente trasferita in una nuova eppendorf sterile. L'RNA è stato fatto precipitare mediante l'aggiunta di 500 μ L di isopropanolo freddo, dopo delicata miscelazione e incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. A seguito di una centrifugazione a 12.000 rcf per 10 minuti a 4°C, il surnatante è stato rimosso e il pellet di RNA ottenuto è stato lavato con 1 mL di etanolo freddo al 75% v/v. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 7.500 rcf per 5 minuti a 4°C, l'etanolo residuo è stato completamente rimosso e il pellet è stato lasciato evaporare brevemente all'aria prima di essere risospeso in 20 μ L di acqua *RNase-free*.

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state valutate mediante spettrofotometro NanoDrop attraverso la misura dell'assorbanza a 260 e 280 nm. La purezza dei campioni è stata validata verificando che il rapporto di assorbanza A_{260}/A_{280} (correlato alla contaminazione proteica) fosse compreso tra 1.7 e 2.0 (accettabile anche da 1.5).

$$\frac{40 * (OD_{260} - OD_{300}) * 133}{1000}$$

Il fattore di conversione per l'RNA è 40, mentre per il DNA 50. 133 corrisponde al fattore di diluizione dell'RNA nell'acqua, usando 3 μ L di RNA. Il denominatore invece serve per ottenere la concentrazione in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quindi è necessario convertire i mL in μL .

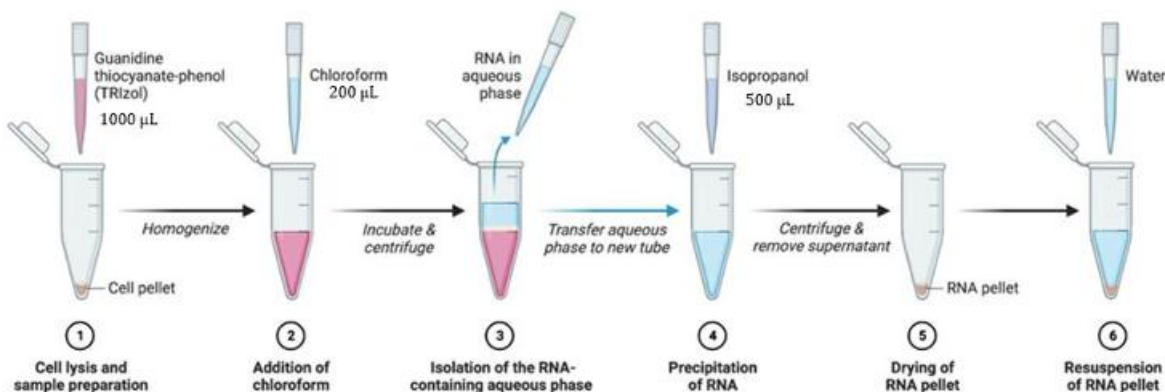


Figura 7 Schema procedurale del protocollo per l'estrazione dell'RNA.

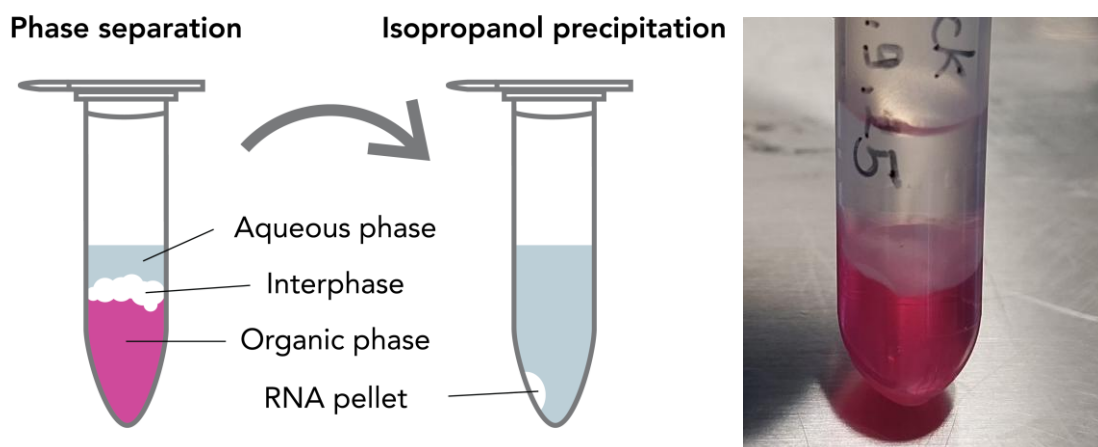


Figura 8 Separazione delle fasi per l'estrazione dell'RNA. A sinistra rappresentazione schematica, a destra provetta analizzata in laboratorio.

Per effettuare la retrotrascrizione ovvero la sintesi del DNA complementare (cDNA), è stato aggiunto un volume totale di 10 µL costituito da RNA, acqua e 1 µL di poliT e si è sottoposto il tutto ad un programma a 70°C per 5 minuti con hold a 4°C per estendere bene l'RNA. Successivamente si sono aggiunti in ogni eppendorf 10 µL di MIX composto da: buffer (4 µL), acqua RNasi free (3.5 µL), dNTP (1 µL), MULV (0.5 µL) e Ribolock (1 µL). Infine, si è avviata la retrotrascrizione sottoponendo il campione a 42°C per un'ora ed a 70°C per 10 minuti con hold a 4°C, ottenendo un filamento di cDNA a cui sono stati aggiunti 80 µL di acqua da DNA.

Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MuLV RT, è una trascrittasi inversa, che è in grado di sintetizzare il DNA utilizzando l'RNA come modello; viene comunemente usato data anche la vasta gamma di applicazioni ed è stato anche tra i primi RT scoperti (Oscorbin and Filipenko, 2021).

RiboLock, invece, è una proteina ricombinante proveniente da un ceppo di *E. Coli* che esprime un inibitore della RNasi nei mammiferi; è quindi in grado di inibire l'attività delle RNasi A, B e C, legandole in un modello non competitivo (Munro et al., 2023).

3.4 Real-time PCR

L'analisi quantitativa dell'espressione dei geni coinvolti nella modulazione epigenetica è stata effettuata utilizzando la tecnica della Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) mediante amplificazione specifica dei target di interesse, ottimizzando il caricamento manuale dei campioni per il confronto diretto tra la linea cellulare ingegnerizzata (S1.1) e il relativo controllo (Mock). Le reazioni qPCR sono state eseguite in quadruplicato per ogni campione utilizzando il sistema Chromo4™ (Bio-Rad) con 1× IQ™ SYBR Green SuperMix.

Nello specifico, sono state preparate reazioni di amplificazione specifiche per ciascun target molecolare analizzato impiegando diluizioni seriali dei cDNA e specifici geni di housekeeping per la normalizzazione interna dei dati. Il disegno sperimentale ha previsto l'impiego dei seguenti geni e relative diluizioni:

- *GAPDH* (diluizione 1:10), utilizzato come gene di riferimento costitutivo.
- *NDM29* (diluizione 1:5), per la quantificazione diretta del livello di espressione dell'lncRNA target.
- *Geni coinvolti nei processi di riparazione del DNA* (diluizione 1:5): ERCC5, LIG4, CA9 e SERPINF1 per valutare l'effetto della modulazione di NDM29 sulla modulazione dei pathway di riparazione del DNA, dell'adattamento allo stress microambientale e del fenotipo staminale.

Per ciascun gene sono stati allestiti pozzetti di controllo negativo senza stampo per verificare l'assenza di contaminazioni e di eventuali prodotti di amplificazione aspecifici. I campioni sperimentali (Mock e S1.1) sono stati caricati in replicati per valutare la riproducibilità intrinseca della tecnica. Ad un volume di 5 µL di cDNA per ogni campione, sono stati aggiunti 7.5 µL di MIX preparato in apposita eppendorf (buffer, Taq polimerasi, SYBR Green e dNTPS), 0.5 µL di primer mix (contenente 80 µL di acqua e 10 µL di ogni primer) e 2 µL di acqua. Il cDNA è stato aggiunto in un volume di 5 µL partendo però dai diversi fattori di diluizione sopracitati.

Il SYBR Green è un fluoroforo che si lega al DNA a doppio filamento e consente, in base alla fluorescenza espressa, di quantificare gli amplificati ottenuti. Il SYBR Green è in grado di legarsi al solco minore del doppio filamento di DNA ed emettere luce nel verde ($\lambda=520-530$ nm) che viene

percepita da un fluorimetro in maniera proporzionale alla quantità dell'amplificato (Ponchel et al., 2003).

Componente per ogni campione	Quantità (μL)
cDNA	5
Mix	7.5
Primer mix	0.5
Acqua	2

Tabella 3 Componenti e volumi rispettivi qPCR.

Gene	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
GAPDH	gAA gAT ggT gAT ggg ATT TC	gAA ggT gAA ggT Cgg AgT C
NDM29	ggC Agg Cgg gTT CgT T	CCA CgC CTg gCT AAg TTT Tg
ERCC5	gAC AAg CCA TCA AAA CTg CCT	AAC TTg gg TAAg ACT ggg TAg T
LIG4	gCT ggg ATT CTC Tgg TTC ACA	AgC ggT gAT gAA TCT TCT CgT T
CA9	Agg gTg TCA TCT ggA CTg TgT	ggg TgT ggA gCT gCT TAg CA
SERPINF1	TgA Agg Cg AAgT CAC CAA gTC	gAT CTT gCT AAA gTC Tgg TgA ATC AA

Tabella 4 Sequenze delle coppie di primer usati per l'analisi qPCR.

La corsa è stata eseguita impostando il seguente profilo termico programmato sul termociclatore:

1. *Denaturazione iniziale ed attivazione della polimerasi*: 95.0°C per 3 minuti (Step 1).
2. *Ciclo di amplificazione* (ripetuto per 40 cicli complessivi):
 - Denaturazione: 95.0°C per 5 secondi (Step 2).
 - Appaiamento (annealing) ed estensione: 60.0°C per 30 secondi (Step 3), fase in cui è stata programmata l'acquisizione della fluorescenza.
 - GOTO: ritorno allo Step 2 per un totale di 39 ripetizioni successive oltre al primo ciclo.

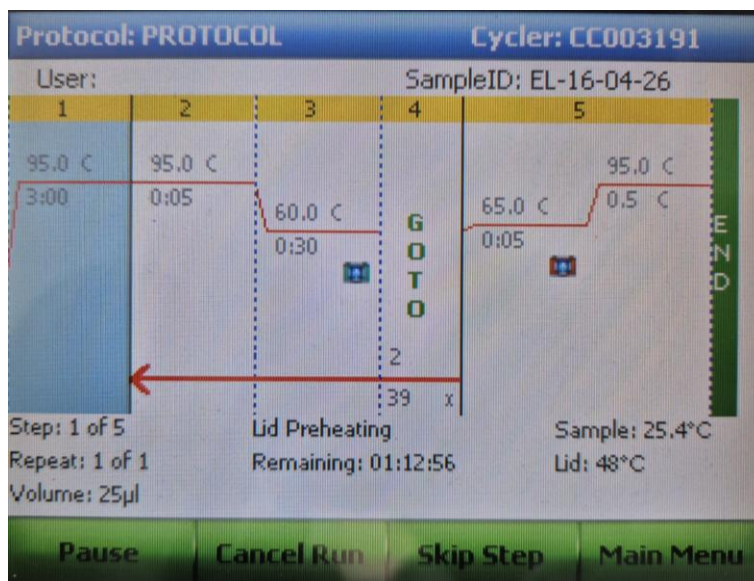


Figura 9 Profilo di amplificazione qPCR.

3. *Analisi della curva di fusione (Melting Curve)*: al termine dei cicli di amplificazione, il protocollo ha previsto una rampa termica finale partendo da 65.0°C per 5 secondi (Step 5) fino a 95.0°C con incrementi continui (acquisizione finale a 95.0°C per 0.5 secondi) per verificare la specificità del prodotto amplificato e l'assenza di prodotti aspecifici.

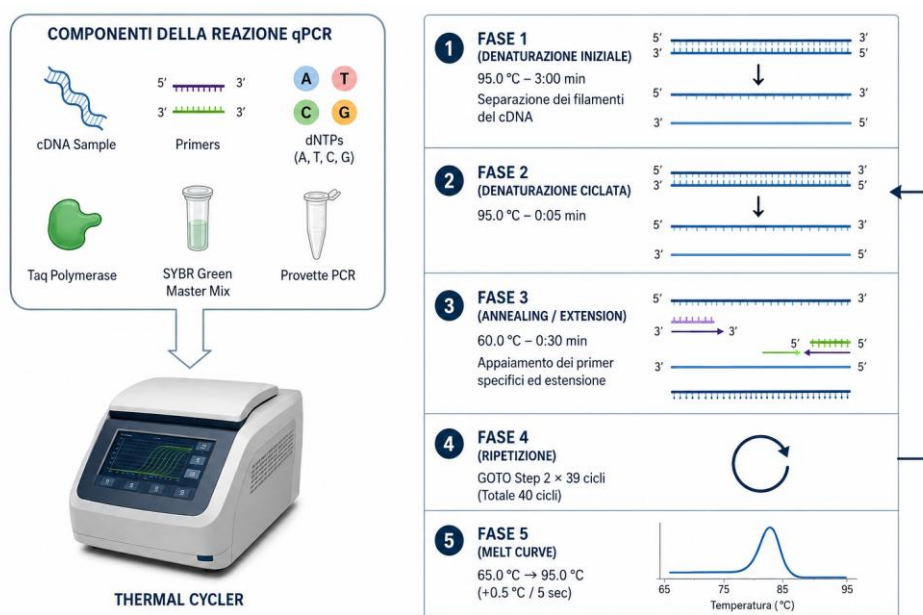


Figura 10 Schema procedurale Real-Time PCR.

