



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA E
BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL
FENOTIPO - XXIII CICLO**

DIPARTIMENTO *GIAN FILIPPO INGRASSIA*

SEZIONE DI BIOLOGIA, GENETICA, GENOMICA CELLULARE E MOLECOLARE
GIOVANNI SICHEL

UNITÀ DI BIOMEDICINA MOLECOLARE GENOMICA E DEI SISTEMI COMPLESSI,
GENETICA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE

Dott. ROSARIO ANGELICA

**STRUTTURA GENOMICA ED ANALISI DEL
TRASCRIPTOMA DEI GENI PARP NELLE CELLULE
ALFA E BETA DEL PANCREAS DI MAMMIFERO A
STEADY STATE E DOPO TRATTAMENTO CON
CITOCHINE**

Tesi di Dottorato

Coordinatore e *Tutor*:
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO

Anno Accademico 2010 – 2011

INDICE

1. ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	4
2.1 Mono-ADP-ribosilazione e Poli-ADP-ribosilazione	6
2.1.1 Modulazione della Cromatina e Codice Epigenetico degli Istoni.	9
2.1.2 Livelli di Segnalazione (<i>Signaling</i>)	12
2.2 Struttura molecolare delle PARP	14
2.2.1 Sottogruppo I	15
2.2.2 Sottogruppo II: PARP4 (o vPARP)	21
2.2.3 Sottogruppo III: le Tankirasi	21
2.2.4 Sottogruppo IV: CCCH-PARP	23
2.2.4 Sottogruppo V: macroPARP	23
2.3 Ubiquitine	24
2.4 Diabete Mellito e Citochine	26
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 Analisi della Struttura Genomica dei Geni della Famiglia PARP	30
3.2 Analisi dei Trascritti dei Geni della Famiglia PARP a <i>steady state</i> e dopo trattamento con citochine	31
3.3 Costruzione delle <i>Networks</i> relative ai Geni della Famiglia PARP in <i>Homo sapiens</i> ed in <i>Mus musculus</i>	33
4. RISULTATI	36
5. DISCUSSIONE	58
6. CONCLUSIONI	68
7. REFERENZE	70
8. RINGRAZIAMENTI	80

1. ABSTRACT

La poli(ADP-ribosilazione) è una modifica post-traduzionale del proteoma, che svolge un ruolo importante nell'ambito di diverse funzioni cellulari (e.g., la regolazione della struttura della cromatina a *steady state* e durante lo sviluppo ed il differenziamento, la modulazione della espressione genica, i meccanismi di riparazione del DNA, l'attivazione e la regolazione del processo apoptotico, la necrosi). La reazione è catalizzata dalle proteine PARP [*Poly(ADP-ribose)Polymerases*], una famiglia di enzimi che catalizzano l'aggiunta di polimeri di poli(ADP-ribosio) alle proteine bersaglio, le cui attività molecolari e funzioni biologiche vengono di conseguenza modulate. Nell'ambito di questo progetto di ricerca, abbiamo determinato la struttura genomica dei geni della famiglia PARP in *Homo sapiens* e in *Mus musculus* ed abbiamo analizzato la loro espressione in cellule alfa e beta del pancreas di topo, sia a *steady state* che dopo trattamento con citochine con la conseguente induzione di apoptosi: secondo un consenso generale, questo modello sperimentale consente di riprodurre *in vitro* alcuni dei fenomeni che sono correlati all'insorgenza del Diabete Mellito (DM). I nostri risultati dimostrano una notevole attivazione della espressione di diverse PARP, soprattutto nelle cellule beta, e suggeriscono quindi un loro possibile ruolo nella patogenesi del DM. Per converso, questi stessi dati dovrebbero consentire anche una ulteriore definizione delle funzioni biologiche e del ruolo fisiologico di queste proteine. Infine, questi dati suggeriscono il possibile utilizzo di inibitori delle PARP per applicazioni di *Medicina Traslazionale* al trattamento clinico del Diabete Mellito.

2. INTRODUZIONE

La poli(ADP-ribosilazione) è una modifica post-traduzionale del proteoma che svolge un ruolo importante nell'ambito di diverse funzioni cellulari, quali il mantenimento della struttura del genoma, la riparazione del DNA, la regolazione della struttura della cromatina a *steady state* e durante lo sviluppo ed il differenziamento, la modulazione della espressione genica, la regolazione della apoptosi e della necrosi. Questa reazione è catalizzata dalle Poli(ADP-ribosio) Polimerasi (PARP), enzimi presenti in organismi situati a diversi livelli della scala evolutiva (dagli *Archea* ai dinoflagellati fino all'*Homo sapiens*). Mediante la poli(ADP-ribosilazione), le PARP modulano struttura e funzione delle proteine loro *bersaglio*. Questa famiglia, filogeneticamente antica, comprende diciotto geni nella nostra specie e quindici nel topo. Tutti presentano il tipico dominio catalitico, che consente la catalisi della reazione di poli(ADP-ribosilazione): PARP1, PARP2, PARP3, PARP4 (vPARP), PARP5a (Tankirase), PARP5b (Tankirase2), PARP5c (Tankirase3, presente solo nell'uomo), PARP6, PARP7 (tiPARP), PARP8, PARP9 (BAL), PARP10, PARP11, PARP12, PARP13 (solo nell'uomo), PARP14 (BAL2 nell'uomo/CoaSt6 nel topo), PARP15 (BAL3, solo nell'uomo), PARP16 (Figura 1) [Amé et al., 2004].

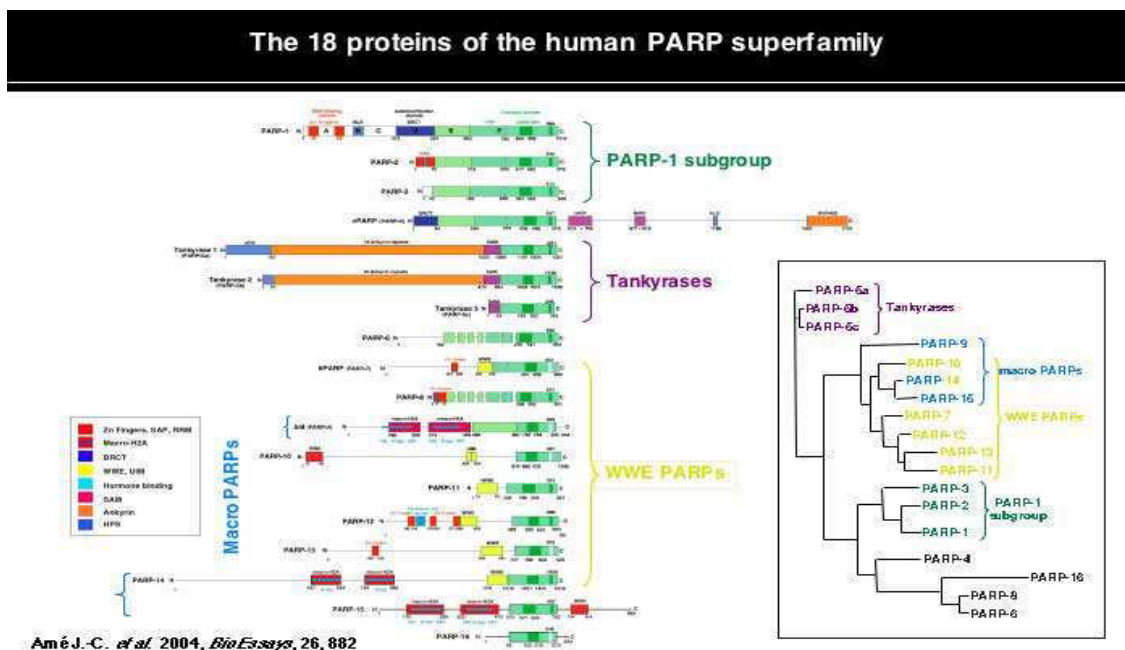


Figura 1. Famiglia PARP: struttura proteica e filogenesi. I membri della famiglia PARP sono divisi in sottogruppi in base alla similarità delle sequenze aminoacidiche ed ai tipi di domini, associati alla singola proteina. Nel riquadro di destra è presentata la ricostruzione delle possibili relazioni filogenetiche, ottenuta mediante l'analisi delle sequenze aminoacidiche delle proteine.

La reazione catalizzata da questi enzimi consiste nella formazione di polimeri di ADP-ribosio [poli(ADP-ribosio) o PAR] [Krishnakumar R et al., 2010], che vengono utilizzati per effettuare modificazioni post-traduzionali reversibili al fine di attivare oppure inibire i *targets* corrispondenti [Hassa e Hottiger, 2008a]. Alcune PARP (e.g., PARP1, PARP2, PARP9/BAL1, PARP14/Coast6) sono state associate alla trascrizione genica ed è stato proposto che possano influenzare la formazione o l'attività di vari complessi di fattori di trascrizione. È stato anche osservato che i membri della famiglia possono svolgere un ruolo importante in processi quali la progressione nel ciclo ed il controllo della proliferazione cellulare: questa ipotesi è resa credibile dalla localizzazione delle PARP in siti subcellulari quali: i centromeri dei cromosomi (PARP 3), i telomeri (le Tankirasi), i poli del fuso mitotico (PARP 1, PARP 3, Tankirasi 1), il cinetocore (PARP 1, PARP 2), il fuso mitotico (vPARP, PARP 2) [Hassa e Hottiger, 2008]. La sovra-espressione di PARP3 e PARP10 determina l'alterazione della progressione delle cellule nel ciclo cellulare; inoltre, poiché diverse altre PARP

svolgono un ruolo di *check-points* nel controllare il ciclo cellulare, è possibile utilizzarle quali bersagli di inibitori farmacologici [Hakmé et al., 2008b].

2.1 Mono(ADP-ribosilazione) e Poli(ADP-ribosilazione)

PAR è un omopolimero composto da unità di ADP-ribosio, che può essere trovato sia in forma monomerica [mono(ADP-ribosio)] che in forma polimerica [poli(ADP-ribosio)]; quest'ultima può essere lineare o ramificata. Questo polimero è utilizzato per effettuare una modificazione post-traduzionale di proteine, che hanno un ruolo fondamentale nella vita e morte cellulare, nella regolazione della trascrizione ed in altri processi che prevedono il legame proteina / DNA. Per la sintesi di tali molecole viene richiesto il Nicotinammide Adenina Dinucleotide (NAD^+) come precursore: la reazione, infatti, prevede l'idrolisi del NAD^+ in nicotinammide e ADP-ribosio; questo viene unito ad altri monomeri, dando così origine ad un polimero. Il polimero, che è legato inizialmente alla PARP stessa, viene trasferito al carbonio gamma di un residuo di glutammato delle proteine accettrici (Figura 2); è anche possibile che venga legato ad un residuo di aspartato [D'Amours et al., 1999].

La quantità di PAR è determinata dal livello di NAD^+ in maniera dose-dipendente: quando le cellule sono esposte ad alte dosi di agenti citotossici, si attivano meccanismi molecolari che inducono la ribosilazione e l'aumento della concentrazione di PAR, con la conseguente diminuzione del livello intracellulare del NAD^+ (10-20%) in circa 15 minuti. Il NAD^+ è un coenzima essenziale per generare energia sotto forma di ATP: quindi, una diminuzione di NAD^+ risulta in una deplezione di energia. Questo processo può coincidere anche con un aumento dei livelli intracellulari delle PARP [Goodwin et al., 1978; Skidmore et al., 1979].

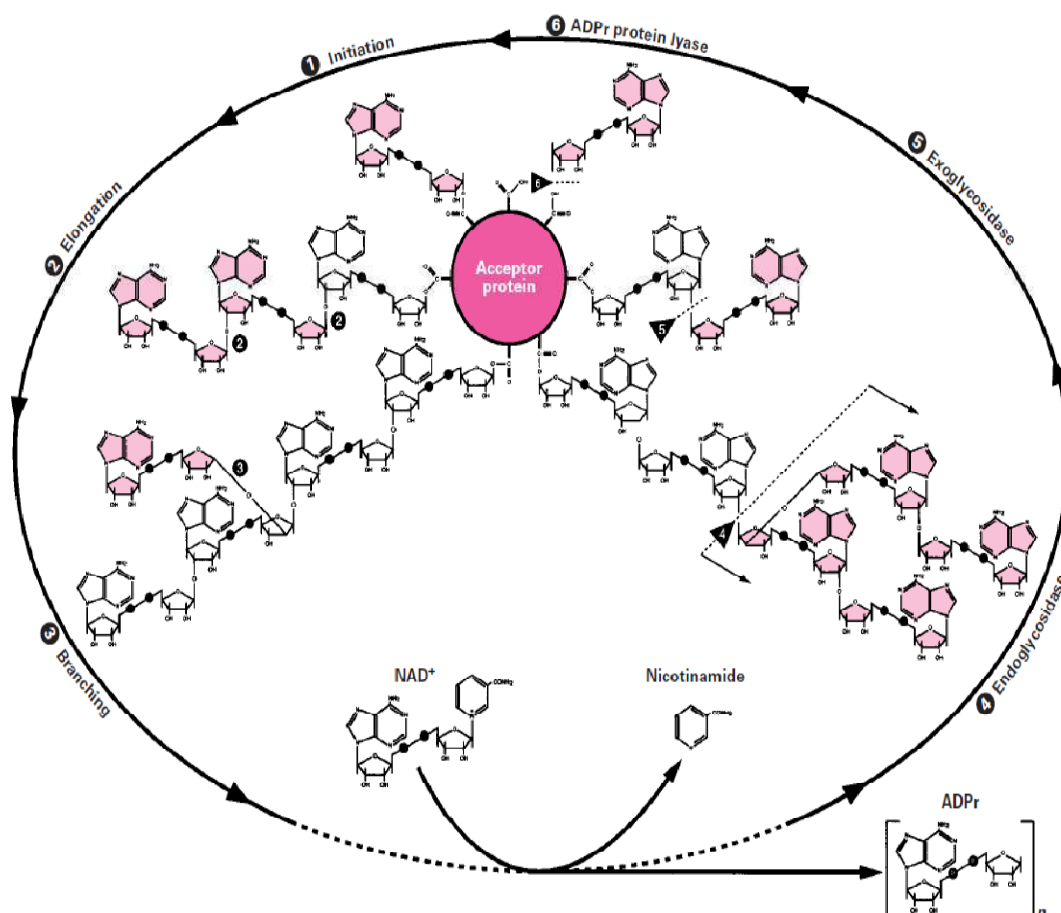


Figura 2. La parte sinistra (*steps* da 1 a 3) e la parte destra (*steps* da 4 a 6) del ciclo rappresentano rispettivamente le reazioni anaboliche e cataboliche del metabolismo dei PAR. Il ciclo procede in senso antiorario. Il cerchio rosa al centro della figura rappresenta l'ipotetica proteina accettrice di PAR, che ha subito la modificazione di un residuo di Glutammato nel carbonio gamma [D'Amours et al., 1999].

Sono almeno 5 le attività enzimatiche richieste per la sintesi delle molecole PAR, lineari o ramificate [D'Amours et al., 1999] (Figura 2):

- L'inizio: viene determinata l'auto-mono(ADP-ribosilazione) di due istidine del domino catalitico della PARP;
- La trans(ADP-ribosilazione): poichè la ribosilazione dell'istidina è instabile, si ha il trasferimento dell'ADP-ribosio tramite l'esterificazione del glutammato vicino, che rappresenta un legame più stabile;
- L'allungamento: il polimero viene allungato attraverso un legame glicosidico 2'-1' di altri ADP-ribosio ricavati dal NAD⁺;

- La ramificazione del polimero: aggiunta di altri PAR lateralmente in maniera casuale e di lunghezza differente;
- Il rilascio o trasferimento verso proteine *target* dei PAR associati all'enzima e successiva modifica del PAR tramite PAR-Glicoidrolase (PARG).

I PAR liberi o associati a proteine subiranno una degradazione. Sono stati caratterizzati due differenti tipi di degradazione dei polimeri, che sono svolti da due enzimi diversi. L'attività enzimatica più frequente e meglio caratterizzata è la PAR-glicoidrolase (PARG) [Brochu et al., 1994]. L'altra attività è PAR-fosfodiesterasi o ADPr-pirososfatasi, che effettua il taglio del pirofosfato a livello del 5'-AMP dalla catena terminale: si può avere il taglio fosforibosil-AMP in residui interni, oppure si possono formare molecole di difosforibosil-AMP nei punti di ramificazione [Boulikas, 1992; Hassa e Hottiger, 2008].

L'enzima PARG possiede sia l'attività endoglicosidasica che la esoglicosidasica, visto che effettua tagli del fosforibosio sia nel punto di ramificazione che alle estremità, rispettivamente (Figura 3) [Bonicalzi et al., 2005]. Inoltre, l'attività endoglicosidasica ha la funzione di rilasciare i PAR liberi: questo potrebbe costituire un meccanismo per generare i vari tipi di PAR liberi. Questi polimeri possono servire come molecole di segnalazione ed essere coinvolti in distinti processi cellulari, quali la morte o la crescita cellulare [Hassa et al., 2006].

Le attività enzimatiche delle varie proteine PARP e PARG devono essere strettamente regolate, in modo da consentire una corretta espressione del genoma cellulare nel corrispondente fenotipo ed una appropriata risposta agli stimoli [Bonicalzi et al., 2005].

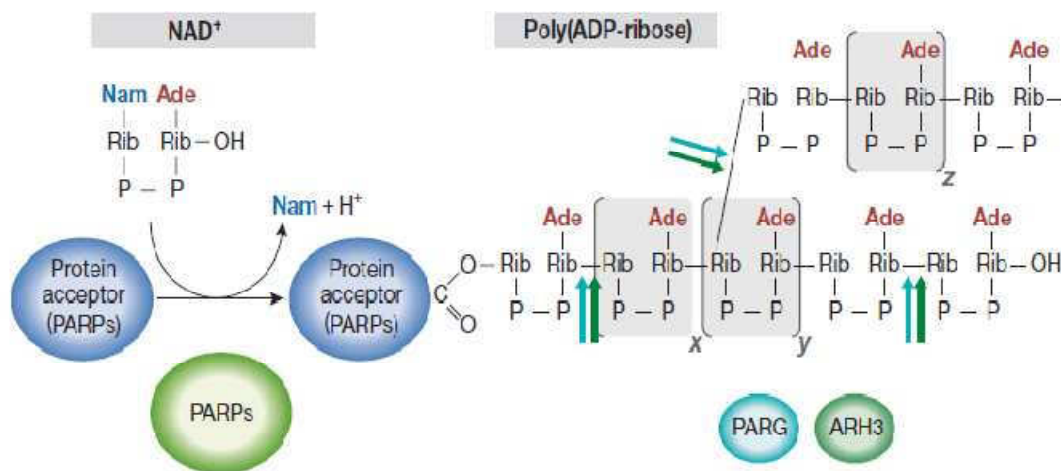


Figura 3. Metabolismo dei PAR. Le proteine PARP idrolizzano NAD⁺ e catalizzano la successiva aggiunta delle unità di ADP-ribosio ai residui di glutammato di proteine accettrici (eteromodificazione) o delle stesse PARP. I PAR sono eterogenei, come indicato dalle zone evidenziate con x, y e z. PARG and ARH3 idrolizzano i PAR nelle posizioni indicate con le frecce. (Leggenda. Ade: adenine; ARH3: ADP-ribosyl hydrolase-3; Nam: nicotinamide; PAR: poly(ADP-ribose); PARG: poly(ADP-ribose) glycohydrolase; PARP: poly(ADP-ribose)polymerase; Rib: ribose) [Hakmé et al., 2008b].