3.5 Real-time PCR Array

La Real-time PCR Array è stata eseguita utilizzando un sistema CFX96 Real-Time System dotato di termociclatore C1000 (Bio-Rad, Milano, Italia) e con il reagente RT² SYBR Green Mastermix

(QIAGEN, 330502). Le condizioni di termociclaggio sono state impostate secondo le indicazioni del produttore:

- A. Denaturazione iniziale a 95 °C per 10 minuti;
- B. 40 cicli a 95 °C per 15 secondi ed a 60 °C per 60 secondi.

I dati relativi all'espressione genica sono stati analizzati mediante il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Per la normalizzazione sono stati utilizzati i seguenti cinque geni di riferimento housekeeping:

- β -2-microglobulina (B2M);
- Ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT1);
- Proteina ribosomiale L13a (RPL13A);
- Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH);
- β -actina (ACTB).

Una variazione statisticamente significativa dell'espressione genica è stata definita come un “fold-change” superiore a 1,4 (corrispondente a una variazione di $\log_2$ pari a +0,5) o inferiore a 0,7 (corrispondente a una variazione di $\log_2$ pari a -0,5), con un valore $p < 0,05$.

3.6 Estrazione delle frazioni istoniche totali

L'estrazione degli istoni totali dalle linee cellulari in esame (Mock e S1.1) è stata eseguita utilizzando il kit EpiQuik™ Total Histone Extraction Kit (EpigenTek, #OP-0006). Il protocollo consente l'isolamento delle proteine istoniche attraverso una procedura di lisi sequenziale a freddo, finalizzata a preservare le modificazioni post-traduzionali presenti negli istoni.

Il processo operativo si articola nelle seguenti fasi:

1. *Raccolta e pre-lisi cellulare:*
 - Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti a 4°C per ottenere il pellet cellulare.
 - Il pellet è stato risospeso in Pre-Lysis Buffer 1X (preparato diluendo il buffer 10X in acqua distillata in rapporto 1:10) applicando un volume di 1 mL di tampone ogni 10^7 cellule.
 - La sospensione viene lasciata incubare in ghiaccio per 10 minuti sotto delicata agitazione per favorire la permeabilizzazione cellulare e la separazione della frazione citoplasmatica (contenuta nel supernatante) dai nuclei integri (che precipitano nel pellet).

- Si procede a centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C (o a 10.000 rpm per 1 minuto se operata in micro-provette da 1.5–2 mL) e il supernatante viene rimosso.

2. Lisi nucleare ed estrazione:

- Il pellet nucleare viene risospeso in 3 volumi di Lysis Buffer (circa 200 μ L ogni 10^7 cellule o 100 mg di tessuto) e incubato in ghiaccio per 30 minuti.
- La sospensione viene centrifugata a 12.000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il supernatante, contenente le proteine istoniche acido-solubili estratte, è stato recuperato e trasferito in una nuova provetta.

3. Bilanciamento del pH e stoccaggio:

- È stato preparato il Balance-DTT Buffer addizionando la DTT Solution al Balance Buffer in un rapporto di 1:500.
- Vengono addizionati immediatamente 0.3 volumi di Balance-DTT Buffer al supernatante acido recuperato per neutralizzare il pH dell'estratto.
- La quantificazione proteica dell'estratto istonico totale è stata determinata mediante saggio Bradford, utilizzando la sieralbumina bovina (BSA) come standard di riferimento.
- I campioni sono stati suddivisi in aliquote e conservati a -80°C per lo stoccaggio a lungo termine, evitando cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

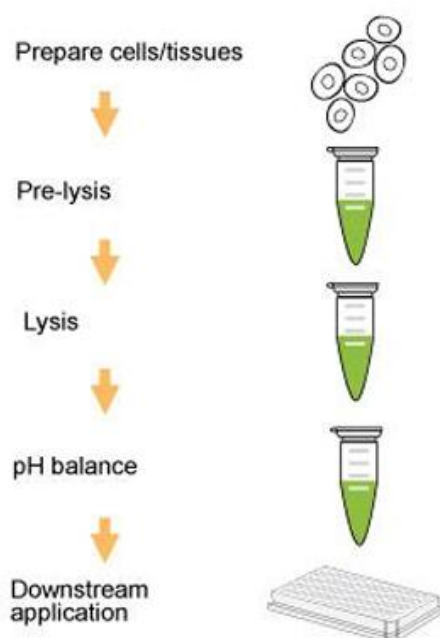


Figura 11 Schema procedurale EpiQuik™ Total Histone Extraction Kit (figura tratta dal protocollo ufficiale).

3.7 Analisi quantitativa delle modificazioni dell'istone H3

L'analisi quantitativa simultanea delle modificazioni post-traduzionali a carico dell'istone H3 è stata effettuata tramite il kit colorimetrico EpiQuik™ Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (EpigenTek, #P-3100). Si basa su un saggio immunoenzimatico su piastra in cui anticorpi specifici immobilizzati nei pozzetti riconoscono selettivamente le modificazioni post-traduzionali dell'istone H3, i quali vengono successivamente quantificati mediante immunorivelazione e lettura colorimetrica.

Il protocollo sperimentale prevede l'esecuzione sequenziale dei seguenti passaggi:

1. *Preparazione dei tamponi di lavoro e dei controlli:*

- Diluted WB 1X: il tampone di lavaggio WB 10X viene diluito in acqua distillata (rapporto 1:10) e il pH viene stabilizzato nell'intervallo 7.2–7.5.
- Diluted DA: l'anticorpo di rivelazione (Detection Antibody 1000X) viene diluito nel diluted WB 1X in rapporto 1:1000 (50 µL finali per singolo pozzetto).
- Diluted Assay Control Protein: la proteina di controllo fornita a 100 µg/ml viene diluita con l'Antibody Buffer (AB) per ottenere due soluzioni di riferimento a concentrazione nota: 5 ng/µL (bassa concentrazione) e 25 ng/µL (alta concentrazione).

2. *Fase di legame degli istoni (Histone Binding):*

- In ogni pozzetto della piastra viene allestito un volume finale di 50 µL:
 - Pozzetti Blank (bianco): 49 µL di Antibody Buffer (AB).
 - Pozzetti di Controllo: 49 µL di AB e 1 µL di diluted Assay Control Protein (eseguito in duplicato per i punti a 5 ng e 25 ng).
 - Pozzetti Campione: una quota variabile da 1 a 4 µL di estratto istonico totale (pari a una quantità ottimale compresa tra 50 e 100 ng di proteine totali non contenente detergenti interferenti quali SDS, Tween, Triton X-100 o NP-40) viene miscelata con 46–49 µL di AB.
- La piastra è stata sigillata con la pellicola adesiva ed incubata a 37°C per un tempo compreso tra 60 e 120 minuti.
- Al termine, la soluzione è stata rimossa ed ogni pozzetto è stato sottoposto a 3 lavaggi consecutivi con 150 µL di diluted WB 1X per eliminare le frazioni non legate.

3. *Legame dell'anticorpo di rivelazione (Antibody Binding):*

- In ciascun pozzetto sono stati dispensati 50 µL di diluted DA.
- La piastra è stata protetta con parafilm o alluminio e lasciata incubare a temperatura ambiente per 60 minuti.

- La soluzione anticorpale è stata rimossa e i pozzetti sono stati sottoposti a 4 lavaggi consecutivi con 150 μ L di diluted WB 1X, prestando massima attenzione ad eliminare ogni residuo di tampone.

4. *Rivelazione del segnale e lettura spettrofotometrica:*

- Sono stati aggiunti 100 μ L di Developer Solution (DS) in ciascun pozzetto.
- La piastra è stata incubata al riparo dalla luce a temperatura ambiente per un tempo medio di 2–5 minuti (monitorando il viraggio al blu nei pozzetti positivi).
- La reazione enzimatica è stata bloccata mediante l'aggiunta di 100 μ L di Stop Solution (SS), determinando il viraggio cromatico della soluzione dal blu al giallo.
- L'assorbanza è stata misurata entro 2–10 minuti tramite un lettore di micropiastre a una lunghezza d'onda di 450 nm (con una lunghezza d'onda di riferimento opzionale impostata a 655 nm per la sottrazione del fondo).

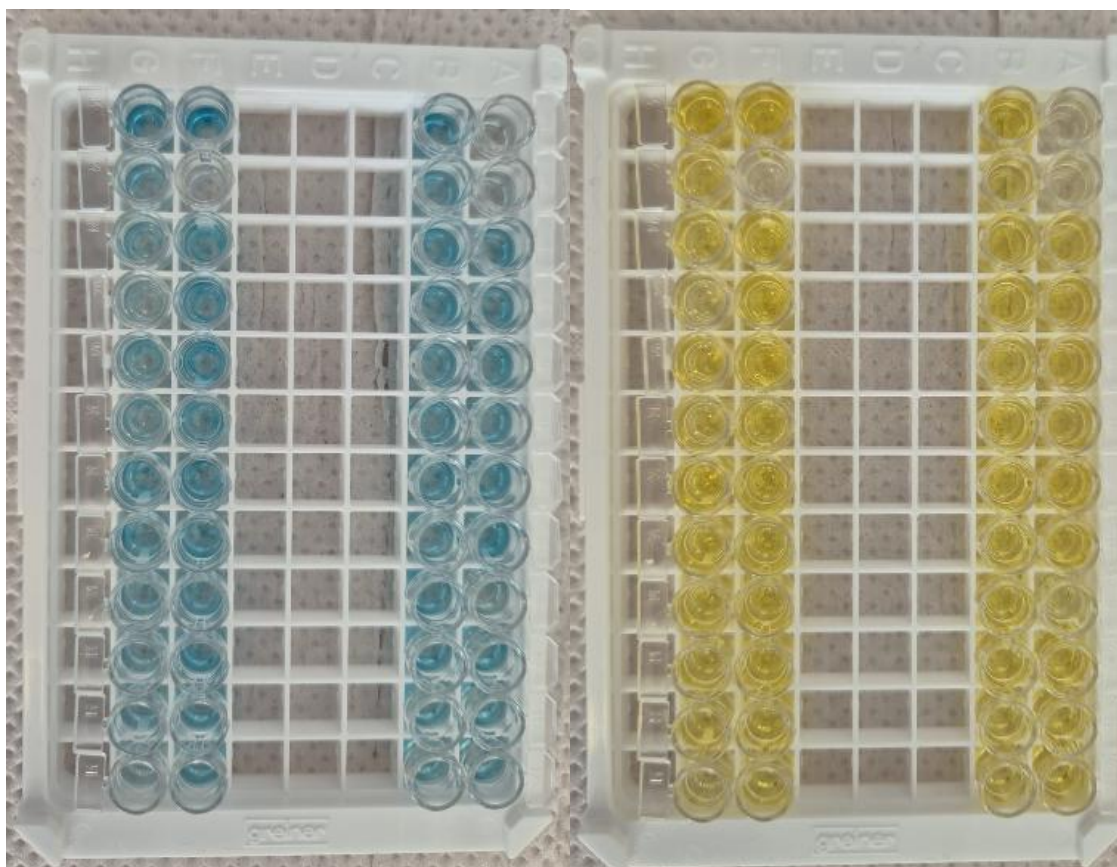


Figura 12 Saggio colorimetrico EpiQuik™: le due piastre mostrano la transizione cromatica dal blu al giallo.

5. *Elaborazione statistica e formule di calcolo:*

- I valori di assorbanza ricavati dai duplicati sono stati mediati e la quantificazione assoluta di ciascuna modificazione istonica (espressa in ng/ μ g di proteina) è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\text{H3 Modification} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{protein} \right) = \frac{(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}})}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} * \frac{S}{P} * 1000$$

Dove S rappresenta la quantità di estratto proteico inserito espresso in ng (es. 100 ng) e P è la quantità di proteina standard utilizzata nel controllo pari a 25 ng.

- La percentuale relativa di una specifica modificazione rispetto all'istone H3 totale è stata ricavata mediante la proporzione:

$$\text{H3 Modification \%} = \frac{\text{Amount of H3 modification} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{protein} \right)}{\text{Amount of total H3} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{protein} \right)} \times 100$$

- Infine, le variazioni nei profili epigenetici tra la linea cellulare d'interesse (S1.1) e il relativo controllo (Mock) sono state espresse come variazione percentuale relativa (Relative Change %):

$$\text{Relative Change \%} = \frac{\text{H3 modification \% S1.1}}{\text{H3 modification \% MOCK}} \times 100$$

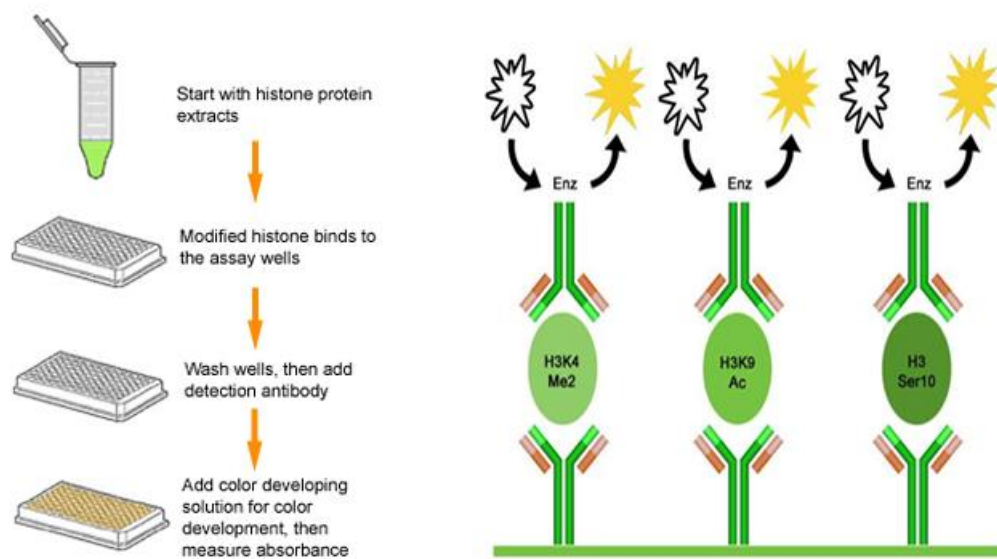


Figura 13 Rappresentazione procedurale, a sinistra, e principio operativo, a destra, del saggio colorimetrico EpiQuik™ Histone H3 Modification Multiplex (figure tratte dal protocollo ufficiale).

3.8 Analisi quantitativa delle modificazioni dell'istone H4

L'analisi quantitativa simultanea delle modificazioni post-traduzionali a carico dell'istone H4 è stata effettuata tramite il kit colorimetrico EpiQuik™ Histone H4 Modification Multiplex Assay Kit (EpigenTek, #P-3102). Il saggio si basa su un test immunoenzimatico su piastra in cui anticorpi specifici immobilizzati nei pozzetti riconoscono selettivamente le specifiche modificazioni post-traduzionali dell'istone H4, i quali vengono successivamente quantificati mediante immunorivelazione e lettura colorimetrica.

Il protocollo sperimentale prevede l'esecuzione sequenziale dei seguenti passaggi:

1. *Preparazione dei tamponi di lavoro e dei controlli:*

- Diluted WB 1X: il tampone di lavaggio WB 10X viene diluito in acqua distillata (aggiungendo 26 mL di WB 10X a 234 mL di acqua distillata) e il pH viene stabilizzato nell'intervallo 7.2–7.5.
- Diluted DAH: l'anticorpo di rivelazione (Detection Antibody H, DAH 1000X) viene diluito nel Diluted WB 1X in rapporto 1:1000 (aggiungendo 1 μ L di DAH a 1000 μ L di Diluted WB, con un impiego di 50 μ L finali per singolo pozzetto).
- Diluted Assay Control Protein: la proteina di controllo fornita a 100 ng/ μ L viene diluita con l'Antibody Buffer (AB) per ottenere due soluzioni di riferimento a concentrazione nota: 5 ng/ μ L (bassa concentrazione, unendo 1,0 μ L di proteina di controllo a 19,0 μ L di AB) e 25 ng/ μ L (alta concentrazione, unendo 1,0 μ L di proteina di controllo a 3,0 μ L di AB).

2. *Fase di legame degli istoni (Histone Binding):*

- In ogni pozzetto della piastra viene allestito un volume finale di 50 μ L:
 - Blank (Bianco): 49 μ L di Antibody Buffer (AB).
 - Controllo: 49 μ L di AB e 1 μ L di Diluted Assay Control Protein (eseguito in duplicato per i punti a 5 ng e 25 ng).
 - Campione: una quota variabile da 1 a 4 μ L di estratto istonico totale (pari a una quantità ottimale compresa tra 50 e 100 ng di proteine totali, privo di detergenti interferenti quali SDS, Tween, Triton X-100 o NP-40) viene miscelata con 46–49 μ L di AB.
- La piastra è stata sigillata con la pellicola adesiva ed incubata a 37°C per un tempo compreso tra 60 e 120 minuti.
- Al termine, la soluzione è stata rimossa ed ogni pozzetto è stato sottoposto a 3 lavaggi consecutivi con 150 μ L di Diluted WB 1X per eliminare le frazioni non legate.

3. *Legame dell'anticorpo di rivelazione (Antibody Binding):*

- In ciascun pozzetto sono stati dispensati 50 μ L di Diluted DAH.
- La piastra è stata protetta con Parafilm M o alluminio e lasciata incubare a temperatura ambiente per 60 minuti.
- La soluzione anticorpale è stata rimossa e i pozzetti sono stati sottoposti a 4 lavaggi consecutivi con 150 μ L di Diluted WB 1X, prestando massima attenzione a eliminare ogni residuo di tampone.

4. *Rivelazione del segnale e lettura spettrofotometrica:*

- Sono stati aggiunti 100 µl di Developer Solution (DS) in ciascun pozzetto.
- La piastra è stata incubata al riparo dalla luce a temperatura ambiente per un tempo medio di 2–5 minuti (monitorando il viraggio al blu nei pozzetti positivi).
- La reazione enzimatica è stata bloccata mediante l'aggiunta di 100 µL di Stop Solution (SS), determinando il viraggio cromatico della soluzione dal blu al giallo.
- L'assorbanza è stata misurata entro 2–10 minuti tramite un lettore di micropiastre a una lunghezza d'onda di 450 nm (con una lunghezza d'onda di riferimento opzionale impostata a 655 nm per la sottrazione del fondo).

5. *Elaborazione statistica e formule di calcolo:*

- I valori di assorbanza ricavati dai duplicati sono stati mediati e la quantificazione di ciascuna modificazione istonica o dell'istone H4 totale (espressa in ng/µg di proteina) è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\text{H4 Modification } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{ protein} \right) = \frac{(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}})}{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}})} \times \frac{S}{P} \times 1000$$

Dove S rappresenta la quantità di estratto proteico inserito espresso in ng (es. 100 ng) e P è la quantità di proteina standard utilizzata nel controllo pari a 25 ng.

- La percentuale relativa di una specifica modificazione rispetto all'istone H4 totale è stata ricavata mediante la proporzione:

$$\text{H4 Modification \%} = \frac{\text{Amount of H4 modification } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{ protein} \right)}{\text{Amount of total H4 } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}} \text{ protein} \right)} \times 100\%$$

- Infine, le variazioni nei profili epigenetici tra la linea cellulare d'interesse (S1.1) e il relativo controllo (Mock) sono state espresse come variazione percentuale relativa (Relative Change %):

$$\text{Relative Change \%} = \frac{\text{H4 modification \% S1.1}}{\text{H4 modification \% in MOCK}} \times 100\%$$

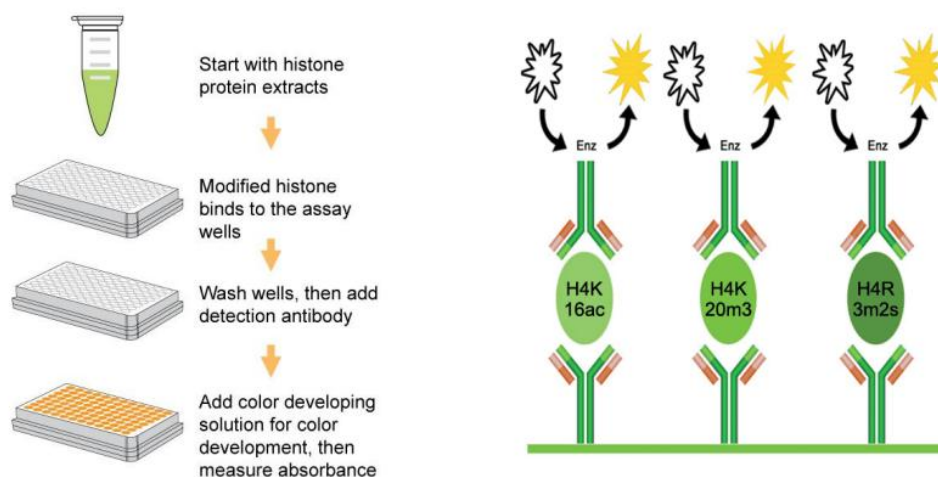


Figura 14 Rappresentazione procedurale, a sinistra, e principio operativo, a destra, del saggio colorimetrico EpiQuik™ Histone H4 Modification Multiplex (figure tratte dal protocollo ufficiale).

3.9 Analisi dell'ubiquitinazione dell'istone H2BK120 tramite Western Blot

L'analisi di Western blot è stata eseguita utilizzando 7 µg di proteine istoniche totali estratte mediante l'EpiQuik Total Histone Extraction Kit (EpigenTek), come descritto in precedenza. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide Tris-Glicina al 18% e sottoposte a corsa elettroforetica con una corrente costante di 70 mA a 4 °C, per poi essere trasferite su una membrana di nitrocellulosa con porosità di 0,2 µm a 300 mA per 1,5 ore a 4 °C.

Dopo la fase di bloccaggio della membrana in BSA al 5% preparata in TBST allo 0,15%, la membrana è stata tagliata all'altezza di circa 20 kDa:

- *Parte superiore della membrana:* incubata overnight a 4 °C con un anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-H2BK120ub (istone H2B ubiquitinato sulla lisina 120) (Cell Signaling Technology, 5546S, D11) diluito 1:1000 in BSA al 5% preparata in TBST.
- *Parte inferiore della membrana:* incubata con un anticorpo primario monoclonale di topo anti-H2B totale (Proteintech, 68393-1-Ig) diluito 1:3000 in BSA al 5% preparata in TBST.

A seguito dell'incubazione con gli anticorpi primari, le sezioni di membrana sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati all'enzima HRP: anti-IgG di coniglio (Cell Signaling, 7074S, 1:2000) o anti-IgG di topo (Sigma, A0168, 1:10000).

Gli immunoblotti sono stati sviluppati mediante chemiluminescenza avanzata. Tutti i lavaggi sono stati effettuati con tampone TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,15% Tween-20, pH 7,6). L'efficienza del trasferimento è stata verificata tramite colorazione con Rosso Ponceau S prima della fase di immunoblotting.

Anticorpo	Specie/clonabilità	Produttore e codice	Diluizione
anti-H2BK120ub	Coniglio/monoclonale (D11)	Cell Signaling, #5546S	1:1000
anti-H2B totale	Topo/monoclonale	Proteintech, #68393-1-Ig	1:3000
anti-IgG (HRP)	Coniglio/secondario	Cell Signaling, #7074S	1:2000
anti-IgG (HRP)	Topo/secondario	Sigma, #A0168	1:10000

Tabella 5 Anticorpi per Western blot, analisi H2BK120ub.

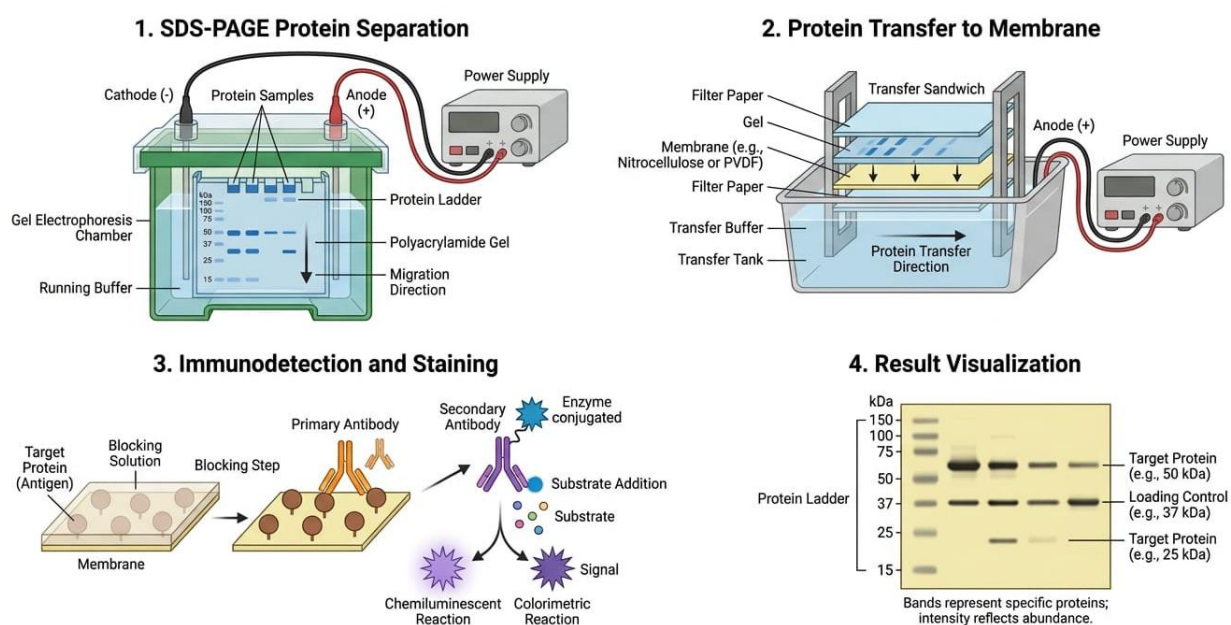


Figura 15 Schema procedurale per Western Blot.

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione morfologica: cellule Mock vs cellule S1.1

Il confronto delle due linee cellulari Mock a S1.1 derivate dalla linea di Neuroblastoma umano SK-N-BE2 ha evidenziato differenze marcate sia dal punto di vista proliferativo e morfometrico associate alla sovra-espressione stabile di lncRNA NDM29.

Dal punto di vista della cinetica di proliferazione, l'espressione di NDM29 mediante vettore d'espressione è risultata associata ad una riduzione del tasso proliferativo. Nelle piastre in coltura, a parità di tempo e condizioni sperimentali, le cellule S1.1 si presentano in numero inferiore rispetto alle cellule di controllo Mock (trasfettate con il vettore vuoto), le quali mantengono una cinetica di proliferazione tumorale elevata.