2.1.1 Modulazione della Cromatina e Codice Epigenetico degli Istoni.

Durante le ultime due decadi, vari studi hanno suggerito differenti meccanismi molecolari su come le reazioni di sintesi dei mono(ADP-ribosio) e dei PAR possano essere integrate in diversi processi fisiologici della cellula. I mono(ADP-ribosio) ed i PAR possono agire sui livelli di segnalazione, sulla modulazione della cromatina e sul codice epigenetico degli istoni. I PAR, oltre a essere prodotti a seguito di stimolazioni genotossiche, vengono anche sintetizzati costitutivamente in modo da svolgere un ruolo fondamentale in attività *housekeeping*: infatti, per la loro rapida sintesi e veloce degradazione si prestano molto bene ad essere coinvolti in processi dinamici e transienti, come il rimodellamento della cromatina, la riparazione del DNA, la regolazione dell'espressione dei geni [Hassa et al., 2006].

Diversi studi hanno dimostrato che la sintesi di grandi quantità di NAD⁺ all'interno del nucleo è coinvolta nella modulazione della struttura della cromatina. È abbastanza noto

che gli istoni subiscono modificazioni post-traduzionali, covalenti e reversibili, ad opera di diversi enzimi (e.g., acetilazione, mono-, di-, trimetilazione dei residui di lisina, fosforilazione dei residui di serina e treonina, mono(ADP-ribosilazione) di residui di glutammato e arginina).

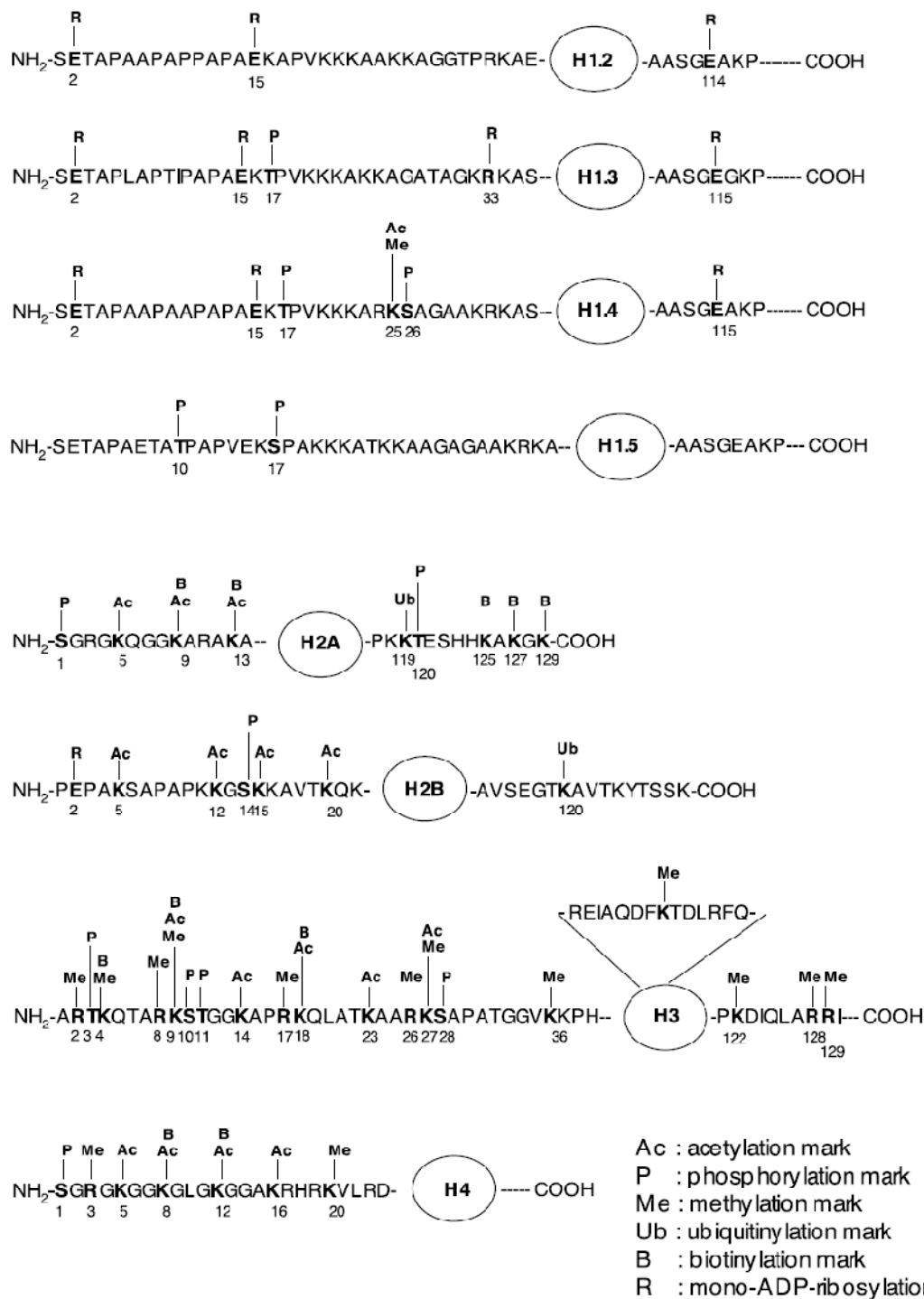


Figura 4. Schema delle modificazioni conosciute del *core* dell'istone, che includono: acetilazione, fosforilazione, metilazione, ubiquitinazione, biotinilazione, mono(ADP-ribosilazione) [Hassa et al., 2006].

Sebbene molti esempi di modificazioni siano stati identificati nel dominio centrale degli istoni, molte altre modificazioni sono state trovate nella coda N-terminale, con una preferenza per quest'ultima dovuta alla posizione protrudente dal *core* dell'istone (Figura 4) [Hassa et al., 2006].

Le molecole di mono(ADP-ribosio), che modificano istoni specifici, svolgono ruoli importanti in processi cellulari quali il *DNA repair* e la regolazione del ciclo cellulare: infatti, danni causati da agenti metilanti / alchilanti e presenza elevata di radicali OH risultano in un aumento della ribosilazione degli istoni da 2 a 12 volte, mentre quella dell'istone H1 può arrivare fino a 30 volte. A seconda del livello di danno, si può avere l'arresto del ciclo cellulare e il successivo *DNA repair* oppure, in casi estremi, l'attivazione di processi come l'apoptosi o la necrosi. Certe combinazioni di modificazione (determinate da *histone code* e da *nucleosome code*) e certi livelli di mono(ADP-ribosio) o PAR possono determinare la regolazione di *pathways*, quali la normale proliferazione / arresto del ciclo cellulare oppure la cascata di segnali apoptotici / necrotici [Hassa et al., 2006].

2.1.2 Livelli di Segnalazione (*Signaling*)

In molte *pathways* cellulari vengono prodotti mono-ADP-ribosio diversi (ADP-ribosio e ADP-ribosio ciclico) come secondi messaggeri: infatti sono documentati casi in cui queste molecole hanno un ruolo attivo in differenti processi di segnalazione nel citoplasma [Cancela, 2001; De Flora et al., 2004; Hassa et al., 2006].

Studi recenti hanno indicato che il complesso CD38/ADP-ribosio ciclasi è funzionalmente attivo in tutte le cellule dei mammiferi. Questi studi hanno anche suggerito che la sintesi di mono(ADP-ribosio) ciclici intranucleari potrebbe indurre il rilascio di Ca^{2+} dal Reticolo Endoplasmatico liscio attorno al nucleo. Questi autori hanno notato che i livelli di NAD^{+} regolano l'omeostasi alterata del Ca^{2+} nucleare, la

quale avviene durante fenomeni di *stress* metabolico. Così, l'entità dell'attività metabolica influenza processi nucleari sensibili al Ca^{2+} , come l'espressione genica e l'apoptosi attraverso questa *pathway*. In aggiunta, i mono(ADP-ribosio) liberi sono coinvolti come secondi messaggeri cruciali nella regolazione dell'omeostasi cellulare del NAD^+ [Adebanjo et al., 1999; Hassa et al., 2006].

La formazione di questi mono(ADP-ribosio) liberi è data dall'azione delle PARP quando si hanno alti livelli di PAR, come reazione delle PARP a danni genotossici: la degradazione dei PAR liberi porta a un aumento del livello di mono(ADP-ribosio) e mono(ADP-ribosio) ciclici. È stato anche visto che la quantità di mono(ADP-ribosio) liberi è anche strettamente controllata da ADP-idrolasi/pirofosfatasi, le quali idrolizzano i mono(ADP-ribosio) in AMP e D-ribosio 5-fosfato, agendo così come fattori di protezione che limitano un accumulo di mono(ADP-ribosio) [Hassa et al., 2006].

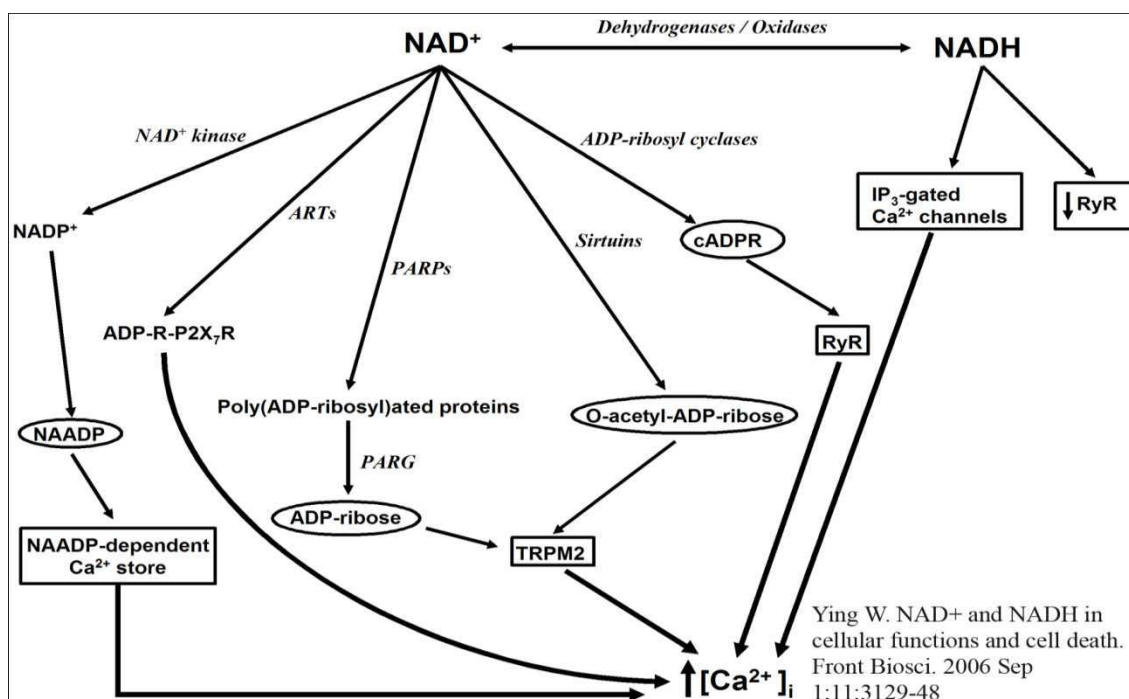


Figura 5. Implicazione del NAD^+ in molti processi cellulari che andranno a culminare nell'aumento della concentrazione dello ione calcio. Nella parte centrale si ha la conversione di mono(ADP-ribosio) e mono(ADP-ribosio) ciclico da parte delle PARP.

Anche i PAR possono svolgere un ruolo in *pathways* di segnalazione: essi sono presenti in diverse forme strutturali e possono svolgere un ruolo cruciale nel determinare i

risultati di specifiche funzioni. È stato visto che PAR liberi possono essere coinvolti in processi di segnalazione dipendente da stress; PAR, liberi o associati a proteine, possono essere reclutati e possono regolare le attività di proteine *signaling*, coinvolte in pathways come il *DNA repair* e la progressione del ciclo cellulare; inoltre, possono attivare fattori responsabili di apoptosi e necrosi, come la traslocazione nucleare di AIF. La complessità e la concentrazione di ciascun tipo di PAR può variare a seconda del contesto cellulare degli stimoli, che vengono ricevuti, e della specifica ramificazione determinata dalle differenti PARP [Hassa et al., 2006].

2.2 Struttura molecolare delle PARP

La caratterizzazione strutturale delle proteine della famiglia PARP è stata effettuata mediante una accurata ricerca in *database* proteici non ridondanti (e.g., NCBI), usando il dominio catalitico di PARP1 umana quale *sonda* (GenBank XP_037275 residui 796–1014). Mediante questa ricerca, abbiamo identificato 18 proteine umane (15 murine) che presentavano lo stesso dominio catalitico (più o meno conservato), in grado di catalizzare la sintesi di polimeri PAR [Amé et al., 2004]. I membri di tale famiglia possono essere suddivisi in 6 sottogruppi sulla base delle loro sequenze e delle attività enzimatiche/processi a cui partecipano (Figura 6): il primo sottogruppo include PARP1 (che può essere presente anche come isoforma più corta: sPARP1), PARP2 e PARP3; del secondo sottogruppo fa parte solo la PARP4 (o *vault*-PARP, vPARP), che partecipa alla formazione del complesso *vault*; nel terzo sottogruppo troviamo le Tankirasi1 e 2 (PARP5a e PARP5b, rispettivamente), che presentano il tipico dominio *ankyrin-repeat* [Hassa et al., 2006]; il sottogruppo delle macro-PARP (PARP9, PARP 14, PARP15) è specifico dell'uomo ed è caratterizzato dal dominio macro-H2A e da un Elemento di Risposta alle citochine (BAL), localizzato nel promotore [Hakmé et al., 2008a; Juszczynski et al., 2006]; il sottogruppo delle CCCH-PARP, del quale fanno parte

PARP7 (TiPARP), PARP12, PARP13, è stato identificato solo nell'uomo: queste proteine sono caratterizzate da uno *Zinc-finger domain* e da un *WWE-domain*. A questo sottogruppo possono essere assegnate anche PARP11 (poichè possiede il *WWE-domain*) e PARP8 (per la presenza di uno *Zinc-finger-domain*) [Amé et al., 2004]. Le restanti PARP (PARP6, PARP10, PARP16) hanno caratteristiche peculiari che le rendono uniche. Amé et al. (2004) hanno visto che PARP10 interagisce con altre proteine tramite l' *Ubiquitin Interaction Motif* (UIM). Inoltre, PARP10 e PARP15 presentano un motivo specifico per il legame degli RNA attraverso l' *RNA Recognition Motif* (RRM), trovato anche in differenti proteine che interagiscono con molecole di RNA, quali il complesso hnRNP (*Heterogeneous Nuclear RiboNuclear Proteins*), implicato nella regolazione dello *splicing* alternativo, ed il complesso snRNP (*Small Nuclear RiboNuclear Proteins*) [Amé et al., 2004]. Poco si conosce della struttura e funzione di PARP6 e PARP16. Kleine et al. (2008) hanno riportato che nel loro dominio catalitico non si ha la presenza del glutammato altamente conservato, che è presente negli altri membri [Kleine et al., 2008].

Il dominio catalitico nella famiglia PARP, composto da 5 β -*sheet* antiparalleli e da 4 β -*sheet* misti, è molto conservato tra i suoi membri [Ruf et al., 1996].

2.2.1 Sottogruppo I

La struttura e le funzione di PARP1 sono state oggetto di un numero notevole di studi. Essa comprende 6 domini, cui sono state assegnate particolari funzioni (Figura 6) [Amé et al., 2004]:

- Dominio A, il DNA-Binding Domain (DBD), che contiene sequenze responsabili delle interazioni tra PARP1 ed il DNA danneggiato; un dominio simile è stato trovato anche nella DNA ligase III [Petrucchio et al., 2003]. Tale dominio è formato da due motivi *zinc-finger* e da due *helix-turn-helix*. Il ruolo esatto di ciascun motivo è quello di riconoscere e legare sia il taglio nella

singola elica che quello nella doppia elica di DNA, andando ad attivare la proteina stessa. Inoltre, il motivo *zinc-finger* è responsabile della interazione con altre proteine [Hassa et al., 2006].

- Dominio B, che contiene un Segnale di Localizzazione Nucleare (NLS), responsabile del trasferimento della proteina verso il nucleo ed è anche un sito di taglio inattivante da parte della Caspasi 3 [Simbulan-Rosenthal et al., 1999];
- Dominio D, il Dominio di Automodificazione, che è responsabile della formazione dei PAR all'interno della proteina stessa; all'interno di questo dominio è presente anche un motivo BRCT, che è responsabile dell'interazione con vari fattori nucleari [Tao et al., 1999];
- dominio E (o *WGR-domain*): questo dominio è lungo 80/90 amminoacidi ed è compreso tra il dominio catalitico e il dominio di automodificazione. È chiamato WGR per i residui amminoacidici di triptofano (W), glicina (G), arginina (R), che sono molto conservati nel segmento centrale e che potrebbero garantire un legame con gli acidi nucleici [Hassa et al., 2006]. Questa regione delle PARP non è molto caratterizzata e la sua funzione non è molto conosciuta: essa è stata trovata anche nelle proteine con attività di (poli-A) polimerasi;
- Dominio F, che rappresenta il dominio catalitico tipico della famiglia.

L'analisi della struttura cristallografica del dominio catalitico di PARP1 ha dimostrato l'esistenza di una regione che lega NAD^+ , molto conservata in tutti i membri della famiglia (*PARP signature*), e formata da un motivo β - α -loop- β - α [Amé et al., 2004] (Figura 7).

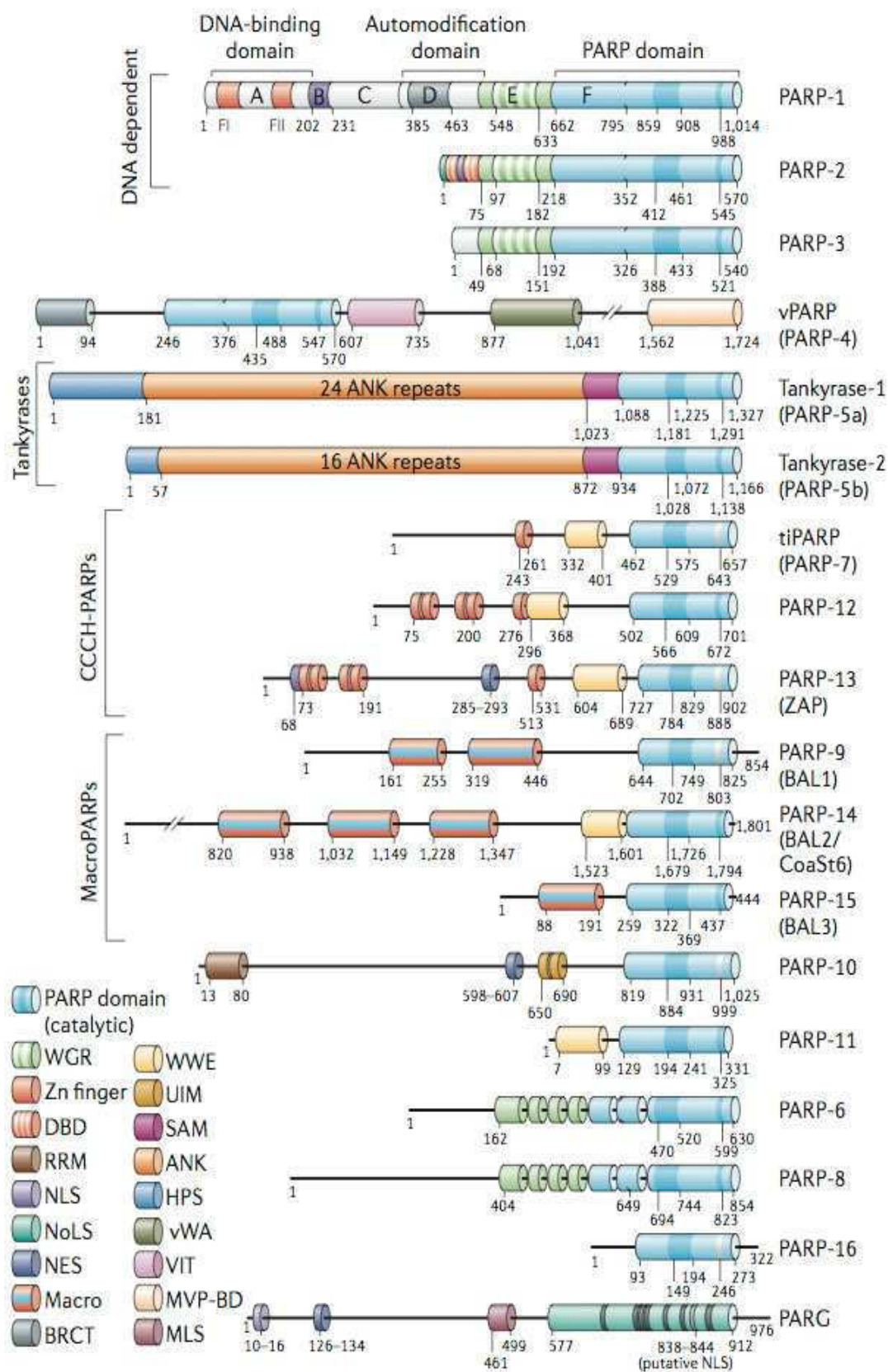


Figura 6. The PARP superfamily: rappresentazione grafica della struttura dei membri PARP [© Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004].

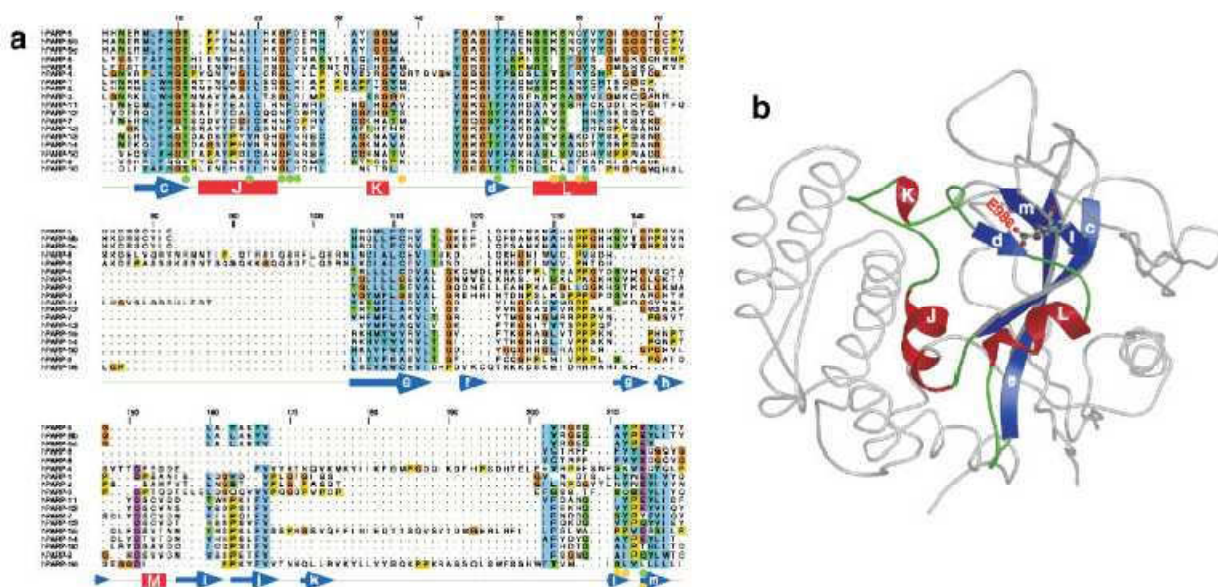


Figura 7. PARP signature. A. Allineamento multiplo dei 18 geni umani della famiglia PARP. La struttura secondaria del dominio catalitico di PARP di pollo è stata sovrapposta alle sequenze allineate: le frecce blu rappresentano i foglietti beta, i quadrati / rettangoli rossi simboleggiano le alfa eliche, mentre le linee orizzontali sono i *loops*. B. Rappresentazione della struttura terziaria del dominio catalitico [Amé et al., 2004].

Questo dominio contiene una α -elica addizionale, che trasmette il segnale di attivazione quando la proteina si lega al DNA danneggiato. La funzione del dominio C non è stata ancora determinata [Shall e Murcia, 2000; Hassa et al., 2006].

Tramite studi *knock-out*, è stato suggerito che PARP1 giochi un ruolo fondamentale in molti processi cellulari e molecolari, incluse la regolazione di *pathways* di segnalazione del danno al DNA, la modificazione della cromatina, la regolazione della trascrizione e quella delle *pathways* di morte cellulare [Shall e Murcia, 2000; Krishnakumar et al., 2010].

Questi processi sono nodi cruciali a livello fisiologico, in quanto stanno alla base di attività come il mantenimento dell'integrità genomica e la regolazione della proliferazione e differenziamento cellulare; dal punto di vista fisiopatologico, possono causare funzioni neurologiche alterate, infiammazione, degenerazione, carcinogenesi [Hassa et al., 2006].

In vivo PARP1 agisce come un fattore di sopravvivenza: topi *knock-out* risultano essere ipersensibili a radiazioni ionizzanti ed agli effetti letali di agenti alchilanti; le radiazioni γ ne provocano rapidamente la morte per tossicità acuta da radiazioni. Si è visto, infatti, che fibroblasti primari e splenociti di topi PARP1^(-/-), dopo trattamento con agenti citotossici, esibiscono una elevata frequenza di ricombinazione, amplificazione geniche, scambio di cromatidi fratelli, formazione di micronuclei [Ishizuka et al., 2003].

I meccanismi molecolari con cui PARP1 partecipa a queste *pathways* sono quattro [Hassa e Hottiger, 2008]:

- L'enzima modifica l'architettura dei nucleosomi, associandosi a chaperoni o a enzimi modificanti la cromatina e formando un complesso che riconosce il *nucleosome code* o l'*histone code* (e.g., HDAC);
- PARP1 partecipa attivamente alla formazione di un complesso multiproteico di regolazione, che si lega ad un *enhancer*;
- L'enzima è coinvolto attivamente nella sorveglianza dell'integrità del genoma;
- Una sovra-espressione della proteina, indotta da *stress* ossidativo, porta ad una notevole riduzione dei livelli di NAD⁺/ATP (necrosi cellulare) ed alla traslocazione nel nucleo del fattore che induce l'apoptosi (*Apoptosis Inducing Factor*, AIF): questa, che dipende da reazioni di poli(ADP-ribosilazione), culmina nella disfunzione cellulare ed attiva il programma di morte cellulare.

Il dominio catalitico di PARP2 è quello che ha la somiglianza maggiore con PARP1 (69% di similarità), ma in PARP2 questa regione è più vicina al sito accettore rispetto a PARP1: ciò potrebbe condizionare la scelta dei substrati. Inoltre, PARP2 modifica preferenzialmente l'istone H2B nello svolgere la funzione di controllo epigenetico della trascrizione, mentre PARP1 modifica l'istone H1. Anche PARP2 è una proteina nucleare, che si lega al DNA in seguito ad esposizione ad agenti citotossici: in questa

proteina, infatti, è stato ritrovato il DBD, che è comunque differente rispetto a quello di PARP1. All'interno di questo dominio, oltre a esserci i motivi *zinc-finger*, è presente una regione di 75 amminoacidi (dominio SAP), che è stata identificata in altre proteine localizzate nel nucleo ed è coinvolta nell'organizzazione cromosomica e nel DNA-*repair* (e.g., AP-endonucleasi e Ku70). PARP2 interagisce con PARP1 e condivide interattori comuni (e.g., XRCC1, DNA polimerasi β , DNA ligasi III) in *pathways* come la riparazione della singola elica di DNA (*Single Strand Break Repair*, SSBR) e la riparazione per escissione di basi (*Base Excision Repair*, BER). D'altra parte, PARP2 ha specifiche interazioni nella *pathway* di mantenimento dell'integrità dei telomeri, come la proteina telomerica TRF2 [Huber et al., 2004; Hassa e Hottiger, 2008; Krishnakumar et al., 2010].

Inoltre, il dominio SAP potrebbe essere coinvolto nel legame struttura-specifica o sequenza-specifica con il DNA e con l'RNA, andando a partecipare all'assemblaggio del complesso che processa il pre-mRNA. Il dominio SAP, legando gli *Scaffold Attachment Factors* A e B (SAF A/B), agisce sulle regioni cromosomiche che fanno parte dello *scaffold* o della matrice di interazione con le proteine non-istoniche (SAR) per regolare la trascrizione (Figura 6) [Aravind e Koonin, 2000; Hassa et al., 2006; Hassa e Hottiger, 2008]

PARP3 è stato identificato come un componente del centromero ed è preferenzialmente localizzato a livello dei centrioli durante la progressione del ciclo cellulare. Questa proteina mostra un segmento N-terminale più corto rispetto agli altri componenti della famiglia: i 54 amminoacidi che compongono tale estremità sono responsabili della localizzazione nella regione del centrosoma. PARP3 condivide i domini E ed F con PARP1, nei confronti della quale ha una similarità del 61% (Figura 6). L'attività di PARP3 non è molto caratterizzata, tuttavia risulta essere inibita dagli stessi inibitori di PARP1. PARP3 interagisce con PARP1 a livello del centromero, dato che suggerisce

una potenziale funzione di *checkpoint* mitotico in caso di danni al DNA [Augustin et al., 2003].

2.2.2 Sottogruppo II: PARP4 (o vPARP)

Il sottogruppo II è composto dal solo membro PARP4 (*vault*-PARP, vPARP); questa proteina possiede una struttura molecolare diversa da tutti gli altri membri, ma condivide lo stesso dominio catalitico, tipico della famiglia a cui appartiene [Amé et al., 2004].

PARP4, la più grande proteina della famiglia (193kD), si associa alle particelle *vault* a formare un complesso RiboNucleoProteico (vRNP) citoplasmatico. Assieme a PARP4, fanno parte a questo complesso altre due proteine molto conservate, come *Major Vault Protein* (MVP) e la *Telomerase Associated Protein* (TEP1), nonché diversi *noncoding RNAs*, i *vault-RNAs* (o vRNA) [Kickhoefer et al., 1999].

A differenza delle altre proteine della famiglia, il dominio catalitico (28% di similarità con il dominio F di PARP1) è localizzato nell'N-terminale della proteina. PARP4 è stata purificata come componente del vRNP ed è l'unico membro della famiglia in grado di polimerizzare mono(ADP-ribosio) e PAR. Sempre nell'N-terminale è presente un dominio contenente il motivo BRCT, che è responsabile dell'interazione con altri fattori nucleari. È stato notato che proteine che presentano tale dominio sono coinvolte in funzioni di riparazione a seguito di un danno al DNA [Amé et al., 2004].

Dopo il dominio catalitico troviamo il dominio *inter- α -trypsin*, chiamato anche dominio di tipo A del fattore di von Willebrand (VWA), il quale è responsabile delle interazioni con altri complessi multiproteici. Nell'estremità C-terminale di PARP4 troviamo il dominio che interagisce con MVP (o *MVP-Binding Domain*, MVP-BD) [Kickhoefer et al., 1999] (Figura 6).

2.2.3 Sottogruppo III: le Tankirasi

Il sottogruppo III comprende due enzimi, le tankirasi (TNKS1 e TNKS2, denominate anche PARP5a e PARP5b, rispettivamente). Questi due enzimi hanno la particolarità di presentare nell'N-terminale il dominio *ankyrin-repeat* (ARD), che è responsabile di interazioni proteina-proteina con famiglie di proteine molto diverse. PARP5a può contenere nel dominio centrale fino a 20 ankirine [Amé et al., 2004; Mosavi et al., 2004]; ARD è affiancato nell'NH-terminale da una ripetizione di 33 volte di un motivo costituito dagli amminoacidi Istidina (H), Prolina (P), Serina (S) (HPS), il quale al suo interno ospita un motivo consenso delle MAPK (PXSP). La fosforilazione di questo motivo, dopo la stimolazione da parte dell'insulina, aumenta l'attività delle TNKS suggerendo che queste proteine svolgano un ruolo importante nella segnalazione dell'insulina. Nella regione compresa tra il dominio catalitico e ARD, si ha lo *Sterile Alpha Motive* (SAM), il quale è molto diffuso nelle proteine nucleari e di segnalazione e può mediare la omo- o la eterodimerizzazione delle proteine (Figura 6) [Amé et al., 2004].

Le TNKS e TNKS2 possono essere coinvolte nella condensazione della cromatina, partecipando come proteine *scaffold* insieme ad altri complessi proteici. La Tankirasi 1 partecipa a diverse funzioni cellulari in diversi compartimenti: è associata al *Telomere-Repeat Factor* (TRF1) ed alla *Tankirase-Binding protein* (TAB) nel mantenimento della stabilità e della lunghezza dei telomeri; è associata anche ai centromeri mitotici durante l'anafase; è presente nell'Apparato del Golgi dopo stimolazione da parte dell'insulina [De Rycker et al., 2003; De Rycker e Price, 2004; Amé et al., 2004].

L'altra Tankirase, TNKS2 (PARP5b), condivide con TNKS una alta similarità di sequenza (superiore all'85%), ma è priva del motivo HPS (Figura 6). Come TNKS, anche TNKS2 interagisce con lo stesso *set* di proteine (TRF1, IRAP, Glut4, Grb14, TAB182, NuMa) e probabilmente può svolgere le stesse funzioni nell'omeostasi dei

telomeri e nella regolazione del traffico delle vescicole (trasporto del glucosio all'interno del Golgi e trasduzione del segnale dell'insulina) [Amé et al., 2004].

Entrambe le tankirasi vanno ad agire nella *pathway* di *WNT*, degradando AXIN [Huang et al., 2009].

2.2.4 Sottogruppo IV: CCCH-PARP

Questo sottogruppo è caratterizzato dalla presenza di domini con residui triptofano (W), triptofano (W), glutammato (E) (*WWE-domain*), che sono molto conservati e sono coinvolti nelle interazioni proteina-proteina con le ubiquitine; inoltre, mediano la funzione dei sistemi di coniugazione con l'ADP-ribosio (Figura 6). Questo dominio è presente, sia in singola che in multipla copia, in tutti i vertebrati e nelle piante. La sua funzione è data dal legame, assieme alle ubiquitine, con altre proteine / enzimi che partecipano alla trasduzione del segnale [Aravind, 2001].

I motivi *zinc-finger*, presenti in questo sottogruppo, sono differenti rispetto a quelli trovati in PARP1 e nella DNA-Ligasi III. [Amé et al., 2004]. I membri della famiglia *CCCH zinc-finger* sono accomunati dal fatto che presentano due ripetizioni del motivo a dita di zinco, costituite da residui di Cisteina (C) ed un residuo di Istidina (H), intervallati da altri amminoacidi non conservati con una struttura di tipo Cx8Cx5Cx3H (dove C è la Cys, H è l'His, e x rappresenta gli aa non conservati, in quantità pari al numero rappresentato nella formula di struttura) [Thompson et al., 1996]. Il dominio di PARP7, PARP 12, PARP13 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e nella fase di crescita delle cellule (Figura 6). È stato visto che anche PARP10 presenta un motivo *zinc-finger* che è coinvolto nel riconoscimento di motivi presenti nell'RNA, in modo analogo alle proteine leganti l'RNA che partecipano al complesso ribonucleoproteico e che regolano lo *splicing* [Amé et al., 2006].