Dal punto di vista strutturale e morfologico, l'osservazione microscopica mostra come le cellule Mock conservano un fenotipo maligno marcatamente indifferenziato con forma circolare delle cellule (tipica della linea cellulare SK-N-BE2, caratterizzata dall'amplificazione di MYCN). Al contrario, le cellule S1.1 che sovraesprimono NDM29 mostrano una modificazione fenotipica compatibile con un processo di differenziamento, abbandonando la forma tondeggiante ed acquisendo una morfologia simil-neuronale, contraddistinta dall'estensione radiale di prolungamenti citoplasmatici e ramificazioni neuritiche ben definite.

L'analisi in immunofluorescenza ha permesso di caratterizzare sia la morfologia cellulare sia l'organizzazione nucleare (*Figura 11*), impiegando la falloidina marcata (in rosso, per i microfilamenti di actina citoscheletrica) e il colorante Hoechst (in blu, per l'intercalazione del DNA nucleare).

Nelle cellule Mock, l'actina si dispone a definire una struttura compatta e priva di prolungamenti, caratteristica del fenotipo indifferenziato e aggressivo. Al contrario, nel clone S1.1, la riorganizzazione dell'actina evidenzia l'estensione di vistosi prolungamenti neuritici, confermando l'avvenuto differenziamento fenotipico. Contestualmente, la marcatura con Hoechst evidenzia un drastico calo della densità cellulare nelle S1.1 rispetto alle Mock, a conferma del blocco proliferativo. Se da un lato la localizzazione dell'eterocromatina lungo l'involucro nucleare riflette stati specifici di architettura della cromatina (Carone e Lawrence, 2013), dall'altro la distribuzione punteggiata dell'istone H2B e dei fattori epigenetici a livello nucleoplasmatico suggerisce un riarrangiamento della cromatina strettamente funzionale al differenziamento neuronale.

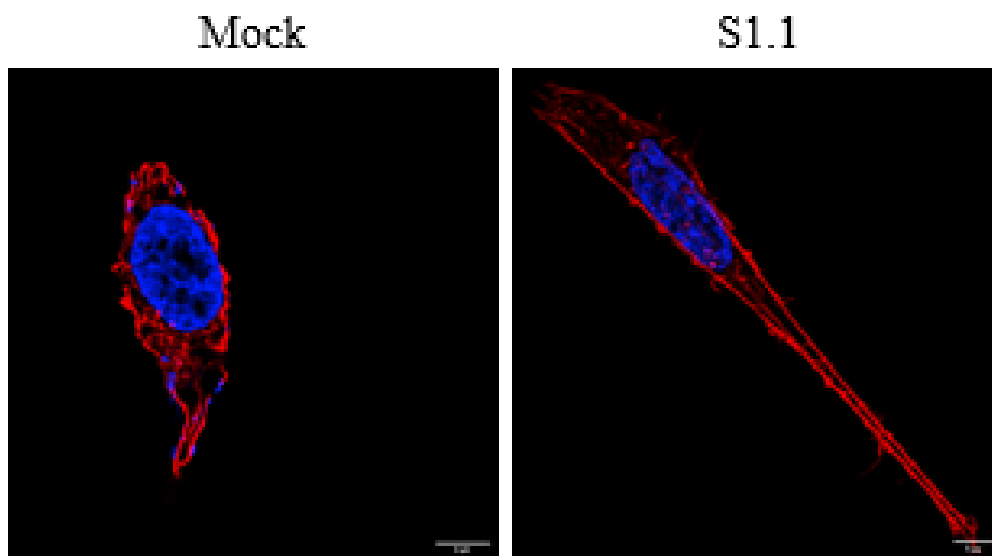


Figura 16 Analisi comparativa al microscopio tra il controllo Mock e il campione S1.1.

4.2 Verifica della stabilità della transfezione

Al fine di valutare le variazioni di espressione dei geni coinvolti nella regolazione cromatinica associate al fenotipo osservato, è stato condotto uno screening trascrizionale ad alta efficienza (Real-Time PCR Array) che ha permesso di verificare la corretta modulazione del modello cellulare sviluppato.

Preliminarmente, è stata verificata la corretta espressione del costrutto NDM29: come mostrato in *Figura 12*, il clone S1.1 mostra un incremento statisticamente significativo (****) dell'espressione relativa di NDM29: incremento di circa 7,5 volte rispetto al controllo Mock (impostato a 1).

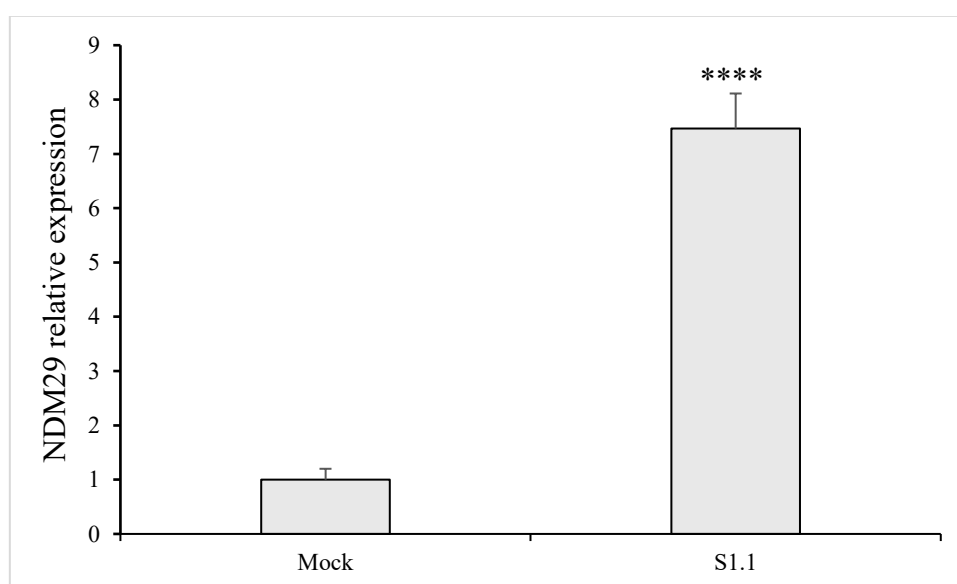


Figura 17 Analisi quantitativa dei livelli di espressione genica di NDM29 per la validazione del modello cellulare (**** $p < 0.0001$).

4.3 Profili di espressione genetica dei geni coinvolti nella riparazione del DNA

L'analisi dei profili di espressione genica condotta mediante Real-Time PCR ha evidenziato variazioni significative nell'espressione di trascritti coinvolti nella risposta allo stress cellulare e nei processi di mantenimento dell'integrità genomica nel clone S1.1 rispetto ai controlli Mock (impostati a 1.0). Nello specifico, si osserva un marcato calo dell'espressione del gene *SERPINF1* (che codifica per la proteina PEDF, un fattore multifunzionale secreto coinvolto nella regolazione di processi associati alla progressione tumorale e alle proprietà staminali) (Song et al., 2023) e una contestuale riduzione significativa dell'espressione di *CA9* (Carbonic Anhydrase IX, un enzima transmembrana indotto da condizioni di ipossia che regola il pH extracellulare/intracellulare favorendo l'adattamento cellulare a condizioni microambientali ipossiche) (Lučiūnaitė et al., 2025), la cui espressione risulta pari a circa 0.47 volte il controllo. Per contro, il clone S1.1 mostra un incremento dei trascritti associati al controllo ed alla riparazione del DNA. In particolare, l'espressione di *LIG4* (DNA Ligase 4, componente essenziale del pathway di giunzione delle estremità non omologhe o canonical-NHEJ) (Newman et al., 2015) mostra un incremento significativo raggiungendo circa 3.0 volte l'espressione basale, mentre *ERCC5* (Excision Repair Cross-Complementing Group 5, noto anche come XPG, endonucleasi coinvolta nel pathway di riparazione per escissione dei nucleotidi (NER)) registra un'up-regulation analoga (****) con un valore di circa 3.3 volte rispetto alle cellule Mock (Zuo et al., 2022).

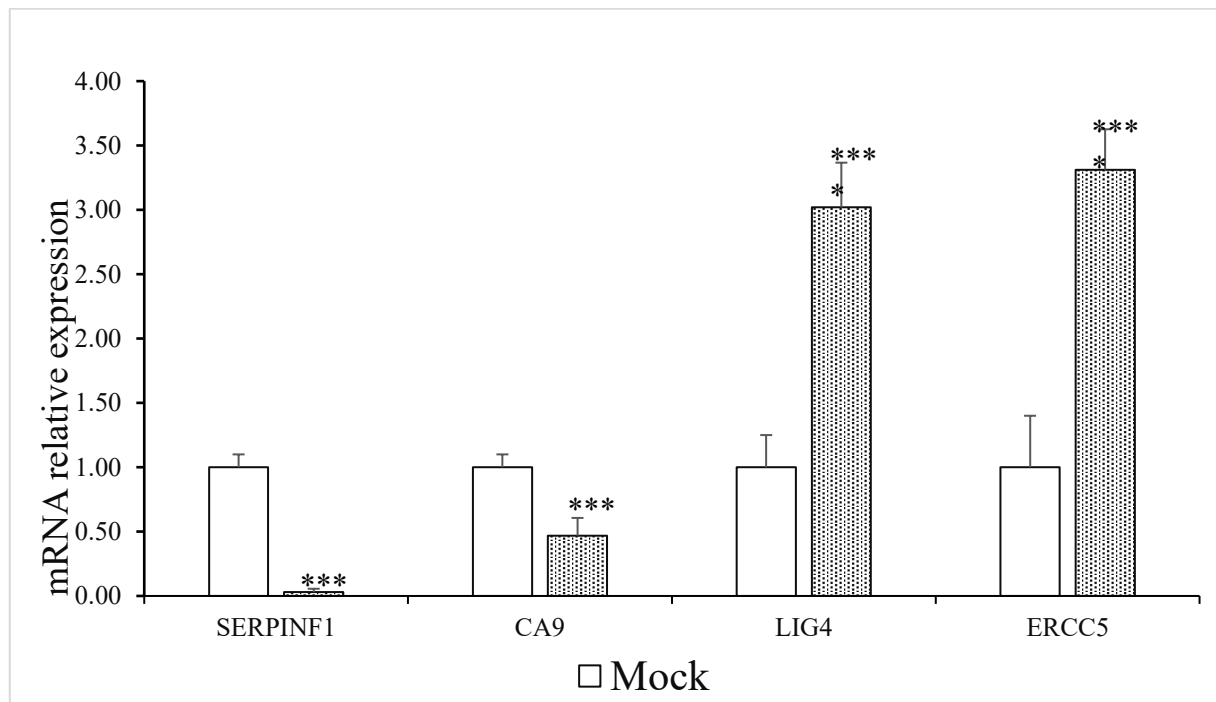


Figura 18 Analisi quantitativa dell'espressione relativa di mRNA dei geni *SERPINF1*, *CA9*, *LIG4* ed *ERCC5* nel clone S1.1 rispetto al controllo Mock (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4.4 Modulazione dell'espressione degli enzimi *Eraser* and *Writers*

L'espressione stabile dell'IncRNA NDM29 nel clone S1.1 è associata a una modulazione dell'espressione dei geni coinvolti nel rimodellamento del codice istonico, determinando variazioni coordinate nei livelli di espressione sia la componente dei *Writer* (enzimi deputati all'aggiunta di modificazioni post-traduzionali) sia quella degli *Eraser* (enzimi responsabili della loro rimozione).

L'analisi condotta mediante PCR ha evidenziato una netta modulazione di diversi fattori chiave:

1) *Rimodellamento del network dei Writer (istone acetiltrasferasi e metiltrasferasi)*

A livello dei complessi di scrittura cromatinica, si osserva una marcata variazione del profilo di espressione:

- Istone acetiltrasferasi (HAT): si evidenzia un aumento significativo dell'espressione di HAT1 e KAT2B (PCAF), che risultano significativamente up-regolati nel clone S1.1. Per contro, l'acetiltrasferasi KAT5 (Tip60) mostra una marcata riduzione dell'espressione, posizionandosi tra i target maggiormente down-regolati nell'analisi trascrittomico.
- Istone metiltrasferasi (HMT) e arginina metiltrasferasi (PRMT): il profilo di espressione delle metiltrasferasi risulta modulato. Si assiste all'up-regulation di metiltrasferasi specifiche come SETDB2 e SETD4, affiancate dal fattore RNF2 (componente del complesso Polycomb PRC1 coinvolto nella regolazione cromatinica). Parallelamente, si registra una forte diminuzione dei livelli trascrizionali di enzimi chiave quali PRMT8, PRMT6 e SMYD3.

2) *Rimodellamento degli Eraser (istone deacetilasi e demetilasi)*

Allo stesso modo, la componente coinvolta nella rimozione o modulazione delle modificazioni istoniche subisce una profonda riorganizzazione:

- Istone deacetilasi (HDAC): i dati mostrano un andamento differenziale dell'espressione all'interno della stessa famiglia enzimatica, con un'up-regulation significativa della deacetilasi di classe I HDAC2 ed una contestuale e marcata down-regulation di HDAC9.
- Istone demetilasi (KDM): si osserva una consistente repressione dei fattori di demetilazione istonica, testimoniata dal significativo abbattimento dei livelli di KDM4C e KDM6B (JMJD3).