2.2.4 Sottogruppo V: macroPARP

Le macroPARP (Parp9, Parp14, Parp15) sono poly(ADP-ribosio)-polimerasi contenenti il macrodominio (da uno a tre) e sono coinvolte nella regolazione della trascrizione in risposta alle citochine (Figura 6). All'interno del macrodominio è presente la variante macroH2A dell'istone corrispondente, che è responsabile della repressione della trascrizione e dell'inattivazione del cromosoma X. È interessante notare che questi macrodomini H2A possono inibire l'attività di PARP1 in specifici promotori, che devono rimanere inattivati in assenza di particolari stimoli o all'interno del cromosoma X inattivo [Hakmé et al., 2008a]. In molti studi è stato visto che proteine che contengono il macrodominio sono implicate nella repressione della trascrizione, andandosi a legare ai promotori di molti geni [Aguilar et al., 2005]. PARP9 (o BAL) possiede nella regione del promotore un elemento di risposta all'interferone- γ (INF γ): questo implica una sovraespressione del gene durante il trattamento con questa citochina e la conseguente attivazione dei geni controllati dall'INF γ . Inoltre PARP9 / BAL1, associata alla proteina BBAP della famiglia DELTEX (ubiquitine), partecipa alla *pathway Nocth-signaling* [Hakmé et al., 2008a; Cho et al., 2009].

PARP14 (BAL2 nell'uomo, *Collaboratore di Stat6* o CoaST6 nel topo) è coinvolta nell'attivazione dell'espressione dei geni attivati da Stat6: attraverso il macrodominio, PARP14 eterodimerizza con Stat6 ed attiva i geni controllati dall'interleuchina 4 (IL4) [Goenka et al., 2007; Cho et al., 2009]. In presenza di stimolazione con INF γ , PARP14 non attiva tutti i geni *target*, confermando la competitività tra Stat6 e Stat1, che è attivato dall'interferone [Goenka et al., 2007].

2.3 Ubiquitine

Le ubiquitine sono una grande famiglia di proteine coinvolte in molteplici processi cellulari, quali la modificazione post-traduzionale, la degradazione di proteine bersaglio, il *DNA-repair*, il silenziamento dei geni, il coinvolgimento in *signaling pathways*, la partecipazione all'endocitosi e la fusione di vescicole citoplasmatiche [Andersen et al., 2005]. Per svolgere questi processi cellulari, le ubiquitine interagiscono con proteine che presentano domini (o motivi) specifici. I domini più importanti sono [Andersen et al. (2005)]:

- *UBiquitin-Associated* (UBA), domini contenuti nella maggior parte delle proteine che si associano alle ubiquitine e sono coinvolti in differenti processi cellulari;
- *Ubiquitin-Interaction Motif* (UIM), motivo trovato anche in PARP10;
- *Coupling of Ubiquitin conjugation to ER* (CUE);
- GAT che comprende due motivi il GGA (associato all'Apparato del Golgi) e TOM (che ha come target Myb);
- *Ubiquitin E2Variant* (UEV);
- *Nuclear-protein-localization-gene 4 Zinc Finger* (NZF).

I processi caratterizzati in maggior dettaglio sono le modificazioni post-traduzionali (la fosforilazione, la acetilazione, la glicosilazione, la ADP-ribosilazione) e la degradazione dei *targets* mediante la formazione del proteosoma 26S [Andersen et al., 2005].

Proteine, che catalizzano l'unione tra l'ubiquitina e le proteine *target*, sono: E1 (un enzima che attiva l'ubiquitina), E2 (un enzima che coniuga l'ubiquitina), E3 (la proteina di legame). Nei casi di poli-ubiquitinazione di un bersaglio, coopera un'altra proteina, E4, che si lega efficientemente all'ubiquitina nascente e la lega ad altre [Andersen et al., 2005].

Sono due i complessi di ubiquitina e proteine associate, che sono coinvolti nell'attività proteolitica: S5a/Rpn10/Pus1 e S6/Rpn5 [Andersen et al. (2005)].

Il complesso S5a/Rpn10/Pus1 è costituito da proteine, che interagiscono non covalentemente con le ubiquitine e che contengono due motivi UIM. Nell'N-terminale di questo complesso, è stato trovato il *von Willebrand motif* (VWA) [Andersen et al. (2005)]; lo stesso dominio che è stato trovato anche in PARP4 (vPARP) (Figura 6) [Kickhoefer et al., 1999].

L'ubiquitinazione delle proteine è una modificazione post-traduzionale chiave nella regolazione dei processi effettuati nell'ambito delle *pathways* di segnalazione di NF- κ B and IRF. Durante l'ubiquitinazione, le ubiquitine sono attaccate in maniera covalente ai residui di Lisina delle proteine *substrato* [Akutsu et al., 2011].

2.4 Diabete e Citochine

Il diabete mellito di tipo 1 potrebbe essere definito una autodistruzione selettiva delle cellule β pancreatiche, mediata dal sistema immunitario, con conseguente deficienza di insulina [Atkinson, 2005; Kim e Lee, 2009]. In individui suscettibili, i linfociti T del sistema immunitario attaccano le cellule che presentano l'antigene β -specifico ed attivano il programma apoptotico. Si è visto, infatti, che in topi Diabetici Non Obesi (NOD) le isole pancreatiche sono soggette a infiltrazioni di diverse cellule del sistema immunitario e infiammatorio, come i linfociti B e T (sia $CD4^+$ che $CD8^+$), macrofagi e cellule dendritiche. Queste cellule rilasciano in prossimità dei bersagli molecole pro-infiammatorie, come le citochine, e le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), che contribuiscono alla distruzione delle cellule β . La fase iniziale dell'apoptosi delle cellule β è mediata da meccanismi contatto-dipendente e da citochine solubili [Kim e Lee, 2009].

La morte programmata viene attivata attraverso due vie alternative: la via della perforina-granzima (per mezzo dei linfociti T CD8⁺), oppure attraverso la *pathway* mediata da Fas (stimolata dai linfociti T CD4⁺). Comunque il sistema Fas/FasL da solo non può spiegare in maniera completa l'attivazione di tale programma [Kim e Lee, 2009].

È stato proposto che i linfociti T CD8⁺ lisino le cellule attraverso la citotossicità mediata da perforina, mentre i linfociti T CD4⁺ (una maggiore sorgente di IFN- γ e TNF- α) inducano l'apoptosi in collaborazione con i macrofagi (sorgente di TNF- α), agendo in sincronia in modo da aumentare la sensibilità del bersaglio e provocare anche una risposta infiammatoria [Wang et al., 1991; Kim e Lee, 2009]. È stato visto che il processo viene stimolato da una sinergia tra la citotossicità contatto-dipendente e la segnalazione tramite mediatori solubili (citochine), quali il *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α), l'*Interleukin-1 beta* (IL1 β), l'*Interferon-gamma* (INF γ). In questo processo entrano in gioco macrofagi e cellule dendritiche quale fonte principale di specie radicali (e.g., NO) ed altri mediatori citotossici solubili [Appels et al., 1989; Kim e Lee, 2009].

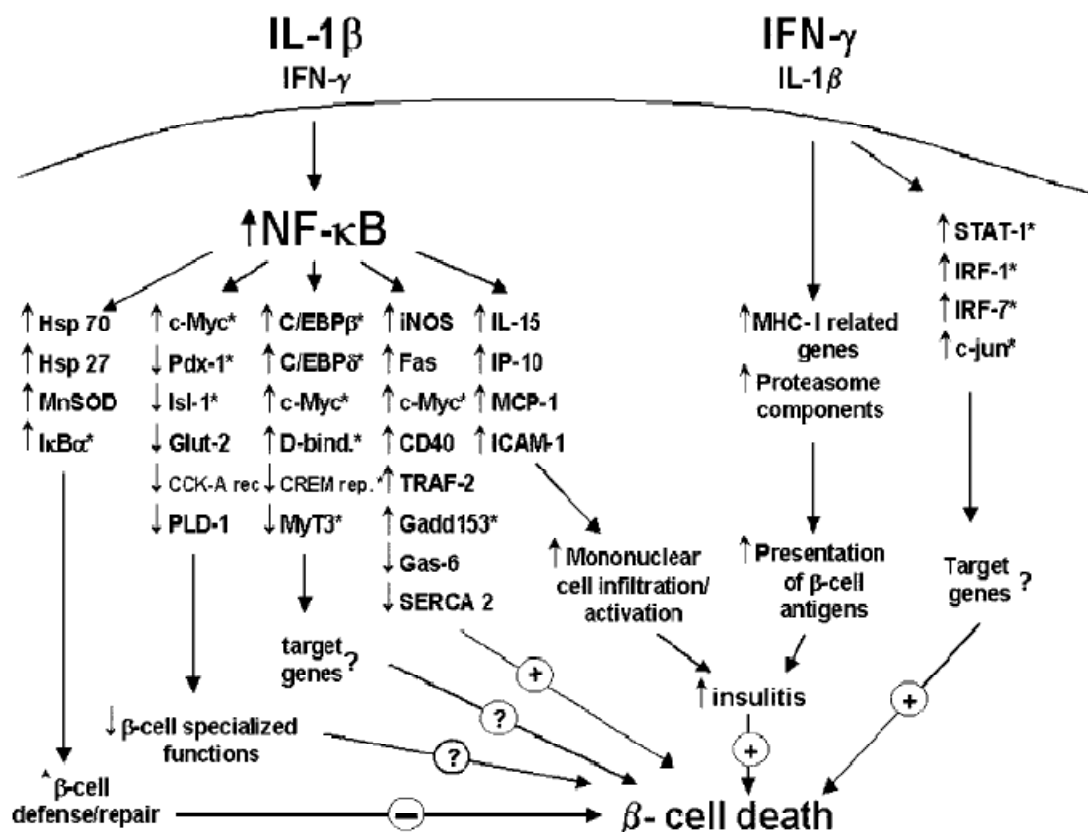


Figura 8: Modello proposto sulla base degli esperimenti di combinazione delle citochine, coinvolte nella patogenesi del Diabete Mellito di tipo 1. Nella parte sinistra di questa figura è messo in evidenza il ruolo di NF-κB (dopo stimolazione) nell'attivare fattori di trascrizione ed altri geni, coinvolti nell'apoptosi. Nella parte destra, invece, si osserva l'intervento di IFNγ nel preparare la cellula β alla morte [con l'asterisco (*) sono indicati i fattori di trascrizione] [Cardozo et al., 2001].

Sebbene queste molecole effettrici alterino il ciclo cellulare, i loro effetti sul bersaglio non sono devastanti se sono somministrate singolarmente. In alcuni lavori è stato visto che la combinazione tra IFNγ ed IL1β *in vitro* può svolgere un ruolo importante nella insorgenza del Diabete Mellito di tipo 1 (Figura 8). Alcuni ricercatori hanno suggerito che la sinergia tra IFNγ e TNFα sia un mediatore cruciale della morte cellulare e della distruzione delle cellule β: una combinazione di queste molecole, ma non di altre citochine, induce l'apoptosi caspasi-dipendente sia in cellule di insulinoma che nelle isole pancreatiche, mentre IL1β ha un minore effetto sull'insulinoma. È stato visto anche che trattamenti con IFNγ hanno lo scopo di sensibilizzare le cellule resistenti di insulinoma e pancreatiche alla stimolazione da parte di TNFα, che va ad attivare la

proteina *Signal Transducer and Activator of Transcription-1* (STAT1) [Suk et al., 2001; Schott et al., 2004; Thomas et al., 2004; Kim e Lee, 2009].

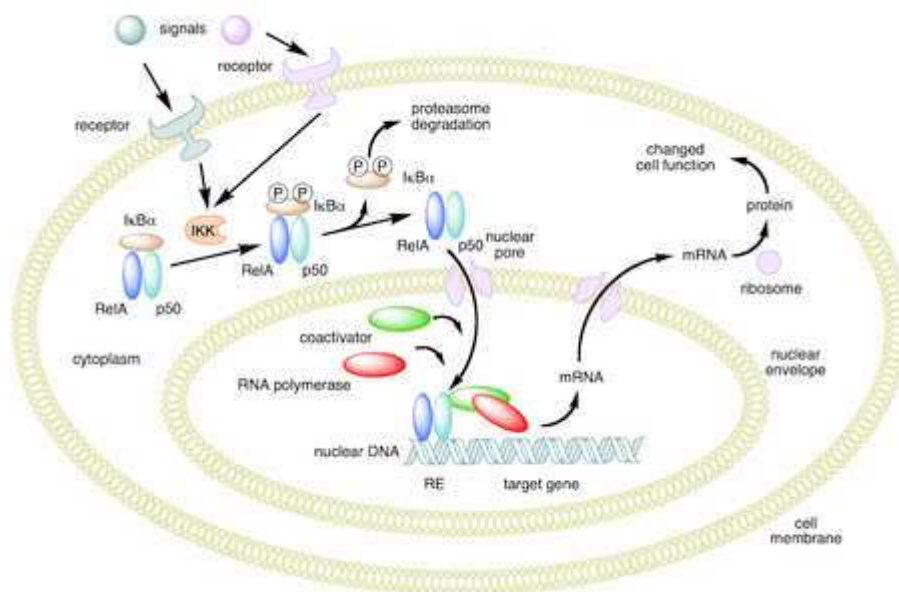


Figura 9: Meccanismo di azione di NF-κB dopo stimolazione con citochine.

L'esatto meccanismo, che si viene a innescare, è ancora poco chiaro: molti studi hanno osservato che nella risposta alle citochine è implicato il *Nuclear Factor kappa B* (NF-κB), la cui attività è stimolata da TNFα and IL-1 durante il processo apoptotico (Figura 9). È stata messa in luce la doppia funzione di NF-κB sulla regolazione della morte cellulare: l'attivazione del fattore da parte di TNFα o di IL-1 svolge un ruolo proapoptotico, soprattutto quando viene innescata la *pathway* segnalatoria di Fas o altri recettori con ruolo simile, mentre con altri membri della famiglia TNF svolge un ruolo antiapoptotico [Kim e Lee, 2009].

NF-κB è un fattore di trascrizione presente in tutti i tipi cellulari e coinvolto nella risposta agli stimoli come *stress*, citochine, radicali liberi, radiazioni ultraviolette, antigeni virali e batterici. La proteina può esistere in forma di omo- o etero-dimero, costituito da un set di alcune subunità che comprende p65 (RelA), c-Rel, RelB (le quali contengono domini trascrizionali di attivazione), p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2); queste

ultime due non contengono domini trascrizionali di attivazione. Sia NF- κ B1 che NF- κ B2 vengono sintetizzate sotto forma di grandi precursori (chiamati p105 e p100), che sono processati per dare i prodotti p52 e p50, rispettivamente. Questo processamento di p105 e p100 è mediato dalla *pathway* dell'ubiquitina / proteosoma e coinvolge la degradazione selettiva delle loro regioni C-terminali, contenenti *repeats* di ankirina [Patel e Santani, 2009].

Questi due membri NF- κ B svolgono un ruolo cruciale nella modulazione di specifiche funzioni di NF- κ B stesso: p50 e p52 in forma omodimerica costituiscono dei repressori trascrizionali di NF- κ B e partecipano all'attivazione della espressione di altri geni *target*, mentre gli eterodimeri formati da RelA, RelB, c-Rel determinano la transattivazione di NF- κ B. In aggiunta, gli omodimeri di NF- κ B1 e NF- κ B2 si legano alla proteina nucleare Bcl3, formando un potente attivatore trascrizionale [Li e Verma, 2002; Patel e Santani, 2009].

NF- κ B è espresso nel citoplasma di tutti i tipi cellulari e la sua attività è controllata da una famiglia di proteine regolatrici, chiamate *Inibitore di NF- κ B* (o I κ B) [Hayden e Ghosh, 2004]. Recenti osservazioni hanno indicato che I κ B α e I κ B γ hanno la funzione di *shuttle* tra nucleo e citoplasma all'interno del complesso NF- κ B-I κ B ed hanno la capacità di spostare NF- κ B dal sito di legame con il DNA e riportarlo nel citoplasma [Birbach et al., 2002].

Dopo trattamento con citochine (quali TNF α e IL-1), NF- κ B si attiva e trasloca nel nucleo attivando molti geni, quali iNOS, FAS, CYB5R3, CD40, *MAP kinase phosphatase*, *IP3 3-kinase*, I κ B α . L'attivazione di NF- κ B può scatenare una cascata di espressione di geni sia pro- che antiapoptotici, ma nelle cellule β si ha una predominanza di attivazione dei geni proapoptotici (Figura 9) [Cardozo et al., 2001].

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi della Struttura Genomica dei Geni della Famiglia PARP

La ricerca ed identificazione dei membri della famiglia PARP nell'uomo e nel topo è stata effettuata in NCBI (*National Center for BioTechnology Information*) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]: nella sezione *Gene* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>] sono stati identificati: *Official Gene Symbol*, *Alter Name*, *Gene ID*, *Chromosome Localization*, i confini del gene e la sua polarità (cioè, se si trova nel filamento *plus* o *minus* del DNA); mediante ricerche approfondite abbiamo identificato in *Nucleotide* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>] tutte le informazioni concernenti la struttura del gene, la sua sequenza nucleotidica, quelle dei diversi trascritti sintetizzati (è noto che molti geni codificano diverse isoforme di mRNA, la cui espressione viene regolata con specifiche modalità spazio - temporali), e la sua sequenza codificante; da *Protein* e *UniProt* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>; <http://www.uniprot.org/>] sono state ricavate le informazioni sulla struttura della proteina: *Protein Accession Number*, *Amino Acid Number*, *Molecular Weight*, struttura e funzione dei vari domini proteici.

Tramite T1Dbases [<http://t1dbase.org/page/Welcome/display>] abbiamo ricercato la sovrapposizione tra localizzazione genomica dei geni della famiglia PARP in *Homo sapiens* e *Mus musculus* e regioni di suscettibilità al Diabete Mellito, sia quello di primo tipo che quello di secondo.

Per individuare in quale compartimento cellulare risiedano le varie proteine PARP abbiamo utilizzato LocDB [<http://www.rostlab.org/services/locDB/>]: LocDB è un database molto curato, che raccoglie tutte le annotazioni sperimentali sulla localizzazione subcellulare delle proteine nell'uomo, predette con metodi *state of art*

mediante i *tools* LOCtree, WOLFPSTORT, MultiLOC2, TargetP, PredictNLS, NucPred, e confermate anche mediante verifica sperimentale nei casi in cui questa informazione fosse disponibile. Attualmente LocDB contiene informazioni per 19.604 proteine Uniprot e per ciascuna è indicata anche la classificazione *Gene Ontology* (GO) [Rastogi e Rost 2010].