3) *Alterazione dei coattivatori trascrizionali: il bilanciamento NCOA3/NCOA1*

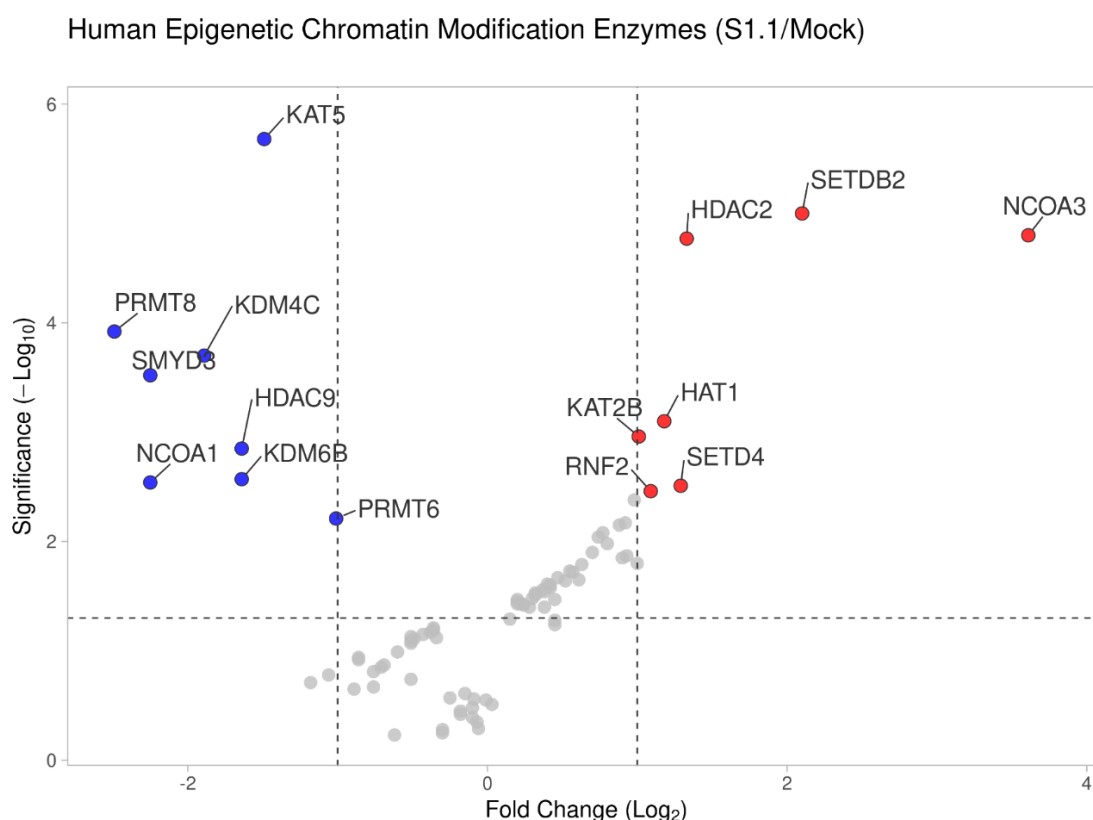
All'interno di questo scenario di riorganizzazione epigenetica, l'analisi ha rivelato un significativo sbilanciamento nella rappresentazione dei coattivatori trascrizionali appartenenti alla famiglia degli Steroid Receptor Coactivators (SRC) (Yan et al., 2006; Yi et al., 2017).

In particolare, si registra una marcata up-regulation di NCOA3 (SRC-3), i cui livelli d'espressione aumentano di 13.5 volte (13.5X) rispetto alle cellule di controllo Mock. Parallelamente a tale incremento, si osserva una drastica down-regulation del coattivatore omologo NCOA1 (SRC-1), i cui livelli si riducono a 0,21 volte (0.21X) rispetto al controllo. Tale dinamica suggerisce una possibile variazione nella composizione dei complessi trascrizionali associata all'espressione di NDM29 (Störchel et al., 2015; Bezrookove and Kashani-Sabet, 2022).

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono una possibile relazione regolatoria che collega la riattivazione di NDM29 al reclutamento dei complessi enzimatici ed alla modulazione dei target a valle:

$\uparrow \text{NDM29} \rightarrow \uparrow \text{NCOA3 (+13.5 fold)} \rightarrow \text{possibile modulazione dell'asse AGO2}$

Tale possibile coinvolgimento dell'asse NCOA3/AGO2 si inserisce nel più ampio ruolo dei miRNA nei processi di differenziazione neuronale, nei quali AGO2 rappresenta un componente rilevante della regolazione post-trascrizionale (Patranabis, 2024).



Significant Downregulation

Unchanged

Significant Upregulation

Figura 19 Rappresentazione dell'espressione genica degli enzimi di modificazione della cromatina nei cloni S1.1 rispetto ai Mock.

4.5 Analisi delle modificazioni istoniche di H3 e H4

Al fine di valutare le variazioni epigenetiche associate all'espressione di NDM29, è stato mappato il profilo delle modificazioni post-traduzionali (PTM) a carico delle code amminoacidiche degli istoni core H3 e H4. I risultati sperimentali indicano una profonda e coordinata riorganizzazione della struttura cromatinica nel campione S1.1 rispetto al controllo Mock, compatibili con una maggiore presenza di segnali istonici associati a stati cromatinici repressivi e/o differenziativi.

Le variazioni osservate nel profilo delle modificazioni istoniche risultano coerenti con cambiamenti nell'organizzazione della cromatina associati al processo di differenziamento cellulare (Baldini et al., 2025).

- **Profilo epigenetico dell'istone H3**

L'analisi multiplex quantitativa delle modificazioni dell'istone H3 (*Fig. 15*) ha evidenziato variazioni statisticamente significative in corrispondenza di residui chiave per la regolazione trascrizionale:

- *Incremento dei marker istonici associati alla repressione trascrizionale:* nelle cellule S1.1 si osserva un incremento significativo dei marker repressivi associati alla chiusura della cromatina. In particolare, si registra un forte aumento della trimetilazione della lisina 9 (H3K9me3, relative change ≈ 1.02) e, in modo ancora più marcato, della trimetilazione della lisina 27 (H3K27me3, relative change ≈ 1.41), modificazione associata alla repressione trascrizionale stabile mediata dal complesso Polycomb. Inoltre, è emerso anche l'incremento di H3K36me3 e H3K79me2 ovvero modificazioni associate rispettivamente all'allungamento trascrizionale ed alla regolazione della cromatina attiva.
- *Rimozione dei marker attivi:* coerentemente con il fenotipo di silenziamento dei loci proliferativi, l'acetilazione sulla lisina 9 (H3K9ac), marker di trascrizione attiva, mostra una variazione rispetto al profilo osservato nelle cellule Mock.
- *Marker di mitosi e ciclo cellulare:* nei residui terminali dell'istone H3 si nota una diminuzione significativa della fosforilazione sulla serina 10 e sulla serina 28 (H3ser10P e H3ser28P, entrambe sotto la linea basale di 1.0, *), in accordo con una riduzione della componente mitotica osservata nel fenotipo proliferativo delle cellule S1.1.

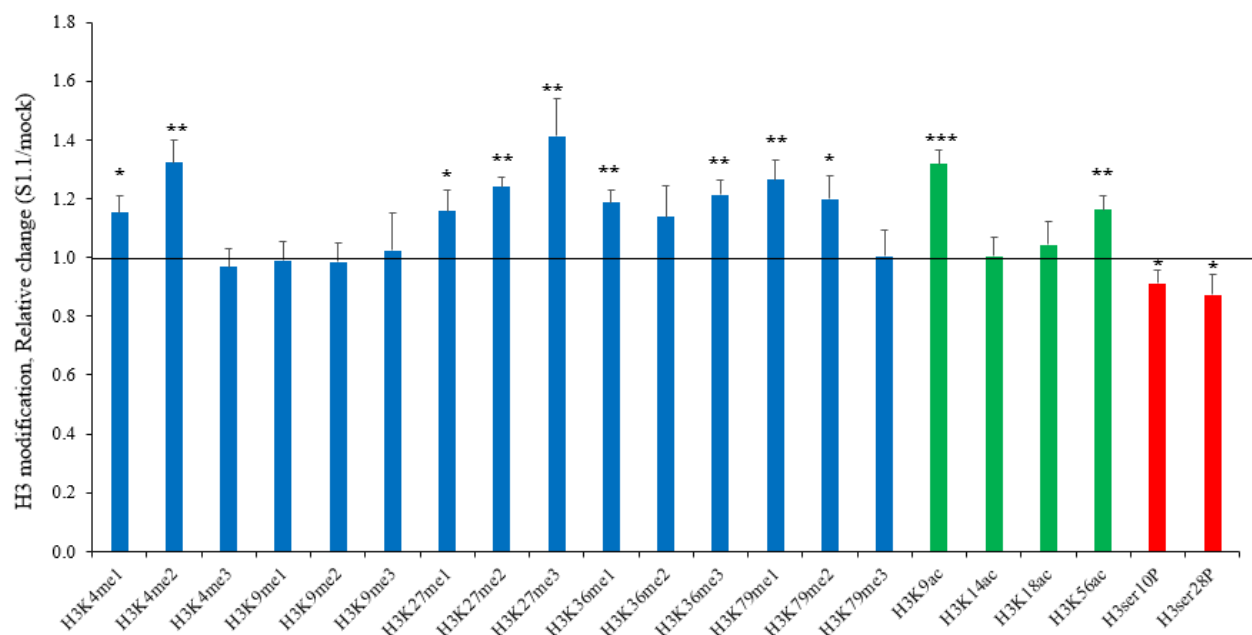


Figura 20 Profilo globale delle modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 nel campione S1.1 normalizzato rispetto al controllo Mock (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

• Profilo epigenetico dell'istone H4

Coerentemente con quanto osservato per l'istone H3, l'analisi delle PTM dell'istone H4 (*Figura 16*) evidenzia variazioni associate ai processi di regolazione della cromatina nelle cellule S1.1:

- *Variazioni delle modificazioni associate ai processi replicativi:* si registra una riduzione significativa dell'acetilazione sulla lisina 5 (H4K5ac, ***) e un calo parallelo delle altre acetilazioni della coda dell'istone H4 (H4K16ac e H4K8ac); inoltre, si ha una diminuzione della fosforilazione sulla serina 1 (H4Ser1P, *). Poiché l'acetilazione di H4K5 è biochimicamente accoppiata alla deposizione di nuovi istoni durante la fase S del ciclo cellulare, la sua riduzione nelle cellule S1.1 risulta compatibile con una diminuzione dei processi associati alla replicazione cellulare.
- *Modificazioni associate alla stabilizzazione della cromatina:* al contrario, si osserva un incremento marcato dell'acetilazione sulla lisina 12 (H4K12ac, relative change ≈ 1.50) e un aumento della metilazione sulla lisina 20 (H4K20me2 e H4K20me3), modificazioni associate alla regolazione della struttura cromatinica e a stati cellulari differenziati (Kurup et al. 2020).

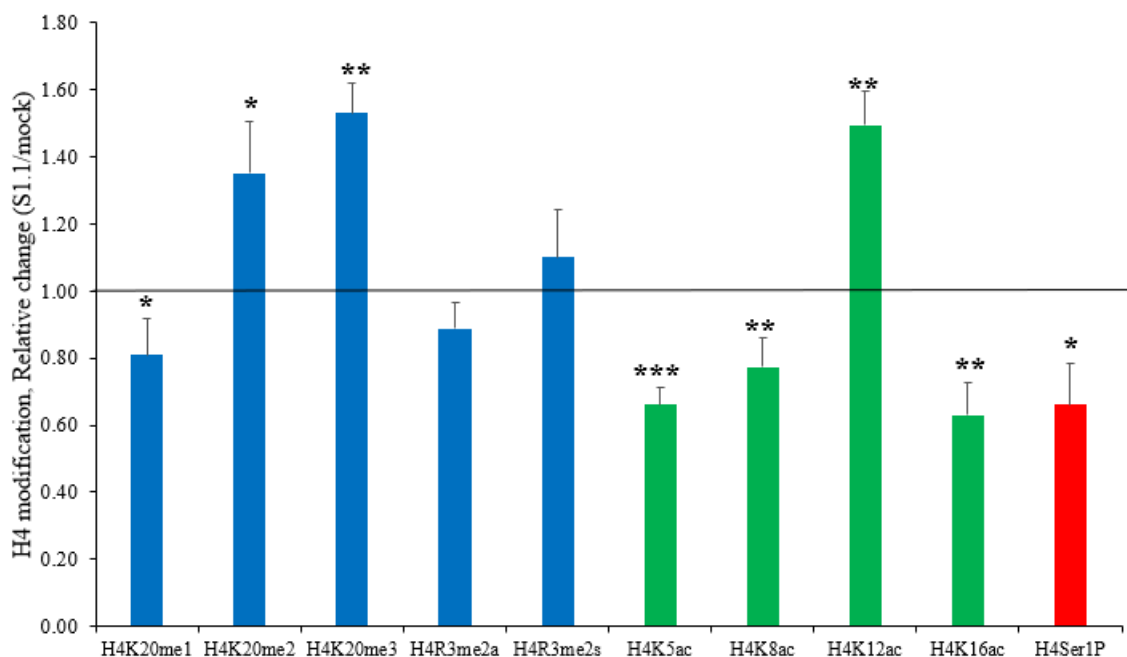


Figura 21 Profilo globale delle modificazioni post-traduzionali dell'istone H4: decremento drastico dei marker replicativi (H4K5ac) e l'arricchimento dei marker di stabilità cromatinica (H4K12ac, H4K20me3) nel clone S1.1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.6 Validazione proteica della monoubiquitinazione di H2BK120 mediante Western Blot

Al fine di valutare a livello proteico una delle modificazioni epigenetiche associate all'espressione di NDM29, l'attenzione sperimentale è stata focalizzata sulla monoubiquitinazione della lisina 120 dell'istone H2B (H2BK120ub). Questa specifica modificazione è coinvolta nell'architettura del nucleosoma e nella regolazione di modificazioni istoniche correlate (cross-talk epigenetico).