Successivamente è stato effettuato l'allineamento dei domini proteici al fine di valutarne l'identità e la similarità, prendendo come riferimento quelli di PARP1. Per fare ciò è stato utilizzato il programma BioEdit, un *tool* che permette di allineare le sequenze di aminoacidi tramite ClustalW.

3.2 Analisi dei Trascritti dei Geni della Famiglia PARP

Le cellule delle isole pancreatiche di topo α TC1 (derivate da cellule di glucagonoma di topo, immortalizzate e selezionate per ceppo specifico) [Powers et al., 1999] e β TC1 (derivate da cellule di insulinoma di topo, immortalizzate e selezionate per ceppo specifico) [Efrat et al., 1988] sono state ottenute dalla *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Le α TC1 sono state fatte crescere a 37°C con 5% di CO₂ in terreno DMEM (*Dulbecco-Modified Eagle*), al quale sono stati aggiunti: 10% di siero fetale bovino, 4 mM di L-glutamina, 16 mM di glucosio, 0.1 mM di aminoacidi non essenziali, 0.02% albumina fetale bovina, 17mM di bicarbonato sodio, 15mM di HEPES. Le β TC1 sono state fatte crescere a 37°C con 5% di CO₂ in terreno DMEM, al quale sono stati aggiunti: 15% di siero di cavallo e 2.5% di siero fetale bovino.

Entrambe le linee cellulari di pancreas murino (α TC1 e β TC1) sono state stimulate con le citochine, per mimare le condizioni del sistema immunitario dopo l'esposizione dell'antigene da parte delle isole: infatti, vengono usate *Interleukin 1-beta* (IL1 β , 50U/ml), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α , 1000U/ml) e *Interferon gamma* (INF γ , 1000U/ml). Sono stati presi in considerazione due *time-points* (24 ore e 48 ore di

trattamento) e per ogni *time-point* sono state analizzate due aliquote (un controllo e un trattato).

L'RNA totale dei controlli e dei trattati di entrambi i *time-points* e di entrambe le linee è stato estratto utilizzando il *TRIzol® RNA Isolation Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo il protocollo *standard* consigliato dalla Invitrogen. L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante *High Capacity RNA to cDNA Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) secondo il protocollo consigliato dalla *Applied Biosystems*.

I *primers* per la PCR sono stati disegnati mediante il programma PerlPrimer, un *tool* che è ottimizzato per il disegno dei *primers* per *PCR standard*, *bisulphite-PCR*, *real-time PCR* e per reazioni di sequenziamento. PerlPrimer ha la capacità di prevedere i possibili dimeri di *primers*, di identificare mediante collegamento con *Spidey* la struttura del gene [5'UTR, CDS (esoni, introni, e relativi confini), 3'UTR], di allineare i *primers* alla sequenza tramite BLAST di NCBI oppure un *server* locale, di quantificare la presenza del dinucleotide GC e la temperatura di *melting* delle coppie di *primers*, di scoprire le isole CpG presenti nel gene, ed infine di disegnare i *primers* in modo tale da identificare il DNA genomico, contaminante l'RNA utilizzato per la reazione (vedi tabella 1) [Marshall, 2004].

Gene	Forward Primer	Pos	Len	Tm	Reverse Primer	Pos	Len	Tm	Amp	dG
PARG	TCTCAACAAATTCACACGAC	1882	20	58.7	TTCTCAAGTACCTTATCCCAG	2002	22	59.23	120	0
PARP1	CTCTCAATCGCTTCTACAC	2252	20	60.2	GTTGTCTAGCATCTCCACCT	2359	20	61.3	107	0
PARP2	CTCCATCCCTCCAGTAATCC	874	20	61.16	ATTCAATGTCTCCCAATGCC	954	21	61.3	80	0
PARP3	GAACCTTATCACCAATCTTCAG	717	24	61.55	GGCATCTTCTCACATCCAG	797	20	60.78	80	0
PARP4 (vPARP)	GATTTCTGCTCCAAGAACAC	768	20	59.13	CCTGAACATGACCTCCTC	861	20	59.18	93	0
PARP5a (TNKS)	GAACACCGATGGGAAATCAG	936	20	61.06	TTCTTCATTACCACTCCTAGCA	1050	22	60.92	114	0
PARP5b (TNKS2)	GGTTAATGCTTTGGATAGTCTTGG	1580	24	61.85	CTGAAGGGATATGATGTTTGGGA	1700	22	59.9	120	0
PARP6	AGCATCTTCTCACCATTC	1079	20	61.97	GAACGATTATGAAGGCGTCC	1191	20	61.19	112	0
PARP7 (TIPARP)	GAATGAAGTATGGAGGACAAGAC	1116	23	60.80	GAGTTTGAATTACTACAGGGTGG	1233	23	60.99	117	0
PARP8	ACTCCACCTTACTTTACCT	269	21	61.04	ATACGTGTGTCTGGGTAGTC	357	21	61.57	88	0
PARP9	CACATTTCACGATACCCAG	2514	20	58.91	ATTGTCTATCTGCTCCACCT	2619	20	60.35	105	0
PARP10	CTTGAAGGAACGGATGTGAC	1400	20	60.98	GACTCTGAAGCAACTTGG	1481	20	60.63	81	0
PARP11	AGACTTTGAGAAATGAAGCAG	460	22	61.75	CACAGATGTAACGAAGGCAC	557	21	61.28	97	0
PARP12	GTCCTGCAATACTAAGTTACAC	1635	22	58.80	GAGTGATCTTCTTAATCCAG	1726	22	58.25	91	0
PARP14 (Coast6)	ACACAAGGTATCTATGGGAG	3674	20	58.19	CCACTTCTTGATGATGTCC	3782	21	59.22	108	0
PARP16	TTATGAGACCAAGGAGAACGA	697	22	61.18	CCAACAGAGAAGTCTGTTCAG	816	23	61.67	119	0

Tabella 1. Elenco delle coppie di *primers* utilizzate per l'analisi dei trascritti dei geni PARP. Nella tabella sono inserite le posizioni dei *primers* sul gene (Pos), la lunghezza del *primer* (Len), la temperatura di *Melting* (Tm), le lunghezze dell'amplimero (Amp) e il grado di dimerizzazione dei *primers* (dG).

La *Real-Time PCR* è stata eseguita tramite ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per l'analisi in *Real-Time* dei trascritti è stato utilizzato il *Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ [Livak e Schmittgen, 2001].

3.3 Costruzione delle *Networks* relative ai Geni della Famiglia PARP in *Homo sapiens* ed in *Mus musculus*

Abbiamo ricostruito le *networks* biologiche, all'interno delle quali i diversi membri della famiglia PARP vengono espressi e svolgono la loro funzione sia in *Homo sapiens* che in *Mus musculus*, con un duplice scopo: (A) comprendere in modo appropriato il contesto biomolecolare nel quale queste proteine sono inserite; (B) prevedere le conseguenze patologiche sul fenotipo di alterazioni della loro espressione. Al tal fine, sono stati raccolti tutti i dati sulle connessioni tra i membri della famiglia PARP e i relativi interattori: tipo di interazione, co-espressione, co-partecipazione a processi biologici, conservazione evolutiva dell'interazione, evoluzione concorde tra due interattori [Raman 2010]. Questi dati sono stati ottenuti dai seguenti *database*:

- BioGRID [<http://thebiogrid.org>];
- HPRD [<http://www.hprd.org>];
- HumanCyc [<http://humancyc.org>];
- IntAct [<http://www.ebi.ac.uk/intact>];
- MINT [<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>];
- NCI/ nature pathway interaction databases [<http://pid.nci.nih.gov>];
- STRING [<http://string-db.org>];

- COXPRESSdp [<http://coxpresdb.jp>].

Al fine di valutare il contesto in cui operano gli interattori dei geni PARP, abbiamo ricercato i dati di co-espressione mediante COXPRESSdp (<http://coxpresdb.jp>): questo database raccoglie i dati sull'espressione genica prodotti da molti studi sperimentali, effettuati in vari organismi, tra cui *Homo sapiens* e *Mus musculus*. I dati di espressione genica vengono confrontati tra di loro mediante il coefficiente di correlazione di Pearson, calcolando il *Mutual Rank* (MR) [Obayashi e Kinoshita, 2011]. Dando come *input* i singoli membri della famiglia PARP, il database ci restituisce come *output* una lista di 300 geni con elevato MR. Tramite DAVIDdb (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>) abbiamo verificato l'appartenenza dei geni co-espressi agli stessi *clusters* di funzionalità dei geni della famiglia PARP ed abbiamo selezionato i *clusters* correlati all'apoptosi, alla risposta allo stimolo da parte delle citochine, alla *pathway* di NF- κ B.

Nella maggior parte dei *database* citati non sono presenti adeguate informazioni sulle PARP di *Mus musculus*: quindi, per effettuare l'analisi delle *networks* abbiamo utilizzato STRING 9.0, un *database* di interazioni predette e conosciute. Le interazioni sono state ricavate da associazioni dirette (o fisiche) e funzionali, da contesti genomici, esperimenti *high-throughput*, coespressione conservata e da dati di letteratura [Szkarczyk et al., 2011].

BioGRID (*Biological General Repository for Interaction Datasets*) è un *database* pubblico, che archivia e divulga dati su interazioni genetiche e proteiche in organismi modello e nell'uomo. Attualmente sono presenti 348.000 interazioni (170.000 genetiche e 178.000 proteiche), identificate sia tramite esperimenti *high-throughput* in sistemi complessi che attraverso studi centrati su specifici fenomeni biologici [Stark et al., 2010].

HPRD (*Human Protein Reference Database*) e MINT sono *database* in cui sono presenti dati di interazioni di proteine umane. Inoltre, in HPRD le interazioni tra proteine sono state ottenute tramite spettrometria di massa e *protein-microarrays*. In questo *database* sono inseriti anche i motivi aminoacidici, identificati quali *target* di fosforilazione [Keshava Prasad et al., 2009; Ceol et al., 2010].

HumanCyc (una sezione di *BioCyc collection*) è un *database* contenente dati su proteine coinvolte in molte *pathways* metaboliche dell'uomo (espressione genica, proteomica, metabolomica) [Karp et al., 2005].

IntAct è un *database* libero, che raccoglie più di 200.000 evidenze di interazioni binarie. Tra le informazioni (ricavate da dati di letteratura e dati sperimentali) sono presenti il tipo di interazione, annotazioni sugli interattori, le loro proprietà [Aranda et al., 2010].

NCI/ nature Pathway Interaction Databases è un *database* molto curato, che raccoglie dati di esperimenti *microarray* fatti su proteine di *pathway* predefinite (segnalazione molecolare, eventi regolatori, processi chiave cellulari) in modo da poter costruire una mappa completa di connessione [Schaefer et al., 2009].

Tutti i dati raccolti sono stati messi insieme e processati da Cytoscape 2.8.2, un *tool* che permette di costruire le *networks* a cui partecipano i membri della famiglia PARP [Smoot et al., 2011].

4. RISULTATI

I dati genomici sui geni della famiglia PARP in *Homo sapiens* ed in *Mus musculus* sono riportati nelle Tabelle 2 e 3. I geni del sottogruppo delle macroPARP sono tutti localizzati nella stessa regione genomica, cioè 3q21.1 nell'uomo e 16B3 nel topo.

Quasi la metà dei geni PARP umani presenta varianti trascrizionali, mentre nel topo solo PARP10 ha due isoforme. Nel caso di tiPARP, PARP8 e PARP9 umane sono state identificate varianti trascrizionali, 3 per i primi due geni e 6 per l'ultimo; gli altri 4 geni presentano solo 2 isoforme di mRNA (Tabelle 2 e 3).

Il segmento trascritto più lungo sembra essere quello di PARP4 (5485 nt nell'uomo e 6391 nt nel topo, codificati da 34 e 35 esoni, rispettivamente); le proteine codificate hanno un PM 193 kDa e sono costituite da 1724 e 1969 amino acidi (aa), rispettivamente (Tabelle 2 e 3). Il segmento trascritto più corto è rappresentato da hsPARP16 e mmPARP16 (2551 nt e 2483 nt, codificati da 6 e 7 esoni, rispettivamente), che in entrambi gli organismi codificano una proteina matura di 322 aa (PM 37 kDa) (Tabelle 2 e 3).

Abbiamo analizzato il dominio catalitico dei membri della famiglia PARP e lo abbiamo confrontato con quello di PARP1, che è stato caratterizzato in dettaglio sia strutturalmente che funzionalmente: a livello proteico, abbiamo notato la presenza di un grado di identità, che varia dal 46% (PARP2) al 21% (PARP16) (Tabelle 2 e 3); se invece valutiamo la similitudine tra le sequenze (considerando il fatto che in natura ci sono aa che hanno proprietà chimico-fisiche simili), otteniamo un *range* di similarità che va dal 69% (PARP2) al 32% (in PARP16), circa una volta e mezzo in più rispetto all'analisi precedente (Tabelle 2 e 3).

Homo sapiens										
	Gene Symbol	Alias	Gene ID	Hs Protein Accession Number	Chromosome Localization (Hs)	Number of exon (Hs)	Number of Amino Acid (Hs)	% di Identità con Dominio Catalitico di PARP1	% di Similitudine con Dominio Catalitico di PARP1	note
DNA-dipendente	PARP1	PARP	142	P09874	1q41-q42	23	1014	100	100	
	PARP2 iso1	PARP-2	10038	Q9UGN5.2	14q11.2-q12	16	583	46	69	secondo GENE Hs ha 2 iso che codificano x due prot con 13 aa di diff
	PARP2 iso2			Q9UGN5.2		16	570			
	PARP3 iso1	PARP-3	10039	Q9Y6F1	3p21.31-p21.1	11	540	39	61	tra le due iso ci sono 7 aa di diff nell'estremità NH
	PARP3 iso2			Q9Y6F1			533			
VAULT	PARP4	vaultPARP	143	Q9UKK3.3	13q11	34	1724	34	54	
TANKIRASI	PARP5a	Tankyrase	8658	O95271	8p23.1	26	1327	38	52	
	PARP5b	Tankyrase2	80351	Q9H2K2	10q23.3	27	1166	34	54	
CCCH-PARP (ZINC-FINGER)	PARP7 iso1	TIPARP	25976	Q7Z3E1	3q25.31	6	657	26	50	le tre iso differiscono nel 5'UTR
	PARP7 iso2			Q7Z3E1						
	PARP7 iso3			Q7Z3E1						
	PARP12	ZC3HDC1	64761	Q9H0J9	7q34	12	701	33	54	
	PARP13 iso1	ZC3HAV1/ZAP	56829	Q7Z2W4	7q34	13	902	23		l'iso 2 è + corta di 4 esoni all'estremità 3'; la proteina è più corta di 203 aa nel C-term
	PARP13 iso2			Q7Z2W4		9	699			
macroPARP	PARP9 iso 1	BAL	83666	Q8IXQ6	3q21	11	854	27	57	l'iso 1 è più corto nel 3' esone rispetto all'iso 2; le iso 3,4,5 e 6 hanno un Inr più a valle rispetto alle altre 2; l'iso 6 ha un esone in meno al 3'
	PARP9 iso 2			Q8IXQ6		11	854			
	PARP9 iso 3			Q8IXQ6		11	854			
	PARP9 iso 4			Q8IXQ6		11	854			
	PARP9 iso 5			Q8IXQ6		11	854			
	PARP9 iso 6			E9PFM7		10	710			
	PARP14	BAL2	54625	Q46ON5	3q21.1	17	1801	30	47	
	PARP15 iso1	BAL3	165631	Q46ON3	3q21.1	12	656	22	41	l'iso 2 è + corta di 4 esoni all'estremità 5'; la proteina è più corta di 212 aa nel N-term
	PARP15 iso2					8	444			
	PARP6		56965	Q2NL67	15q23	23	630	29	51	
	PARP8 iso1		79668	Q8N3A8	5q11.1	25	854	25	48	iso 1, più lungo, ha un esone in + nel 5'UTR; iso 3 ha un esone in meno nella CDS
	PARP8 iso2			Q8N3A8		24	854			
	PARP8 iso3			Q8N3A8		23	812			
	PARP10	PARP-10	84875	Q53GL7	8q24.3	11	1025	28	47	
	PARP11		57097	Q9NR21	12p13.3	7	331	35	58	
	PARP16		54956	Q8NSY8	15q22.31	6	322	21	32	
	PARG		8505	Q86W56.1	10q11.23	18	976			

Tabella 2: Membri della famiglia PARP nell'uomo. Nella tabella sono inseriti l'*Alter Name*, *Gene ID*, *Protein Accession Number*, la localizzazione cromosomica, la struttura genica ed aminoacidica, le percentuali di identità e similitudine dei domini catalitici, tipici della famiglia, con quello di PARP1. I colori usati e la disposizione indicano il sottogruppo, al quali i membri appartengono.

Mus Musculus										
	Gene Symbol	Alias	Gene ID	Mm Protein Accession Number	Chromosome Localization (Mm)	Number of exon (Mm)	Number of Amino Acid (Mm)	% di Identità con Dominio Catalitico di PARP1	% di Similitudine con Dominio Catalitico di PARP1	note
DNA-dipendente	PARP1	PARP	11545	P11103.3	1H5	23	1014	100	100	
	PARP2	PARP-2	11546	O88554.3	14C1	16	559	46	69	
	PARP3	PARP-3	235587	Q91YR6	9F1	11	528	39	61	
VAULT	PARP4	vaultPARP	328417	E9PYK3	14C3	35	1969	34	54	
TANKIRASI	PARP5a	Tankyrase	21951	Q6PFY9	8A4	27	1320	38	52	
	PARP5b	Tankyrase2	74493	Q3UE53	19C2	27	1166	34	54	
CCCH-PARP (ZINC-FINGER)	PARP7	TIPARP	99929	Q8C1B2	3E1	6	657	26	50	
	PARP11		101187	Q8CFD0	6F3	9	331	35	58	
	PARP12	ZC3HDC1	243771	Q88Z20	6B1	12	711	33	54	
macroPARP	PARP9	BAL	80285	Q8CAS9	16B3	11	866	27	57	
	PARP14	CoaSt6	547253	Q2EMV9	16B3	17	1817	30	47	
	PARP6		67287	Q6P6P7	9C	24	630	29	51	
	PARP8		52552	F8WIK2	13D2.3	25	891	25	48	
	PARP10 iso1	PARP-10	671535	Q8CIE4	15D3	11	960	28	47	iso 1 è + corto nel 5'UTR
	PARP10 iso2					12				
	PARP16		214424	Q7TMM8	9C	7	322	21	32	
	PARG		26430	O88622.2	14 B	17	969			

Tabella 3: Membri della famiglia PARP nel topo. Nelle tabelle sono inserite l'*Alter Name*, *Gene ID*, *Protein Accession Number*, la localizzazione cromosomica, la struttura genica e amminoacidica e le percentuali di identità e similitudine dei domini catalitici, tipici della famiglia, con quello di PARP1. I colori usati e la disposizione sono relativi al sottogruppo a cui i membri appartengono.

Tramite T1Dbase abbiamo ricercato se questi geni risiedessero in regioni candidate per la patogenesi del Diabete Mellito di tipo I e di tipo II: mediante il confronto tra le regioni presenti nel database, nessun gene PARP di *Homo sapiens* risulta localizzato né

in regioni, che danno suscettibilità a questa patologia, né in regioni che danno resistenza. Diversamente, in *Mus musculus* abbiamo visto che PARP8 e PARP11 sono in regioni che, se subiscono mutazioni, danno suscettibilità alla malattia (Tabelle 4 e 5).

Homo Sapiens							
Gene Name	Chr Band	Chr	Start	End	Strand	Resistant or Suceptibility	Dati Bibliografici
PARG	10q11.23	10	51026325	51371331	-	/	
PARP1	1q41-q42	1	226548392	226595801	-	/	maggiormente coinvolto in processi di DNA-repair indotto da agenti genotossici; promuove la necrosi per deplezione di NAD/ATP, indice l'apoptosi tramite AIF in presenza di alto livello di stress ossidativo [a]; l'azione di PARP1 è inibita da macroH2a, nel quale risiede il macro dominio tipico delle BAL proteine. [b, c]
PARP2	14q11.2-q12	14	20811773	20826063	+	/	
PARP3	3p21.31-p21.1	3	51976361	51982883	+	/	
PARP4	13q11	13	24995069	25086948	-	/	
PARP5a (TNKS1)	8p23.1	8	9413445	9639856	+	/	
PARP5b (TNKS2)	10q23.3	10	93558151	93625232	+	/	
PARP6	15q23	15	72533522	72563628	-	/	
PARP7 (Tiparp)	3q25.31	3	156392205	156424559	+	/	
PARP8	5q11.1	5	49961733	50142356	+	/	
PARP9	3q21	3	122246757	122283523	-	/	è presente nella stessa regione delle macro-PARP (o bal family) e ha un elemento di risposta nel promotore alla stimolazione da parte dell'interferon-gamma [b, d]
PARP10	8q24.3	8	145051320	145060635	-	/	
PARP11	12p13.3	12	3918027	3982608	-	/	
PARP12	7q34	7	139723549	139763521	-	/	
PARP13 (ZC3HAV1)	7q34	7	138728266	138794465	-	/	
Parp14	3q21.1	3	122399672	122449687	+	/	è presente nella stessa regione delle macro-PARP (o bal family) [d]
PARP15	3q21.1	3	122296449	122355536	+	/	è presente nella stessa regione delle macro-PARP (o bal family) [d]
PARP16	15q22.31	15	65550437	65579018	-	/	

Tabella 4: Analisi delle Posizioni dei Membri della Famiglia PARP nell'Uomo. Tramite T1DBase si è effettuata l'analisi delle posizioni dei membri della famiglia PARP, localizzati in regioni genomiche associate al Diabete Mellito. Lavori in letteratura testimoniano un coinvolgimento nell'apoptosi di alcuni membri, pur non essendo presenti in tali regioni. (Nusinow et al., 2007; Hakmé et al. 2008a; Hassa e Hottiger, 2008; Cho et al., 2009)

Mus Musculus							
Gene Name	Chr Band	Chr	Start	End	Strand	Resistant or Suceptibility	Dati Bibliografici
PARG	14 B	14	33015157	33110736	+	resistance	
PARP1	1 98.6 cM	1	182499106	182531385	+	/	maggiormente coinvolto in processi di DNA-repair indotto da agenti genotossici; promuove la necrosi per deplezione di NAD/ATP, indice l'apoptosi tramite AIF in presenza di alto livello di stress ossidativo [a]; l'azione di PARP1 è inibita da macroH2a, nel quale risiede il macro dominio tipico delle BAL proteine. [b, c]
PARP2	14 19.5 cM	14	51427621	51440975	+	/	
PARP3	9	9	106372684	106378982	-	/	
PARP4	14	14	57194456	57278635	+	/	
PARP5a (TNKS1)	8 18.0 cM	8	35892233	36028744	-	/	
PARP5b (TNKS2)	19	19	36908722	36967967	+	/	
PARP6	9 C	9	59465091	59498076	+	/	
Parp7 (Tiparp)	3	3	65332369	65359440	+	/	
Parp8	13 71.0 cM	13	117643631	117814323	-	susceptibility	
PARP9	16	16	35938556	35972691	+	/	è presente nella stessa regione delle macro-PARP (o bal family) e ha un elemento di risposta nel promotore alla stimolazione da parte dell'interferon-gamma [b, d]
PARP10	15	15	76063425	76073870	-	/	
Parp11	6	6	127403741	127444257	+	susceptibility	
Parp12	6	6	39036411	39068348	-	/	
Parp14 (CoaSt6)	16	16	35832964	35871468	-	/	è presente nella stessa regione delle macro-PARP (o bal family) [d]
Parp16	9	9	65062497	65087026	+	resistance	

Tabella 5: Analisi delle Posizioni dei Membri della Famiglia PARP nel topo. Tramite T1DBase, si è effettuata l'analisi delle posizioni dei membri della famiglia PARP, localizzati in regioni genomiche associate al Diabete Mellito (DM): solo PARP8 e PARP11 si trovano in regioni che conferiscono suscettibilità al DM. Numerose pubblicazioni testimoniano un coinvolgimento nell'apoptosi di diversi geni PARP, pur non presenti in tali regioni (Nusinow et al., 2007; Hakmé et al., 2008a; Hassa e Hottiger, 2008; Cho et al., 2009).

Successivamente, per mezzo di LocDB, abbiamo determinato la localizzazione subcellulare delle proteine in *Homo sapiens* (Tabella 6).

Localizzazione delle Proteine della Famiglia PARP in <i>Homo sapiens</i> secondo LocDB			
Gene	Predetta	Dati letteratura	Metodi Usati
PARP1	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica	nucleo e nucleolo	Spettrometria di Massa
PARP2	nucleare, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica	nucleo e nucleolo	
PARP3	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica	nucleo, nucleolo, citoscheletro, centromero e centriolo	Spettrometria di Massa
PARP4	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica	nucleo, nucleolo, citoscheletro, centromero e centriolo	
PARP5a (TNKS)	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica, RE	membrana periferica, nucleo, complesso poro nucleare, mantenimento telomeri (potenziale), citoplasma, membrana dell'Apparato del Golgi	
PARP5b (TNKS2)	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica, RE	membrana periferica, nucleo, complesso poro nucleare, mantenimento telomeri (potenziale), citoplasma, membrana dell'Apparato del Golgi	
PARP6	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica, RE	nucleo	Cromatografia Liquida e Spettrometria di massa
PARP7 (tiparp)	nessuna informazione	nessuna informazione	
PARP8	nessuna informazione	nessuna informazione	
PARP9 (bal)	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica, RE	nucleo	
PARP10	nessuna informazione	nucleo, nucleolo, citoplasma (probabilmente)	Cromatografia Liquida e Spettrometria di massa
PARP11	nessuna informazione	nessuna informazione	
PARP12	nessuna informazione	nucleo (probabilmente)	
PARP14 (CoStat6)	nucleare, legame con il DNA, citoplasmatica, perossisomiale, lisosomiale, mitocondrio, Apparato del Golgi, membraba plasmatica, RE	vacuoli, lisosomi	
PARP16	nessuna informazione	Proteina di membrana a singolo passaggio	

Tabella 6: Localizzazione delle proteine PARP nei vari compartimenti cellulari. Localizzazione delle proteine della famiglia PARP tramite il database LocDB: nella prima colonna si hanno le posizioni predette dai *tools* LOCTree, WOLFPSORT, MultiLOC2, TargetP, PredictNLS, NucPred; nella seconda colonna sono riportate le localizzazioni secondo dati di letteratura.

Per mezzo di *tools* di predizione (vedi sopra e la sezione di “Materiali e Metodi”), abbiamo voluto analizzare la posizione delle proteine mature: in tutti i membri, di cui è disponibile il risultato, è stata predetta una posizione nucleare e citoplasmatica, in particolare nelle vescicole, nell’Apparato del Golgi, nel reticolo endoplasmatico e nei

mitocondri (Tabella 6). Per alcune di queste PARP (PARP3 PARP4, PARP9, PARP14, le Tankirasi) è descritta anche l'interazione con il DNA (Tabella 6). Dai dati di letteratura si evince che la quasi totalità delle PARP analizzate mostra una localizzazione nucleare e nucleolare, con l'esclusione di PARP14, che è stata identificata nelle vescicole citoplasmatiche (lisosomi e vacuoli) (Tabella 6). Soltanto le due Tankirasi (TNKS e TNKS2, ovvero PARP5a e PARP5b, rispettivamente) sono state associate ai pori nucleari, alle membrane citoplasmatiche ed all'Apparato del Golgi (Tabella 6).

Per valutare l'espressione dei geni PARP, abbiamo trattato cellule α TC1 e β TC1 con TNF α , IL1 β , INF γ , ed abbiamo considerato due *time-points* per ogni linea cellulare. Facendo il confronto tra Trattato vs Controllo, abbiamo notato una generale sovra-espressione dei geni PARP nelle cellule trattate con citochine rispetto ai controlli (Tabelle 7 e 8, a e b). Alle 24 ore, si può osservare che si ha una sovra-espressione di PARP3, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14, comune alle cellule α e β , che mostrano un profilo di espressione molto simile (Tabella 7, a e b). In aggiunta, le β TC1 mostrano anche una sovra-espressione di PARG, PARP2, PARP4, TNKS, TNKS2, PARP6, tiPARP, PARP8, PARP16. Alle 48 ore, nelle β TC1 i geni della famiglia PARP mantengono un *trend* generale di sovra-espressione, con l'esclusione di TNKS2 (che ha una espressione simile al controllo). D'altro canto, nelle α TC1 vengono sovra-esprese anche PARG, PARP2, PARP4, TNKS, TNKS2, tiPARP, PARP8 (Tabella 8, a e b). Questo dato suggerisce che nelle cellule α si ha un ritardo di 24 ore nella regolazione di alcune PARP, mentre altre vengono attivate subito in risposta alle citochine.

24 ore					
Sample	Gene	Replica1	Replica2	Media	dev stand
alphaTC1	Parg	1.086825258	1.335363952	1.211094605	0.124269347
	PARP1	1.382653831	1.305944874	1.344299352	0.038354478
	PARP2	1.096457582	1.167065069	1.131761325	0.035303744
	PARP3	7.490058569	7.8531312	7.671594885	0.181536315
	PARP4	1.228454991	1.510866301	1.369660646	0.141205655
	PARP5a (TNKS1)	-1.266514856	1.012230605	-0.127142126	1.139372731
	PARP5b (TNKS2)	-2.441204238	1.041376676	-0.699913781	1.741290457
	PARP6	1.066222846	1.144790813	1.10550683	0.039283984
	Parp7 (Tiparp)	-1.421143265	-1.119397942	-1.270270604	0.150872662
	Parp8	1.417033632	-1.033425222	0.191804205	1.225229427
	PARP9	27.90806125	24.06197236	25.98501681	1.923044445
	PARP10	6.466450412	10.79650156	8.631475986	2.165025574
	Parp11	3.070388046	3.926228125	3.498308086	0.427920039
	Parp12	5.03815672	6.592035446	5.815096083	0.776939363
	Parp14 (CoaSt6)	509.1553152	2151.018176	1330.086745	820.9314302
	Parp16	1.160844717	1.163126491	1.161985604	0.001140887

24 ore					
Sample	Gene	Replica1	Replica2	Media	dev stand
betaTC1	Parg	1.412624477	2.309696035	1.861160256	0.448535779
	PARP1	1.280758974	1.239800508	1.260279741	0.020479233
	PARP2	1.652715043	1.731644763	1.692179903	0.03946486
	PARP3	15.55226714	24.19374166	19.8730044	4.32073726
	PARP4	5.011755382	6.978930671	5.995343026	0.983587644
	PARP5a (TNKS1)	3.427118317	2.781357129	3.104237723	0.322880594
	PARP5b (TNKS2)	2.943757846	2.167052342	2.555405094	0.388352752
	PARP6	2.018531359	3.134966442	2.576748901	0.558217542
	Parp7 (Tiparp)	1.656403321	1.94139812	1.79890072	0.1424974
	Parp8	4.179751002	5.228891013	4.704321007	0.524570005
	PARP9	26.60714851	52.81229752	39.70972302	13.1025745
	PARP10	19.68917832	23.5031301	21.59615421	1.906975892
	Parp11	8.457691863	9.475506089	8.966598976	0.508907113
	Parp12	12.70039973	19.32554239	16.01297106	3.312571327
	Parp14 (CoaSt6)	471.8439517	549.425477	510.6347144	38.79076266
	Parp16	2.990755558	3.208179803	3.09946768	0.108712123

Tabella 7: Analisi dei trascritti dopo 24 ore di trattamento. Analisi dell'espressione in *real-time* dei geni della famiglia PARP nelle linee cellulari pancreatiche di topo α TC1 (A) e β TC1 (B) dopo 24 ore di trattamento con citochine. I Ct dati sono stati elaborati con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I trascritti che hanno un *fold change* <-1.5 vengono considerati sotto-espressi (rappresentati in verde), mentre quelli con *fold change* >1.5 sono considerati sovra-espressi (rappresentati in rosso) (**P-value**<0.05).

48 ore					
Sample	Gene	Replica1	Replica2	Media	dev stand
alphaTC1	Parg	3.23336864	2.794451236	3.013909938	0.219458702
	PARP1	1.383597893	1.37406476	1.378831326	0.004766567
	PARP2	3.509031747	2.442438101	2.975734924	0.533296823
	PARP3	16.91218314	3.662333063	10.2872581	6.624925041
	PARP4	4.697545059	1.17714823	2.937346644	1.760198414
	PARP5a (TNKS1)	3.541599316	1.754016112	2.647807714	0.893791602
	PARP5b (TNKS2)	2.088863181	1.000259271	1.544561226	0.544301955
	PARP6	2.248657599	-1.126367022	0.561145289	1.68751231
	Parp7 (Tiparp)	1.929735343	1.33179682	1.630766081	0.298969262
	Parp8	4.936628223	1.387253074	3.161940649	1.774687575
	PARP9	28.07455013	23.1232936	25.59892187	2.475628265
	PARP10	6.085589412	12.56575107	9.32567024	3.240080828
	Parp11	4.544460394	1.597154635	3.070807515	1.473652879
	Parp12	14.06257612	1.532523291	7.797549703	6.265026412
	Parp14 (CoaSt6)	1672.019549	1564.729977	1618.374763	53.64478585
	Parp16	2.012099989	-5.228727918	-1.608313964	3.620413953

48 ore					
Sample	Gene	Replica1	Replica2	Media	dev stand
betaTC1	Parg	2.232649836	1.444374645	1.838512241	0.394137596
	PARP1	1.301173188	1.325820072	1.31349663	0.012323442
	PARP2	1.862260633	1.871852816	1.867056725	0.004796091
	PARP3	35.56477176	21.43126346	28.49801761	7.066754153
	PARP4	2.873055774	3.897283821	3.385169798	0.512114023
	PARP5a (TNKS1)	3.31134654	1.992985205	2.652165872	0.659180668
	PARP5b (TNKS2)	1.606094744	1.368334546	1.487214645	0.118880099
	PARP6	3.66663841	2.352340656	3.009489533	0.657148877
	Parp7 (Tiparp)	1.654973367	1.36252056	1.508746963	0.146226403
	Parp8	5.779200809	4.46905562	5.124128215	0.655072595
	PARP9	45.18318293	42.25388237	43.71853265	1.464650283
	PARP10	12.60704279	3.236528034	7.921785412	4.685257378
	Parp11	7.178955725	8.472759978	7.825857851	0.646902127
	Parp12	18.7469371	7.722601887	13.23476949	5.512167605
	Parp14 (CoaSt6)	280.8272259	209.7821331	245.3046795	35.52254642
	Parp16	3.252468309	1.31607253	2.28427042	0.968197889

Tabella 8: Analisi dei trascritti dopo 48 ore di trattamento Analisi dell'espressione in *real-time* dei geni della famiglia PARP nelle linee cellulari pancreatiche di topo α TC1 (A) e β TC1 (B) dopo 48 ore di trattamento con citochine. I Ct dati sono stati elaborati con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I trascritti che hanno un fold change <-1.5 vengono considerati sottoespressi (rappresentati in verde); mentre quelli con fold change >1.5 sono considerati sovra espressi (rappresentati in rosso) (P-value < 0.05).

Nelle α TC1 si assiste ad un aumento di espressione di PARG, PARP2, PARP3, PARP4, TNKS, TNKS2, tiPARP, PARP8, PARP12, PARP14 tra le 24 e le 48 ore, mentre rimane stabile quella di PARP9, PARP10 e di PARP11. Nelle β TC1, PARG, PARP2, TNKS, tiPARP, PARP8 mantengono uno stesso *trend* di espressione nei due *time-points*, mentre diminuisce l'espressione di PARP4, PARP10 e PARP14; i livelli di TNKS2 sono paragonabili al controllo.

C'è anche da sottolineare che PARP3, PARP9 e PARP14 sono i trascritti che mostrano il livello più alto in entrambe le linee e in entrambi i *time-points*: PARP3 è di 9 e di 24 volte maggiore rispetto al controllo nelle α TC1 nelle β TC1, rispettivamente; i livelli di PARP9 sono di 25.7 e di 41.7 volte superiori rispetto allo *steady state* dei rispettivi controlli; PARP14 è espressa circa 1400 e 370 volte di più, rispetto allo *steady state* nei controlli.

Tramite COXPRESSdb abbiamo visto quali geni PARP sono co-espressi: PARP3 è co-espresso con PARP4, PARP9, PARP14 (Mutual Range, MR, di coespressione pari a 35.2, 274.3, 46.6, rispettivamente); PARP9 è co-espresso con PARP14, PARP12, Dtx3l (MR di coespressione di 2.8, 32.2, 2.5, rispettivamente).