A tale scopo, è stato eseguito un saggio di immunoblotting (Western Blot) su estratti proteici istonici purificati da tre replicati biologici indipendenti, denominati rispettivamente Set A, Set B e Set C (*Figura 17*).

L'analisi visiva delle membrane rivela un profilo di segnale riproducibile tra i replicati biologici analizzati:

- In tutti e tre i set biologici esaminati, le bande corrispondenti alla forma monoubiquitinata di H2B (H2BK120ub), di peso molecolare atteso di 22 kDa, si presentano marcatamente caratterizzate da una maggiore intensità del segnale nei pozzetti caricati con l'estratto istonico del clone S1.1 rispetto ai pozzetti del controllo Mock (*Figura 17*, pannello superiore).
- Le bande relative all'istone H2B (circa 15 kDa), utilizzato come controllo per la normalizzazione rispetto al contenuto totale di H2B, mostrano un'intensità perfettamente

simmetrica ed omogenea tra i pozzetti Mock e S1.1 all'interno di ciascun set, supportando la comparabilità della concentrazione proteica tra i campioni (*Figura 17*, pannello inferiore).

La quantificazione densitometrica dei segnali, espressa come rapporto tra la forma modificata e l'istone totale (Ub-H2B/H2B), ha evidenziato quantitativamente una variazione coerente con il pattern osservato: le cellule S1.1 mostrano un incremento significativo del marker pari a 1.35 volte (1.35X) rispetto al controllo Mock (**** $p < 0,0001$) (*Figura 18*). L'aumento della monoubiquitinazione di H2BK120 evidenzia una modulazione delle modificazioni epigenetiche istoniche associata all'espressione di NDM29, risultando coerente con il rimodellamento cromatinico osservato nel clone S1.1.

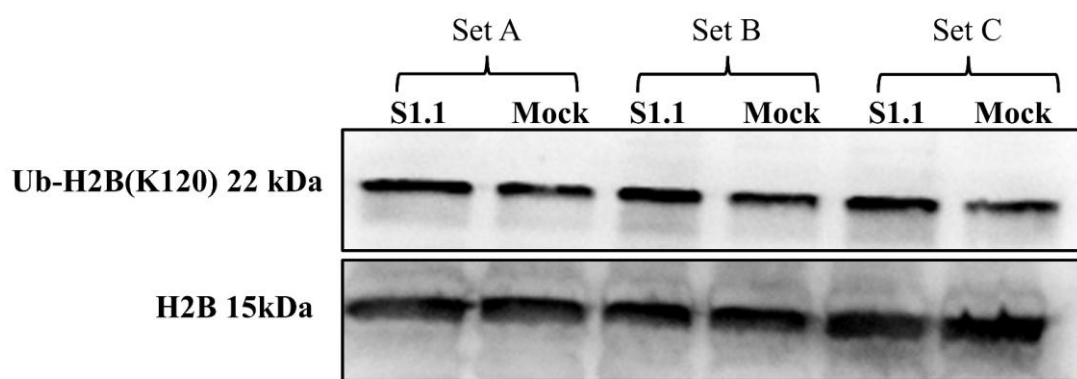


Figura 22 Immunoblot relativo alla monoubiquitinazione dell'istone H2B (K120).

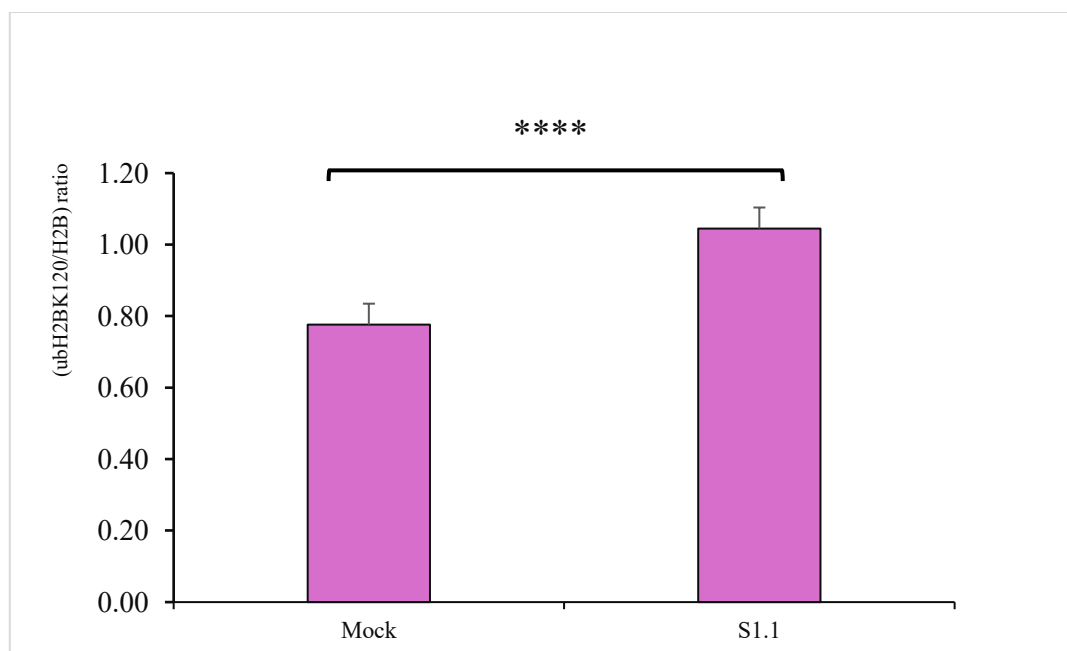


*Figura 23 Analisi densitometrica dei livelli di monoubiquitinazione dell'istone H2B sulla lisina 120 (ubH2BK120) (**** $p < 0,0001$).*

5. DISCUSSIONE

5.1 L'asse molecolare associato a NDM29 e NCOA3 nella differenziazione neuronale e riprogrammazione trascrizionale

I dati biologici, molecolari e biochimici generati nel presente studio sul modello di Neuroblastoma umano SK-N-BE2 supportano il ruolo dell'oncosoppressore lncRNA NDM29 nell'associazione con la riprogrammazione fenotipica da uno stato tumorale ad alta malignità verso un fenotipo differenziato di tipo neuronale.

A livello macroscopico e cinetico, l'espressione stazionaria e forzata di NDM29 nel clone S1.1 è associata ad una marcata transizione fenotipica: le cellule abbandonano la classica forma sferica, indifferenziata ed aggressiva (caratteristica della linea SK-N-BE2, modello di Neuroblastoma ad alto rischio con amplificazione di MYCN) per estendere una complessa rete di prolungamenti citoplasmatici e ramificazioni neuritiche. Tale cambiamento morfologico si accompagna ad un drastico arresto della cinetica di proliferazione cellulare.

Dal punto di vista della meccanica molecolare, lo screening condotto mediante PCR e le successive validazioni proteiche hanno permesso di evidenziare una specifica risposta trascrizionale associata all'espressione di questo lungo RNA non codificante, identificando un potenziale nodo regolatorio nel coattivatore NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3/SRC-3).

In ambito oncologico generale, NCOA3 è stato tradizionalmente descritto come un oncogene in grado di promuovere la proliferazione nei tumori di origine epiteliale. Tuttavia, nel contesto del tessuto nervoso e dei neuroblasti, la sua aumentata espressione associata all'aumento di NDM29 si inserisce in un preciso switch di espressione all'interno della famiglia dei coattivatori per i recettori steroidei (SRC), che vede la parallela e drastica soppressione dell'omologo NCOA1 (SRC-1). Come riportato in letteratura (Störchel et al., 2015; Zhang et al., 2015), nei contesti neuronali NCOA3 può operare come regolatore positivo dell'apparato dei microRNA, favorendo indirettamente il reclutamento dei complessi di silenziamento (di cui AGO2 rappresenta un noto effettore catalitico) favorendo potenzialmente la regolazione post-trascrizionale mediata dai complessi contenenti miRNA.

Questo riassetto molecolare risulta coerente con una riduzione delle caratteristiche associate allo stato indifferenziato e tumorale (riduzione delle Cellule Inizianti il Tumore, TIC), alla sintonizzazione dei canali ionici voltaggio-dipendenti per il Potassio e il Calcio indispensabili per l'eccitabilità neuronale, alla modulazione della secrezione dei peptidi amiloidi β e alla contestuale sottoregolazione delle

pompe di efflusso transmembrana appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC (come la P-glicoproteina e la proteina MRP1), ripristinando la sensibilità farmacologica della cellula tumorale.

Coerentemente con questo profondo riassetto biologico, l'analisi dei dati trascrizionali ha consentito di caratterizzare ulteriori geni target chiave responsabili della riprogrammazione metabolica, della resistenza allo stress microambientale e del mantenimento dell'integrità del genoma:

- *Soppressione dei marcatori di malignità ed evasione microambientale*: si registra il crollo dell'espressione di CA9; la riduzione di CA9 risulta compatibile con una diminuzione dei programmi molecolari associati all'adattamento ipossico tipico del microambiente tumorale.
- *Rimodellamento del secretoma e della nicchia staminale*: si osserva una riduzione dell'espressione del gene SERPINF1, codificante per la proteina PEDF. Sebbene PEDF sia ampiamente descritto (Becerra and Notario, 2013) per il suo ruolo anti-angiogenico, oncosoppressore e per la capacità di indurre il differenziamento nei tumori di origine neuronale, la sua diminuzione nel clone S1.1 non equivale alla perdita di un marcatore di malignità. Al contrario, tale calo trascrizionale riflette un riassetto del secretoma e della segnalazione autocrina/paracrina della nicchia, che non risulta più necessaria una volta che la cellula ha ormai stabilizzato il proprio programma di differenziamento neuronale.
- *Attivazione dei sistemi di stabilità genomica e riparazione del DNA*: in modo speculare al calo dei marcatori oncogenici, il clone differenziato mostra una netta induzione dei fattori costitutivi responsabili della sorveglianza e del riparo del DNA. Nello specifico, aumenta l'espressione di LIG4 e dell'endonucleasi ERCC5, suggerendo un possibile coinvolgimento dei meccanismi di mantenimento dell'integrità genomica nel processo di differenziamento associato al clone S1.1.

5.2 Dinamica del codice istonico: rimodulazione delle modificazioni istoniche, modificazioni post-traduzionali e rimodellamento della cromatina

L'attivazione dei percorsi trascrizionali differenziativi è strettamente sincronizzata con una profonda riprogrammazione della struttura cromatinica all'interno del nucleo. L'RNA non codificante NDM29 regola gli enzimi e i processi che modificano la struttura del DNA. Questa regolazione rende la cromatina più compatta e "chiusa", bloccando l'attivazione dei geni responsabili della crescita e della proliferazione cellulare.

L'analisi qualitativa e comparativa delle modificazioni post-traduzionali (PTM) a carico degli istoni core H3, H4 ed H2B ha rivelato una complessa rete di cross-talk trans-istonico:

1. *Silenziamento genico e compattazione cromatinica*: a livello della coda dell'istone H3, l'espressione di NDM29 è associata alla deacetilazione della Lisina 9 (H3K9ac, marker associato ai promotori attivi) e il parallelo incremento della sua trimetilazione (H3K9me3). La trimetilazione di H3K9 crea il sito di ancoraggio per la proteina strutturale HP1, un evento generalmente associato al reclutamento di proteine cromatiniche e alla formazione di domini repressivi. Questo evento coopera in modo sinergico con il marcato arricchimento della trimetilazione della Lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3), marker di silenziamento associato all'attività repressiva dei complessi Polycomb, incluso PRC2. L'azione combinata di H3K9me3 e H3K27me3 è compatibile con una maggiore repressione trascrizionale di programmi associati allo stato staminale e tumorale (Garcia et al., 2025; Padeken et al., 2022).
2. *Arresto mitotico e replicazione*: la transizione verso uno stato differenziato post-mitotico è supportata dal profilo di modificazioni istoniche associate al crollo dei marker istonici direttamente legati alla fase S e M del ciclo cellulare. Si osserva la drastica soppressione della fosforilazione sulla Serina 10 e Serina 28 dell'istone H3 (H3ser10P e H3ser28P), essenziali per la condensazione dei cromosomi durante la mitosi. Parallelamente, sull'istone H4 si registra la marcata riduzione dell'acetilazione sulla Lisina 5 (H4K5ac) e della fosforilazione sulla Serina 1 (H4Ser1P). Poiché l'acetilazione H4K5 è necessaria per l'incorporazione dei nuovi dimeri istonici nella forcella di replicazione, la sua perdita risulta compatibile con una riduzione dei processi associati alla replicazione del DNA.
3. *Stabilizzazione strutturale dell'eterocromatina*: in diretta contrapposizione al calo dei fattori replicativi, la mappatura dell'istone H4 mostra un netto incremento dell'acetilazione sulla Lisina 12 (H4K12ac) e della trimetilazione della Lisina 20 (H4K20me3). Queste specifiche modificazioni sono associate alla regolazione della struttura cromatinica ed a stati cellulari maggiormente differenziati (Abini-Agbomson et al., 2023; Kurup et al., 2020). L'aumento di H4K12ac osservato nel clone S1.1 è di particolare interesse alla luce del ruolo documentato di questa modificazione nella regolazione della plasticità cromatinica e dell'espressione genica nel sistema nervoso (Peleg et al., 2010).
4. *Possibile coinvolgimento nel cross-talk epigenetico*: una possibile componente regolatoria coinvolta nel coordinamento di queste risposte epigenetiche multilivello è rappresentata dalla monoubiquitinazione della Lisina 120 dell'istone H2B (H2BK120ub). La validazione biochimica ha mostrato un aumento costante e riproducibile della forma monoubiquitinata di H2B nel clone S1.1 rispetto al controllo Mock. L'aggiunta dell'ubiquitina introduce un ingombro sterico sul nucleosoma che altera la topologia locale della cromatina, fungendo da

segnale epigenetico in grado di favorire il reclutamento dei complessi modificatori ed esercitare un controllo trans-istonico sulle metilazioni dell'istone H3.