Se prendiamo in considerazione l'espressione alle 24 ore, appare molto evidente che si hanno PARP con una regolazione alterata in comune nelle due linee (PARP3, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14), e PARP con una regolazione alterata specifica solo nelle β TC1 (PARP2, PARP4, TNKS, TNKS2, tiPARP, PARP8). Per ogni membro della famiglia PARP abbiamo identificato i geni, che sono co-espressi, tramite DAVIDdb e ne abbiamo verificato l'eventuale appartenenza a *clusters* funzionali, quali la risposta alle citochine, stimoli infiammatori, regolazione dell'apoptosi.

Considerando i geni coinvolti nell'apoptosi, si può osservare che PARP2 presenta una forte co-espressione con i geni Ddx20, Bclaf1, Ercc3, Atm, Ccar1 (con MR pari a 31.8, 146.2, 212.9, 254.6, 270.1, rispettivamente); PARP3 con i geni Bcl6, Card11, Bcl3,

Casp12, Card6, Traf1, Tradd, Nfkbid, Nod1, Birc3 (con MR pari a 14.8, 35.2, 95.2, 146.5, 161.1, 167.6, 215.7, 263.6, 302.8, 429.1, rispettivamente) (Tabella 9); tiPARP con i geni Tnfaip3, Nfkbia, Trp53inp1, Stat3, Rel, Bcl2l1, Raf1, Birc3, Mcl1, Birc2 (con MR pari a 52, 53.3, 61, 79.4, 132.6, 162.3, 250.3, 259, 427.8, 438.3, rispettivamente); PARP8 con i geni Jak2, Bcl6, Tnfaip3, Birc2, Atm (con MR pari a 76.8, 251.1, 495.1, 559, 637.6, rispettivamente); PARP9 con i geni Pml, Birc3, Tnfsf10, Bcl3, Casp4, Ifih1, Casp1, Ptpn6, Nod1, Fas, Casp8 (con MR pari a 41.4, 46.6, 114.9, 122, 157.7, 198.4, 203.7, 213.4, 258.6, 282.3, 306.7, rispettivamente) (Tabella10); PARP11 con i geni Pml, Traf3, Traf5 (con MR pari a 87.9, 144.9, 224.2, 438.3, rispettivamente); PARP12 con i geni Pycard, Eif2ak2, Naip5, Ahr, Cflar, Tnfsf10, Casp1, Nod1, Sgk1, Naip2, Casp4, Srgn, Casp7, Fas (con MR pari a 30.5, 78.1, 87.1, 96.2, 112.1, 157.6, 186.8, 195.8, 220.2, 247, 270.1, 322.8, 332.5, 360.1, rispettivamente) (Tabella 11). Inoltre, è stata osservata una notevole co-espressione di PARP3 coi geni Card11, Tlr3, Card6, Tradd, Nfkbid, Nod1 (con MR pari a 35.2, 128.6, 161.1, 215.7, 263.6, 302.8, rispettivamente), coinvolti nella *pathway* di NF- κ B, e con i geni Tlr3, Irf9, Irf2, Tnfrsf13c, Irf5, Nod1, Irf8 (con MR pari a 128.6, 170.2, 178.3, 211.8, 287, 302.8, 314.1, rispettivamente), coinvolti nella risposta alle citochine (Tabella 12).

Regolazione Apoptosi (PARP2)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Prkdc	protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	30.2
Ddx20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	31.8
Utp11l	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)	61.6
Rbm5	RNA binding motif protein 5	62.7
Psmg2	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2; similar to Clast3 protein	69.2
Thoc1	THO complex 1	70.8
Zc3hc1	zinc finger, C3HC type 1	98.7
Bclaf1	BCL2-associated transcription factor 1	146.2
Ercc3	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	212.9
Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	254.6
Ccar1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	270.1
Rps3a	predicted gene 10119; predicted gene 13408; predicted gene 7600; ribosomal protein S3A; similar to 40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein); predicted gene 9058; predicted gene 8960; predicted gene 5586	288.9
Mlh1	mutL homolog 1 (E. coli)	345.5

Regolazione dell'Apoptosi (PARP3)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	14.8
Card11	caspase recruitment domain family, member 11	35.2
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3	95.2
Lta	lymphotoxin A	98.2
Casp12	caspase 12; hypothetical protein LOC100044205	127.3
Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9	146.5
Card6	caspase recruitment domain family, member 6	161.1
Traf1	TNF receptor-associated factor 1	167.6
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	181.6
Tradd	TNFRSF1A-associated via death domain	215.7
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	239.9
Nfkbid	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta	263.6
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	264.5
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	302.8
Ltb	lymphotoxin B	353.7
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase	403.7
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	429.1

Tabella 9: Lista dei geni co-espressi con PARP2 e PARP3 e coinvolti nell'Apoptosi.

Coinvolti nell'Apoptosi (tiPARP)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Csrnp1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	32.7
Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	52
Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	61
Topors	topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	108.7
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	162.3
Raf1	v-raf-leukemia viral oncogene 1	250.3
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	259
Pdcd6ip	programmed cell death 6 interacting protein	349.1
Phf17	PHD finger protein 17	405.8
Mcl1	similar to myeloid cell leukemia sequence 1; myeloid cell leukemia sequence 1	427.8
Rnf34	ring finger protein 34	428.7
Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	438.3
Purb	purine rich element binding protein B	454.4
Rock1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1	469.7

Coinvolti nell'Apoptosi (PARP8)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Csrnp2	cysteine-serine-rich nuclear protein 2	31.8
Jak2	Janus kinase 2	76.8
Gramd4	GRAM domain containing 4; hypothetical protein LOC100045216	233.2
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	251.1
Eya2	eyes absent 2 homolog (Drosophila)	295.4
Trim39	tripartite motif-containing 39	319.2
Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	495.1
Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	559
Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	637.6
Tia1	cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	677.6
Thoc1	THO complex 1	748.9
Malt1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	755.8

Regolazione dell'Apoptosi (PARP9)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Gzmb	granzyme B	17
Pml	promyelocytic leukemia	41.4
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	46.6
Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	114.9
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3	122
Pnp	similar to purine nucleoside phosphorylase; purine-nucleoside phosphorylase 1	157.7
Lst1	leukocyte specific transcript 1	162.7
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase; hypothetical protein LOC100044206	169.5
Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1	198.4
Casp1	caspase 1; hypothetical protein LOC100044207	203.7
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	213.4
Sp110	predicted gene 15753; Sp110 nuclear body protein	227.9
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	258.6
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	282.3
Casp8	caspase 8	306.7
Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	322.2
Mthfs	5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase; predicted gene 2372; predicted gene 2382	355.5
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase	392.3

Tabella 10: Lista dei geni co-espressi con tiPARP e PARP9 e coinvolti nell'Apoptosi.

Coinvolti nell'Apoptosi (PARP11)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Blcap	predicted gene 3852; bladder cancer associated protein homolog (human)	294.6
Daxx	Fas death domain-associated protein	313.6
Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	304.8
Fem1b	feminization 1 homolog b (C. elegans)	418.1
Madd	MAP-kinase activating death domain	117.6
Pak2	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	76.7
Pml	promyelocytic leukemia	87.9
Pura	similar to hCG45299; purine rich element binding protein A	144.9
Traf3	TNF receptor-associated factor 3	224.2
Traf5	TNF receptor-associated factor 5	438.3

Coinvolti nell'Apoptosi (PARP12)		
ID	Gene Name	MR for Parp
Xaf1	XIAP associated factor 1	28.8
Pycard	PYD and CARD domain containing	30.5
Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	78.1
Naip5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5	87.1
Ahr	aryl-hydrocarbon receptor	96.2
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator pseudogene; CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	112.1
Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	157.6
Casp1	caspase 1; hypothetical protein LOC100044207	186.8
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	195.8
Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	220.2
Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1, related sequence 1; NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	247
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase; hypothetical protein LOC100044206	270.1
Srgn	serglycin	322.8
Casp7	caspase 7	332.5
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	360.1

Tabella 11: Lista dei geni co-espressi con PARP11 e PARP12 e coinvolti nell'apoptosi.

Risposta allo stimolo delle citochine		
ID	Gene Name	MR for Parp
Fcεr2a	Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide	120.1
Tlr3	toll-like receptor 3	128.6
Cd19	CD19 antigen	169.4
Irf9	interferon regulatory factor 9	170.2
H2-DMA	histocompatibility 2, class II, locus DMA	174.5
Irf2	interferon regulatory factor 2	178.3
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	181.6
Cr2	complement receptor 2	186.7
Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha	194.7
Il16	interleukin 16	200.3
Tnfrsf13c	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	211.8
H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3	226.6
Sash3	SAM and SH3 domain containing 3	239.5
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	239.9
Clec2i	C-type lectin domain family 2, member i	286.2
Irf5	interferon regulatory factor 5	287
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	302.8
Cd55	CD55 antigen	313.6
Irf8	interferon regulatory factor 8	314.1

Coinvolti nella Pathway NF-κB		
ID	Gene Name	MR for Parp
Card11	caspase recruitment domain family, member 11	35.2
Lta	lymphotoxin A	98.2
Tlr3	toll-like receptor 3	128.6
Card6	caspase recruitment domain family, member 6	161.1
Tradd	TNFRSF1A-associated via death domain	215.7
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	239.9
Nfkbid	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta	263.6
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	302.8
Ltb	lymphotoxin B	353.7

Tabella 12: Lista dei geni co-espressi con PARP3 e coinvolti nella Risposta alle Citochine e nella pathway di NF-κB.

PARP4, TNKS, TNKS2 sono poco coinvolti nei *clusters* funzionali finora analizzati, mentre COXPRESSdb non presenta dati di co-espressione per le PARP10 e PARP14 di *Mus musculus*.

Mediante il database STRING 9.0, abbiamo identificato gli interattori di PARP1, PARP9, PARP10, PARP12, PARP14 (figura 10): questa *network* è stata costruita

maggiormente con i dati di co-espressione delle proteine, cui sono stati aggiunti dati di letteratura, di omologia e sperimentali (quando disponibili). In questa figura, si può osservare che PARP9, PARP10, PARP12 e PARP14, oltre a essere legate dall'omologia, condividono anche una certa co-espressione.

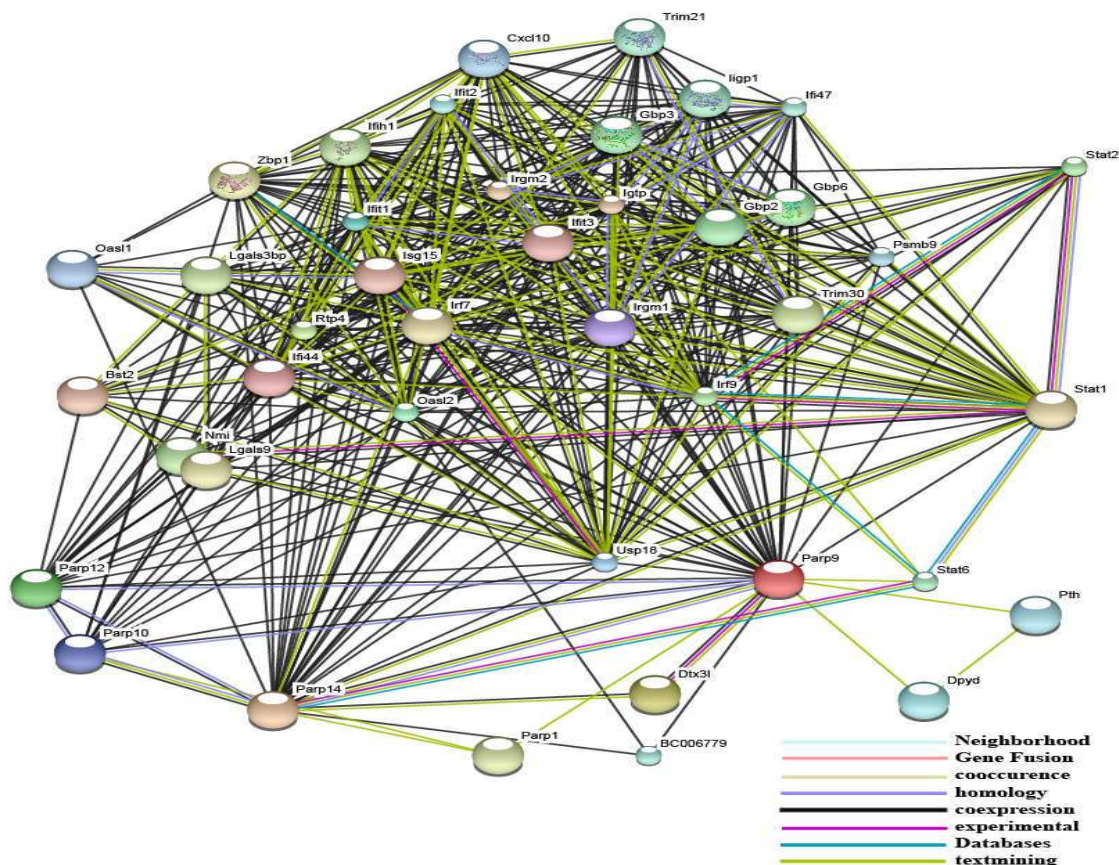


Figura 10: Network predetta delle PARP nel topo tramite String 9.0. La Network mostra il collegamento di PARP1, PARP9, PARP10, PARP12, PARP14 con altre proteine. I collegamenti mostrati nella leggenda rappresentano nell'ordine: la vicinanza nel cromosoma (*Neighborhood*), la fusione tra i due geni (*Gene Fusion*), la co-partecipazione agli stessi processi (*co-occurrence*), l'omologia di sequenza (*homology*), la coespressione di proteine (*co-expression*), dati sperimentali (*experimental*), dati tratti da altri Database (*Database*) e dati di letteratura (*text mining*)

Come suggerito da Hakmé et al. (2008a), PARP9 si lega alle ubiquitine, in particolare a Dtx3l, per partecipare alla regolazione dell'espressione di molti geni modulati dalla via di Stat 1 (Hakmé et al., 2008a). Invece PARP14 dimerizza con Stat6 e interviene in tutti i processi in cui è coinvolto lo stesso fattore di trascrizione (Cho et al., 2009).

Inoltre, abbiamo osservato che le PARP entrano a far parte della risposta agli stimoli esterni (Figura 11): dopo stimolazione vengono attivate le vie di Stat1 e Stat6, nelle

quali sono coinvolte i rispettivi *partners* PARP9 e PARP14, altre proteine indotte dall'interferone (Ifi44, Ifi47, Ifit1, Ifit2, Irf7) e le ubiquitine. Inoltre, abbiamo osservato come si comporta la *network* dopo stimolazione con le citochine (Figura 12): a seconda della combinazione di citochine presenti, viene attivata una delle due vie di regolazione della trascrizione, coordinate da Stat1 o da Stat6. Un simile risultato si è visto dopo la stimolazione da parte dell'interferone, con la differenza che in questa *network* vengono coinvolti Ifit1, Ifit2 e, come suggerito da Hakmé et al. (2008a), si ha l'azione di PARP9/Dtx3l (Figura 13).

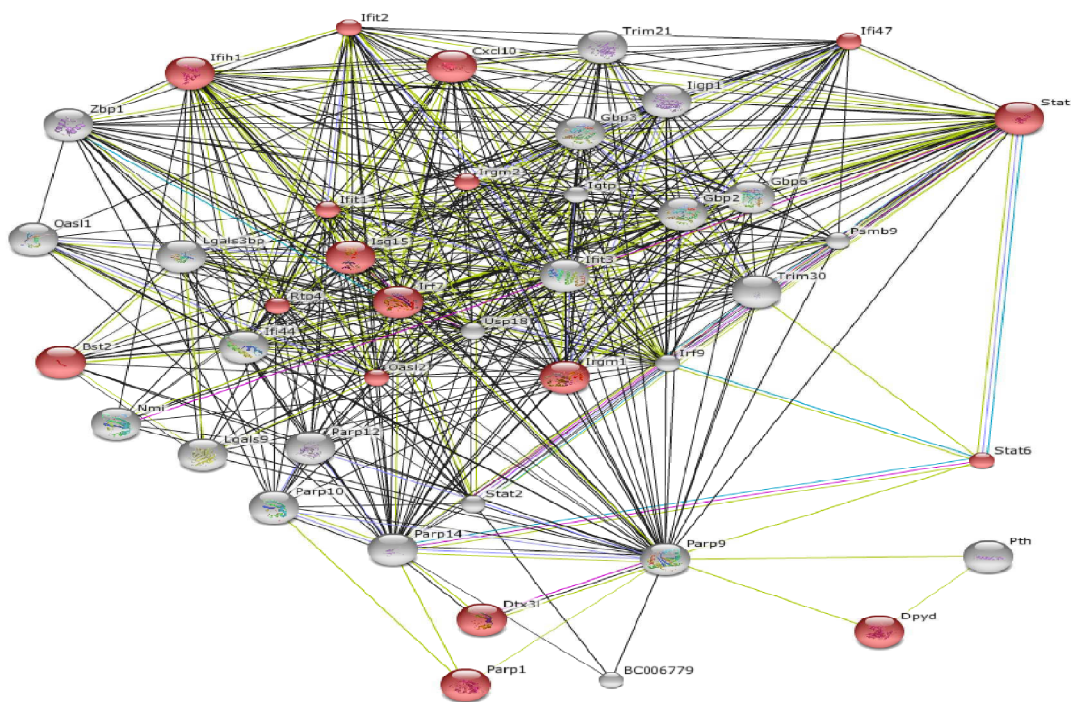


Figura11: Risposta della cellula agli stimoli esterni (P-value Bonferroni adj: 0.0388)