Nel complesso, l'aumento di H2BK120ub e le variazioni osservate nelle PTM degli istoni H3 e H4 delineano un profilo epigenetico coerente con una maggiore stabilizzazione della cromatina e con il fenotipo differenziato osservato nel clone S1.1.

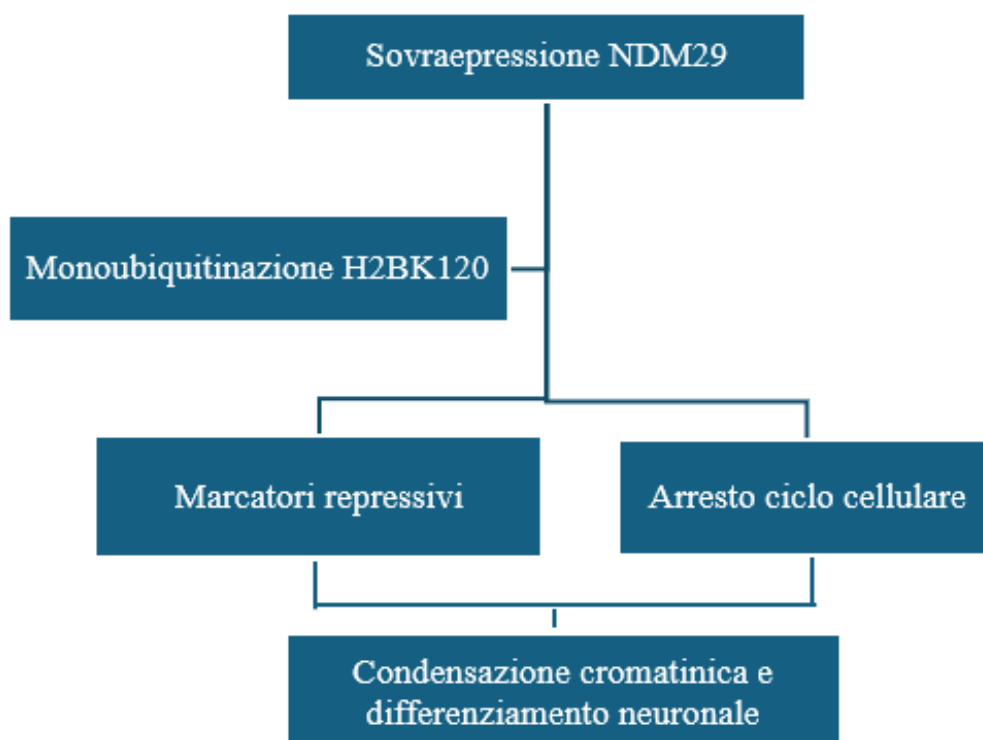


Grafico 1 Cross-talk trans-istonico.

5.3 Possibili implicazioni traslazionali in medicina legale, tossicologia e neuroscienze forensi

Decifrare la plasticità epigenetica ed i profili di espressione molecolare del neuroblastoma offre prospettive applicative di interesse per la medicina legale, la tossicologia e la diagnostica forense, in linea con il crescente interesse verso l'impiego di marcatori epigenetici, quali la metilazione del DNA, le modificazioni istoniche e gli RNA non codificanti nelle scienze forensi (Gerra et al., 2024).

L'insieme delle potenziali ricadute applicative, dei meccanismi molecolari individuati e dei relativi ambiti della medicina legale è riassunto schematicamente nella *Tabella 6*.

- *Determinazione del nesso di causalità materiale nei reati ambientali:*

Nei procedimenti giudiziari relativi all'esposizione ad inquinanti (es. pesticidi, metalli pesanti), l'accertamento del nesso di causa rappresenta lo scoglio probatorio principale. Poiché le modificazioni istoniche (es. la metilazione repressiva H3K9me3 e H3K27me3 o le variazioni di monoubiquitinazione H2BK120ub) e la trascrizione dei geni di risposta allo stress (tra cui i target da

noi analizzati CA9, LIG4, ERCC5 e SERPINF1) vengono alterate dall'interazione con agenti tossici esogeni, esse potrebbero rappresentare indicatori molecolari di esposizione o risposta cellulare a specifici stimoli ambientali. Le alterazioni epigenetiche rappresentano un possibile livello molecolare attraverso il quale le esposizioni ambientali possono essere associate a modificazioni persistenti dell'espressione genica. In particolare, contaminanti ambientali, metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici e altri agenti tossici possono modificare la metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni e l'espressione di RNA non codificanti (Bollati and Baccarelle, 2010; Kim and Kim 2026). Tali evidenze hanno portato allo sviluppo della tossicoepigenomica, che studia l'utilizzo delle alterazioni epigenetiche come potenziali biomarcatori di esposizione. Tuttavia, l'impiego di tali marcatori per stabilire individualmente un rapporto causale in ambito giudiziario richiede ancora una significativa validazione sperimentale, specialmente per distinguere il rumore di fondo biologico dalle alterazioni indotte da specifici tossici.

- *Valutazione della responsabilità professionale medica (colpa medica):*

Nei casi di contestazione penale per presunta malasanità legata a decesso oncologico pediatrico, la quantificazione dei livelli di NDM29 e di altri marcatori molecolari associati alla risposta farmacologica consente di ricostruire la risposta farmacologica intrinseca del tumore. Un profilo caratterizzato da sottoregolazione di NDM29 ed elevata espressione delle pompe ABC unitamente all'alterazione di co-regolatori trascrizionali come NCOA1/NCOA3 o del macchinario dei miRNA guidato da AGO2 potrebbe fornire, in prospettiva, un'informazione biologica complementare nella ricostruzione della risposta tumorale al trattamento, da integrare con dati clinici, farmacologici ed anatomopatologici.

- *Tanatologia molecolare ed autopsia giudiziaria:*

Gli lncRNA a struttura complessa e le modificazioni covalenti degli istoni core (come dimostrato dall'analisi di H2BK120ub e dei profili H3/H4 mediante saggi specifici in piastra ed immunoenzimatici) sono stati descritti in letteratura come potenzialmente conservabili nei tessuti post-mortem, sebbene la stabilità e la variabilità tessuto-specifica di tali marcatori debbano essere attentamente considerate nell'interpretazione forense (Gerra et al., 2024). L'impiego di biomarcatori molecolari ed epigenetici rappresenta un'area emergente della tanatologia molecolare. In particolare, approcci multi-omici comprendenti trascrittomica, epigenomica, proteomica e metabolomica sono stati proposti per migliorare la stima dell'intervallo post-mortem. Tali metodiche devono tuttavia essere considerate strumenti complementari ed ancora in fase di validazione, a causa dell'influenza esercitata da tessuto, temperatura, condizioni ambientali e variabilità interindividuale (Zar et al.,

2026). Recentemente, anche le modificazioni post-traduzionali degli istoni sono state considerate come potenziali biomarcatori di interesse forense. La loro analisi potrebbe fornire informazioni complementari rispetto ai marcatori genetici convenzionali grazie alla resistenza sterica fornita dal rocchetto nucleosomiale alla degradazione enzimatica, con possibili applicazioni nell'analisi di campioni biologici degradati, nella caratterizzazione di stati epigenetici individuali e nella stima dell'intervallo post-mortem. Tuttavia, tali applicazioni sono ancora in fase di validazione e non possono essere considerate metodiche routinarie di genetica forense (Yang et al., 2025).

- *Neuroscienze forensi e reti neurali 3D:*

Il modello S1.1 si inserisce nella prospettiva sperimentale già descritta per la generazione di reti neuronali umane mediante sovraespressione di NDM29 con caratteristiche morfologiche simil-neuronali ed un rimodellamento citoscheletrico complesso (Alloisio et al., 2017). Questo modello rappresenta un'innovativa piattaforma in vitro per saggi di neurotossicologia forense diretta, permettendo di valutare gli effetti di sostanze neurotossiche, sostanze d'abuso o agenti di guerra chimica su reti sinaptiche umane in un sistema tridimensionale fisiologicamente più rilevante rispetto alle classiche colture in monostrato.

- *Tossicologia forense:*

Il potenziale impiego dell'epigenoma come fonte di informazioni tossicologiche è stato recentemente oggetto di crescente interesse. Una revisione sistematica della letteratura ha evidenziato che diverse sostanze psicoattive, tra cui alcol, cocaina, metamfetamina, cannabis e oppioidi, possono determinare modificazioni epigenetiche rilevabili a livello di metilazione del DNA, microRNA ed enzimi epigenetici (con impatti diretti sugli enzimi "writers" ed "erasers" delle modificazioni istoniche). Tuttavia, l'utilizzo di tali alterazioni come vere e proprie “impronte tossicologiche” presenta ancora importanti limitazioni, legate soprattutto a età, co-esposizioni e intervallo post-mortem (Grassi et al., 2025), richiedendo rigidi protocolli di accreditamento e standardizzazione prima dell'ammissibilità nelle aule di tribunale secondo i criteri giuridici stabiliti per le prove scientifiche emergenti.

Ambito forense	Biomarcatore/meccanismo molecolare	Possibile applicazione e rilevanza biologica
Azienda sanitaria: colpa medica	Asse NDM29 e trasportatori MDR1/MRP1	Informazione biologica complementare nella ricostruzione della risposta alla terapia
Nesso di causalità ambientale	Pattern H3K9me3, H3K27me3, CA9 e geni di riparo (LIG4, ERCC5)	“Firma epigenetica” associata alla risposta cellulare di esposizione a tossici nei processi per disastro/inquinamento ambientale

Tanatologia molecolare	Stabilità post-mortem di lncRNA NDM29 e PTM istoniche	Autopsia molecolare, stima dell'Intervallo Post-Mortem (PMI) ed identificazione di neoplasie pediatriche silenti
Neuroscienze forensi	Modulazione peptidi β -amiloidi e rete neurale 3D	Studio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti neurotossici e delle alterazioni neuronali nei sopravvissuti a tumori cerebrali

Tabella 6 Potenziali applicazioni forensi dei risultati ottenuti.

Le applicazioni forensi illustrate rappresentano delle prospettive teoriche e di principio. Affinché questi modelli trovino un reale impiego medico-legale e processuale, sarà necessario un rigoroso percorso di validazione scientifica e sperimentale.

6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi magistrale dimostra che la sovra-espressione del lncRNA NDM29 è associato a una funzione oncosoppressiva supportato da un programma coordinato di riprogrammazione epigenetica, trascrizionale e morfologica.

La sovra-espressione del lncRNA NDM29 è associata alla transizione del fenotipo neoplastico indifferenziato verso una morfologia neuronale, caratterizzata dall'estensione di neuriti, dall'acquisizione di caratteristiche morfologiche simil-neuronali e dal blocco della proliferazione.

A livello molecolare, lo studio ha approfondito la conoscenza sui meccanismi molecolari della cascata funzionale innescata da NDM29:

- *Il ruolo di NCOA3 e la riprogrammazione trascrizionale*: l'up-regulation di NDM29 è associata ad un aumento selettivo dell'espressione del coattivatore NCOA3 inducendo contemporaneamente uno switch molecolare con la soppressione dell'omologo NCOA1. Tale riassetto è coerente con la maturazione neuronale e la perdita delle caratteristiche staminali ed aggressive del tumore.
- *Adattamento metabolico e riparo del DNA*: la maturazione associata al ripristino di NDM29 sopprime in modo coordinato i fattori di invasività ed adattamento all'ipossia tumorale (SERPIN1 e CA9), promuovendo parallelamente l'espressione dei sistemi costitutivi di sorveglianza e riparo del DNA, quali la ligasi LIG4 e l'endonucleasi ERCC5.
- *Dinamica del codice istonico e cross-talk trans-istonico*: l'analisi delle PTM istoniche ha evidenziato un profilo di modificazioni compatibile con una maggiore presenza di segnali repressivi della cromatina, definita dall'aumento dei marker repressivi H3K9me3 e H3K27me3, dal calo dell'acetilazione H3K9ac e dal crollo dei marker replicativi e mitotici (H4K5ac, H4Ser1P, H3Ser10P, H3Ser28P). L'aumento di H2BK120ub risulta associato al rimodellamento coordinato delle modificazioni istoniche osservato nel clone S1.1, suggerendo un possibile coinvolgimento nei fenomeni di cross-talk trans-istonico.

In ambito medico-legale e forense, i risultati forniscono un solido modello per l'impiego dei marcatori epigenetici come possibile supporto alla ricerca applicata in ambito forense. L'evidenza che i profili epigenetici tumorali possono conservare informazioni relative allo stato cellulare apre prospettive come elemento complementare nella valutazione del possibile ruolo di fattori ambientali nei

contenziosi di tossicologia ambientale. Inoltre, potrebbe avere utilità per la ricostruzione della farmacoresistenza nelle autopsie oncologiche pediatriche e per lo sviluppo di saggi di neurotossicologia su reti neurali tridimensionali umane.

I futuri sviluppi della ricerca saranno orientati alla validazione dell'asse NDM29/NCOA3 e dei marker istonici correlati su campioni bioptici ex vivo derivati da pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio, nonché alla messa a punto di saggi di biopsia liquida per l'isolamento di NDM29 dal circolo ematico come possibile biomarcatore diagnostico e prognostico da valutare in futuri studi clinici.

I risultati ottenuti pertanto non configurano direttamente un'applicazione forense validata, ma forniscono un modello sperimentale utile per esplorare il potenziale valore di marcatori epigenetici e trascrizionali in ambiti quali la tossicologia forense, la tanatologia molecolare e lo studio degli effetti biologici delle esposizioni ambientali. Tale prospettiva risulta coerente con il crescente interesse della comunità scientifica verso l'impiego di biomarcatori epigenetici come strumenti complementari alla genetica forense tradizionale.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abini-Agbomson S, et al. Catalytic and non-catalytic mechanisms of histone H4 lysine 20 methyltransferase SUV420H1. *Molecular Cell* (2023) 83(16):2872-2883.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.07.020.
- Alloisio S, Garbati P, Viti F, Dante S, Barbieri R, Arnaldi G, Petrelli A, Gigoni A, Giannoni P, Quarto R, Nobile M, Vassalli M, Pagano A. Generation of a Functional Human Neural Network by NDM29 Overexpression in Neuroblastoma Cancer Cells. *Mol Neurobiol.* 2017 Oct;54(8):6097-6106. doi: 10.1007/s12035-016-0161-3. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27699601.
- Baldini F, Calderoni M, Vergani L, Modesto P, Florio T, Pagano A. An Overview of Long Non-Coding (lnc)RNAs in Neuroblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 19;22(8):4234. doi: 10.3390/ijms22084234. PMID: 33921816; PMCID: PMC8072620.
- Baldini F, Pagano A, Zeaiter L, Bianchini P, Zbeeb H, Diaspro A, and Vergani L. Epigenome and three-dimensional genome architecture remodeling during NDM29-mediated retro-transformation of neuroblastoma cells. *PLoS One* (2025) 20(7):e0327466.
- Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.* 2013 Apr;13(4):258-71. doi: 10.1038/nrc3484. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23486238; PMCID: PMC3707632.
- Bezrookove V, and Kashani-Sabet M. NCOA3, a new player in melanoma susceptibility and a therapeutic target. *Cancer Gene Therapy* (2022) 29(5):399. DOI: 10.1038/s41417-022-00449-2.
- Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. *Heredity* (2010) 105:105–112.
- Bottino C, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Locatelli F, Pistoia V, Moretta A, and Castriconi R. Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Frontiers in Immunology* (2014) 5:56.
- Carone DM, and Lawrence JB. Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Seminars in Cancer Biology* (2013) 23(2):99-108. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.06.008.
- Castelnuovo M, Massone S, Tasso R, Gatti M, Robello M, Gatta E, Berger A, Strub K, Florio T, Dieci G, Cancedda R, and Pagano A. An Alu-like RNA promotes cell differentiation and reduces malignancy of human neuroblastoma cells. *The FASEB Journal* (2010) 24(10):4033-4046.
- Coellar JD, Long J, Danesh FR. Long Noncoding RNAs and Their Therapeutic Promise in Diabetic Nephropathy. *Nephron.* 2021;145(4):404-414. doi: 10.1159/000515422. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33853077; PMCID: PMC8266727.
- Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, Munson G, Chen J, Kane M, McDonel PE, Guttman M, and Lander ES. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription, and splicing. *Nature* (2016) 539(7629):452-455.

- Garbati P, Barbieri R, Cangelosi D, Zanon C, Costa D, Eva A, Thellung S, Calderoni M, Baldini F, Tonini GP, Modesto P, Florio T, Pagano A. MCM2 and Carbonic Anhydrase 9 Are Novel Potential Targets for Neuroblastoma Pharmacological Treatment. *Biomedicines*. 2020 Nov 3;8(11):471. doi: 10.3390/biomedicines8110471. PMID: 33153038; PMCID: PMC7692293.
- Garcia P, Ait-Si-Ali S, and Le Grand F. The SUV39 Family of H3K9 Methyltransferases in Skeletal Muscle Stem Cells. *FASEB BioAdvances* (2025) 7(6). DOI: 10.1096/fba.2024-00102.
- Gavazzo P, Vella S, Marchetti C, Nizzari M, Cancedda R, Pagano A. Acquisition of neuron-like electrophysiological properties in neuroblastoma cells by controlled expression of NDM29 ncRNA. *J Neurochem*. 2011 Dec;119(5):989-1001. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07492.x. Epub 2011 Oct 20. PMID: 21933186.
- Gerra MC, Dallabona C, Cecchi R. Epigenetic analyses in forensic medicine: future and challenges. *International Journal of Legal Medicine* (2024) 138:701–719. DOI: 10.1007/s00414-024-03165-8.
- Grassi S, Costantino A, Dimitrova A, Croce EB, Iasi F, Puggioni A, De Micco F, Vaiano F. Drug-Induced Epigenetic Alterations: A Set of Forensic Toxicological Fingerprints?—A Systematic Review. *Genes*. 2025; 16(10):1129. <https://doi.org/10.3390/genes16101129>
- Jenuwein T, and Allis CD. Translating the histone code. *Science* (2001) 293(5532):1074-1080. DOI: 10.1126/science.1063127.
- Kader F, Ghai M, Olaniran AO. Characterization of DNA methylation-based markers for human body fluid identification in forensics: a critical review. *Int J Legal Med*. 2020 Jan;134(1):1-20. doi: 10.1007/s00414-019-02181-3. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31713682.
- Kim JY, Kim JW. Toxicoeugenomics: Epigenetic disruption by environmental exposures and implications for biomarker development. *Journal of Hazardous Materials* (2026) 502:141070. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2026.141070.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* (2007) 128(4):693-705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kurup JT, Han Z, Jin W, and Kidder BL. H4K20me3 methyltransferase SUV420H2 shapes the chromatin landscape of pluripotent embryonic stem cells. *Development* (2020) 147(23):dev188516. DOI: 10.1242/dev188516.
- Liu Y, et al. Beyond the linker: Histone H1 as a dynamic epigenetic hub governing chromatin plasticity and disease pathogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules* (2025) 330(1):148105. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.148105.
- Lučiūnaitė A, Petrosiute A, Zakšauskas A, Petrauskas V, Baranauskienė L, Kvietkauskaitė A, Ščerbavičienė A, Tamošiūnaitė M, Musvicaite J, Jankūnaitė A, Žvinys G, Stančaitis L, Čapkauskaitė E, Mickevičiūtė A, Juozapaitienė V, Dudutienė V, Zubrienė A, Grincevičienė Š, Bukelskienė V, Schiöth HB, Matulienė J, and Matulis D. Carbonic anhydrase IX inhibition as a path to treat neuroblastoma. *British Journal of Pharmacology* (2025) 182(7):1610-1629. DOI: 10.1111/bph.17429.

- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, and Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* (1997) 389(6648):251-260. DOI: 10.1038/38444.
- Massone S, Ciarlo E, Vella S, Nizzari M, Florio T, Russo C, Cancedda R, and Pagano A. NDM29, a RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid β secretion. *Biochimica et Biophysica Acta* (2012) 1823:1170-1177.
- Munro J, Gillen SL, Mitchell L, Laing S, Karim SA, Rink CJ, Waldron JA, Bushell M. Optimisation of Sample Preparation from Primary Mouse Tissue to Maintain RNA Integrity for Methods Examining Translational Control. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 5;15(15):3985. doi: 10.3390/cancers15153985. PMID: 37568801; PMCID: PMC10417042.
- Newman EA, Lu F, Bashllari D, Wang L, Opipari AW, and Castle VP. Alternative NHEJ pathway components are therapeutic targets in high-risk neuroblastoma. *Molecular Cancer Research* (2015) 13(3):470-482. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0337.
- Northam MR, and Trujillo KM. Histone H2B mono-ubiquitylation maintains genomic integrity at stalled replication forks. *Nucleic Acids Research* (2016) 44(19):9245. DOI: 10.1093/nar/gkw658.
- Oscorbin IP, Filipenko ML. M-MuLV reverse transcriptase: Selected properties and improved mutants. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021 Nov 22;19:6315-6327. doi: 10.1016/j.csbj.2021.11.030. PMID: 34900141; PMCID: PMC8640165.
- Padeken J, Methot SP, and Gasser SM. Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2022) 23(9):623-640. DOI: 10.1038/s41580-022-00483-w.
- Park S, Cho JH, Kim JH, and Kim JA. Histone lysine methylation modifiers controlled by protein stability. *Experimental & Molecular Medicine* (2024) 56(10):2127-2144. DOI: 10.1038/s12276-024-01329-5.
- Patranabis S. Recent Advances in the miRNA-Mediated Regulation of Neuronal Differentiation and Death. *NeuroMolecular Medicine* (2024) 26(1). DOI: 10.1007/s12017-024-08820-2.
- Peleg S, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* (2010) 328(5979):753-756. DOI: 10.1126/science.1186088.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003 Oct 13;3:18. doi: 10.1186/1472-6750-3-18. PMID: 14552656; PMCID: PMC270040.
- Ponzoni M, Bachetti T, Corrias MV, Brignole C, Pastorino F, Calarco E, Bensa V, Giusto E, Ceccherini I, and Perri P. Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2022) 41:92.
- Rinn JL, and Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry* (2012) 81:145-166. DOI: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.

- Said HM, et al. Modulation of carbonic anhydrase 9 (CA9) in human brain cancer. *Current Pharmaceutical Design* (2010) 16(29):3288-3299. DOI: 10.2174/138161210793429788.
- Schwab M, Westermann F, Hero B, and Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology* (2003) 4(8):472-480.
- Simó-Riudalbas L, Esteller M. Targeting the histone orthography of cancer: drugs for writers, erasers and readers. *Br J Pharmacol*. 2015 Jun;172(11):2716-32. doi: 10.1111/bph.12844. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25039449; PMCID: PMC4439870.
- Song L, Huo X, Li X, Xu X, Zheng Y, Li D, Zhang J, Wang K, Wang L, and Wu Z. SERPINF1 mediates tumor progression and stemness in glioma. *Genes* (2023) 14(3):580. DOI: 10.3390/genes14030580.
- Störchel PH, Thümmler J, Schäfer A, et al. A large-scale functional screen identifies Noxa1 and Nco3 as regulators of neuronal miRNA function. *The EMBO Journal* (2015) 34(17):2237-2254. DOI: 10.15252/emboj.201490643.
- Strikoudis A, Lazaris C, Ntziachristos P, Tsirigos A, and Aifantis I. Opposing functions of H2BK120 ubiquitylation and H3K79 methylation in the regulation of pluripotency by the Paf1 complex. *Cell Cycle* (2017) 16(24):2315. DOI: 10.1080/15384101.2017.1295194.
- Sutakawa SE, et al. Human XPG nuclease structure, assembly, and activities with insights for neurodegeneration and cancer from pathogenic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* (2020) 117(25):14127-14138. DOI: 10.1073/pnas.1921311117.
- Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Science International: Genetics* (2018) 37:180–195. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.08.008.
- Weake VM, and Workman JL. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular Cell* (2008) 29(6):653-663. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.02.014.
- Yan J, Tsai SY, and Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica* (2006) 27(4):387-394. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00315.x.
- Yang, S.; Chen, L.; Lin, M.; Shen, C.; Rehman, A. Histone Modifications as Individual-Specific Epigenetic Regulators: Opportunities for Forensic Genetics and Postmortem Analysis. *Genes* 2025, 16, 940. <https://doi.org/10.3390/genes16080940>.
- Yi P, et al. Structural and functional impacts of ER coactivator sequential recruitment. *Molecular Cell* (2017) 67(5):733. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.07.026.
- Zar MS, Bibi A, Akhtar MS. Unravelling time after death: A comprehensive review of multi-omics approaches in postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int* (2026) 379:112779. DOI: 10.1016/j.forsciint.2025.112779.
- Zhang L, Ma Y, Zhang J, Cheng J, and Du J. A new function for NCOA3/AIB1 in regulating the miRNA machinery to promote neuronal differentiation. *Journal of Molecular Cell Biology* (2015) 7(5):487-489. DOI: 10.1093/jmcb/mjv049.
- Zuo C, Lv X, Liu T, Yang L, Yang Z, Yu C, and Chen H. Polymorphisms in ERCC4 and ERCC5 and risk of cancers: Systematic research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Frontiers in Oncology* (2022) 12:951193. DOI: 10.3389/fonc.2022.951193.

8. RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, desidero porgere i miei primi ringraziamenti alla mia relatrice, la Prof.ssa Laura Vergani, per avermi dato la possibilità di lavorare nel Suo laboratorio per tutto il mio quinquennio di università, per avermi seguita e per avermi assegnato questo progetto che mi sta molto a cuore.

Un grande grazie va ad Hawraa per avermi accompagnato in questo percorso, per aver condiviso con me la sua esperienza e per avermi insegnato tutto quello che ho imparato in questi anni di laboratorio.

Grazie anche al mio contro-relatore, il Prof. Andrea Amaroli, per la Sua disponibilità, per i Suoi preziosi consigli e per la gentilezza che ha sempre avuto con noi studenti.

Non puoi controllare il vento, ma puoi orientare le vele.

“Micat in vertice”

16 ottobre 2026