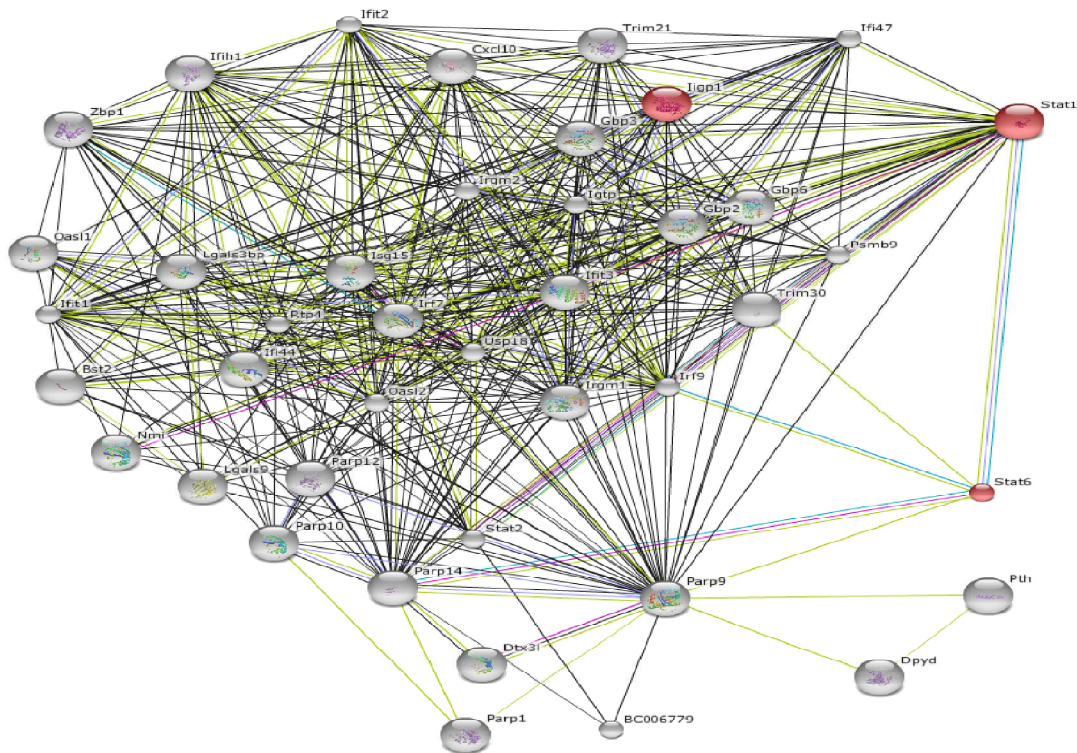


Figura12: *Network* di segnalazione mediata dalle citochine (P-value 0.0009)

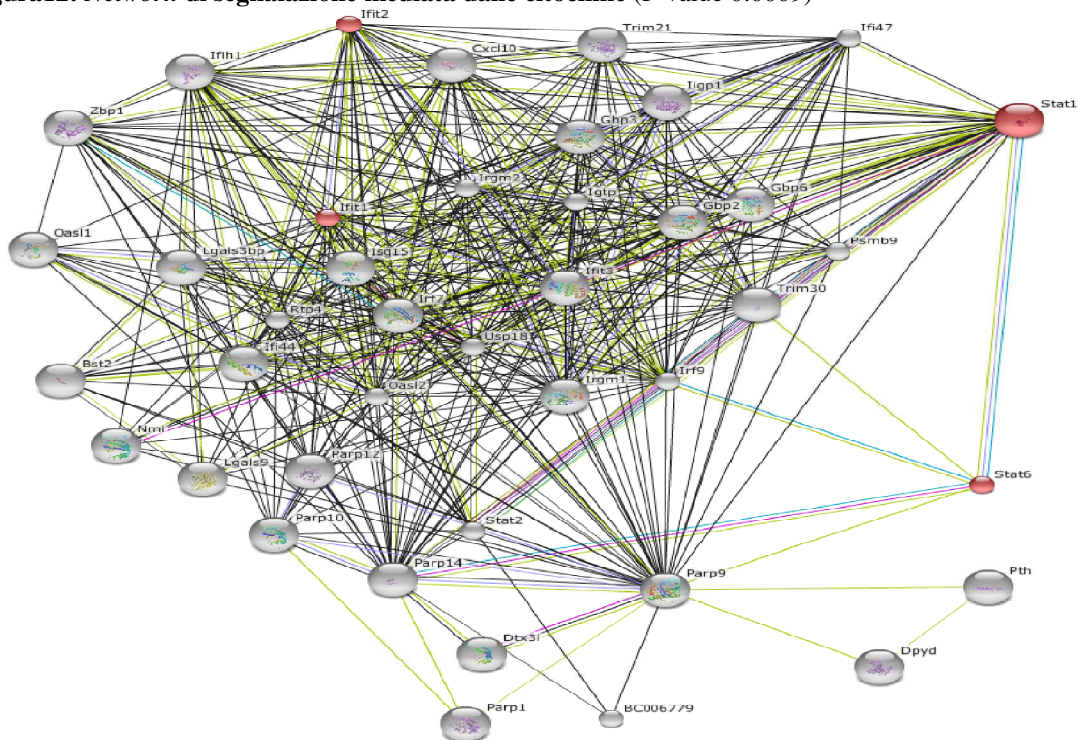


Figura13: risposta delle cellule all'interferone (P-value 0.0001)

Inoltre, abbiamo voluto verificare le conseguenze della sovra-espressione delle PARP sulle relative *networks*. Tramite BioGRID, HPRD, HumanCyc, IntAct, MINT, NCI/PID, abbiamo raccolto le informazioni (supportate da dati sperimentali) sugli

interattori dei membri della famiglia PARP. Purtroppo non ci sono dati di interazione su tutti i membri: nei database non figurano informazioni su PARP6, PARP8, PARP16 (Tabella 13; Figura 14). È stato visto che tra gli interattori delle PARP ci sono: fattori che regolano la trascrizione (CDK8, BCL6, STAT6 NFKB1, RELA, coinvolti nel ciclo cellulare e nell'apoptosi); fattori generali della trascrizione (GTF2F1, E2F1, SP1); mediatori della trascrizione (MED1, MED14, MED17, MED23, MED24, MED6, MED7); proteine coinvolte nella regolazione epigenetica (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC9); RARA, RARB, CREBBP;

- fattori pro- ed anti-apoptotici, quali BCL2, BCL6, CASP1, CASP3, CASP8, CDKN1A, ESR1, TERF1, TP53, UBC, MYC, RELA.

Geni Network													
Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID	Alt Name	Gene ID
AIRE	326	DCAF11	80344	HIST1H1A	3024	MED17	9440	PARP11	57097	RPA3	6119	TIPARP	25976
APTX	54840	DTX3L	151636	HIST1H1C	3006	MED23	9439	PARP12	64761	RPS3A	6189	TNKS	8658
ATM	472	E2F1	1869	HIST1H2BA	255626	MED24	9862	PARP14	54625	RRP1B	23076	TNKS1BP1	85456
AURKB	20877	EP300	2033	HIST1H3A	8350	MED6	10001	PARP15	165631	Rrp1b	72462	TNKS2	80351
BABAM1	29086	ERCC6	2074	HIST1H3E	8353	MED7	9443	PARP2	10038	RXRA	6256	TNP2	7142
BANF1	8815	ESR1	2099	HIST1H4A	8359	MEPCE	56257	PARP3	10039	RYK	6259	TOP1	7150
BCL2	596	FANCD2	2177	HIST1H4C	8364	MTHFD2	10797	PARP4	143	SAP25	100316904	TOP2B	7155
BCL6	604	FNBP1	23048	HIST2H2AA3	8337	MVP	9961	PARP9	83666	SEN1	29843	TOPORS	10210
BMI1	648	FOXO1	2308	HIST2H2AC	8338	MYB	4602	PCNA	5111	SEN3	26168	TP53	7157
BUB1B	701	FTCD	10841	HIST2H2BE	8349	MYBL2	4605	PIAS4	51588	SMARCA1	6594	TRIM28	10155
BUB3	9184	GBAS	2631	HIST2H3C	126961	MYC	4609	POLA1	5422	SP1	6667	TRIM29	23650
CARM1	10498	GPI	2821	HIST4H4	121504	NCAPD2	9918	POLA2	23649	SREK1	140890	UBC	7316
CASP1	834	GPI1	14751	HMGAI	3159	NCAPG	64151	POLB	5423	STAT6	6778	UBC	22190
CASP3	836	GRB14	2888	HSPA2	3306	NCL	4691	POT1	25913	STAT6	20852	USP36	57602
CASP7	840	GTF2F1	2962	IMMT	10989	NCOA6	23054	POU2F1	5451	SUPT16H	11198	VPS33A	65082
CASP8	841	GTPBP3	84705	KLF8	11279	NEDD8	4738	POU5F1	18999	SWAP70	23075	WRN	7486
CBX5	23468	GZMB	3002	LIG3	3980	NFATC1	4772	PPP2R2B	5521	TAF13	6884	XRCC1	7515
CDK8	1024	H2AFX	3014	LNPEP	4012	NFKB1	4790	PRKAA1	5562	TAL1	6886	XRCC5	7520
CDKN1A	1026	H2AFY	9555	LYZ	4069	NPM1	4869	PRKDC	5591	TCEA2	6919	XRCC6	2547
CENPA	1058	H3F3A	3020	LZTR1	8216	NRF1	4899	PRMT1	3276	TCF4	6925	XRN2	22803
CENPB	1059	H3F3B	3021	Mapk1	116590	NUMA1	4926	PTK2	5747	TERF1	7013	ZBTB9	221504
CENPB	12616	HDAC1	3065	MAPK1	5594	NUP98	4928	RARA	5914	TERF2	7014	ZC3HAV1	56829
CHD1L	9557	HDAC2	3066	Mapk13	26415	OTUD4	54726	RARB	218772	TERF2IP	54386	ZNF423	23090
CREBBP	1387	HDAC3	8841	MCL1	4170	PARG	8505	RBM14	10432	THRA	7067		
CTCF	10664	HDAC9	9734	MED1	5469	PARP1	142	RELA	5970	THRAP3	9967		
CTSG	1511	HIF1A	3091	MED14	9282	PARP10	84875	RNF114	55905	THRB	7068		

Tabella 13: Elenco delle Proteine Partecipanti alle *Networks* delle PARP Umane.

Quando alla *network* abbiamo aggiunto i valori di espressione ottenuti, abbiamo osservato in che modo la sovra espressione delle PARP contribuisse ad alterare i vari processi cellulari (Figure 14 - 19).

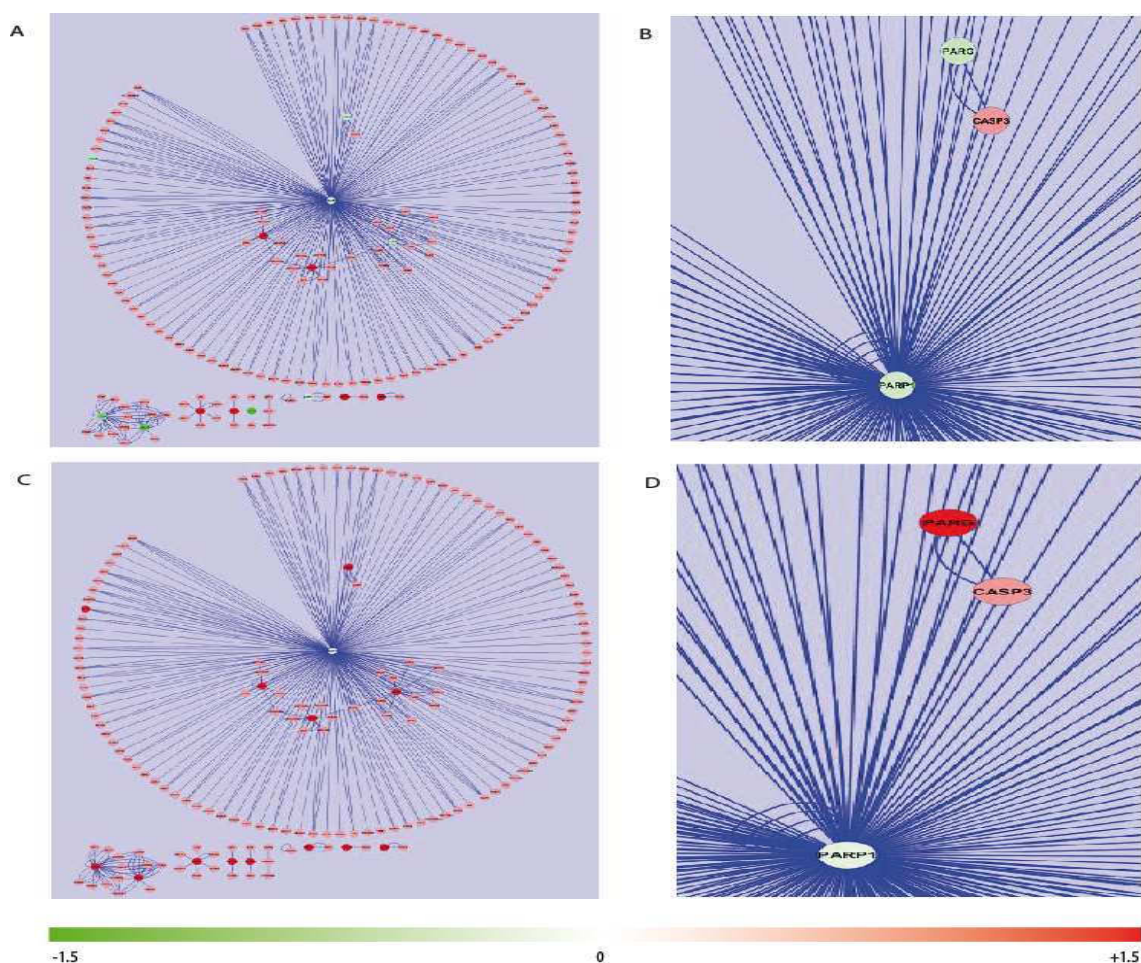


Figura 14: Confronto tra le *networks* nelle cellule sia α che β dopo 24 ore di trattamento con le citochine. In A e C è raffigurata la variazione di espressione delle PARP nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente; in B e D è raffigurata un particolare delle immagini di sinistra. La barra sotto le figure rappresenta la variazione de espressione.

PARP1, la proteina che ha la più alta centralità nella *network*, è espressa a livelli normali in entrambi i *time-points* ed in entrambe le linee pancreatiche. D'altra parte, come è stato osservato (Hassa e Hottiger, 2008), PARP2 ha un ruolo cellulare sovrapponibile, ma non ridondante, con PARP1; è stato osservato un aumento della sua espressione, sia nei due *time-points* nelle cellule β , che dopo 48 ore di trattamento nelle α . PARG, che presenta una regolazione simile a PARP2, risulta essere connessa solo con CASP3 e PARP1 (Figure 14 - 17).

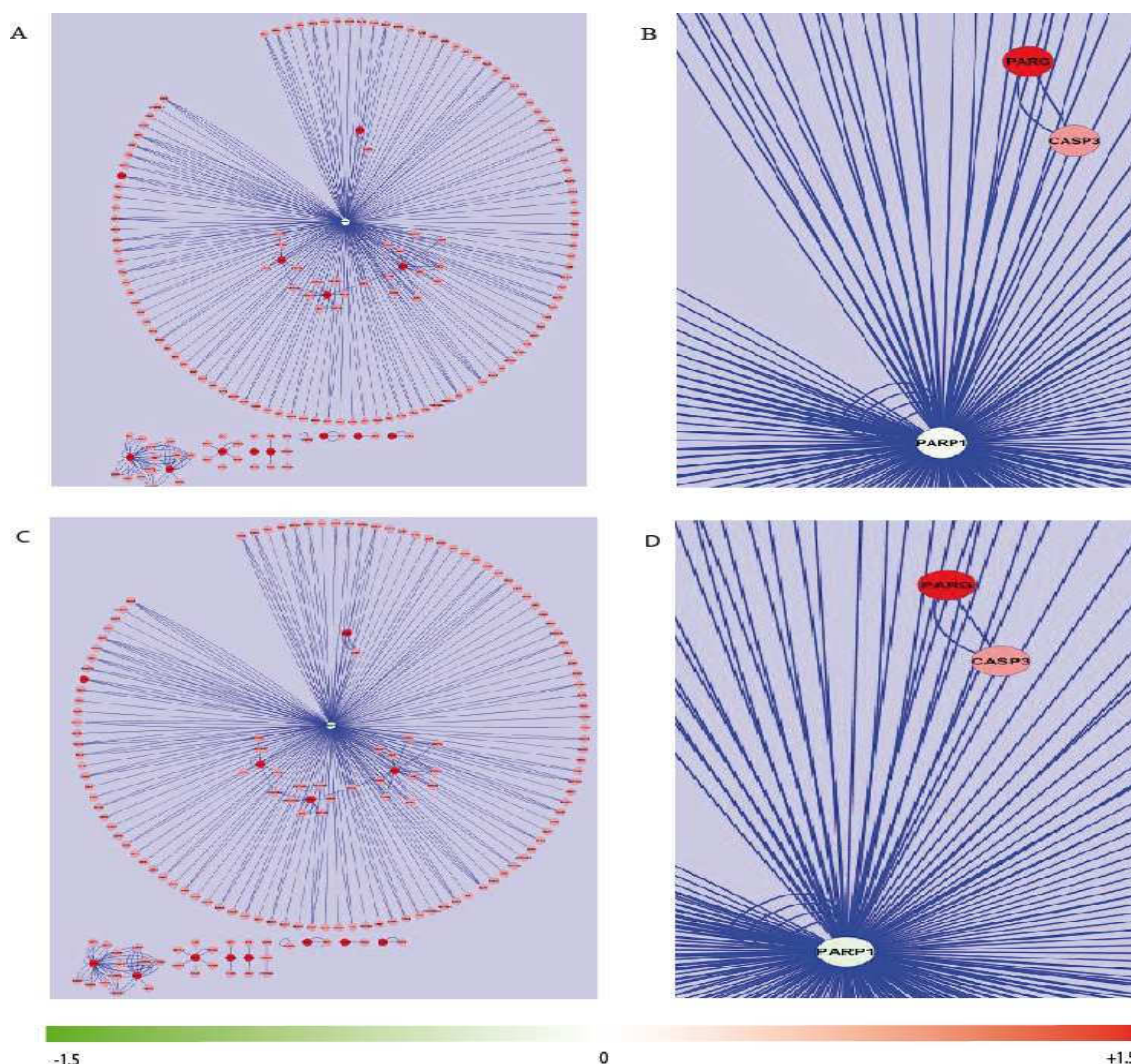


Figura 15: Confronto tra le *networks* nelle cellule sia α che β dopo 48 ore di trattamento con le citochine. In A e C è raffigurata la variazione di espressione delle PARP nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente; in B e D è raffigurato un particolare delle immagini di sinistra. La barra sotto le figure rappresenta la variazione de espressione.

Andando a osservare i dettagli delle *networks* alle 24 e alle 48 ore (Figure 16 e 17), abbiamo dedotto che le sovra-espressioni di PARP3 e PARP10 vanno ad incidere sulla modificazione dei *clusters* di istoni HIST1H, HIST2H, HIST3H, HIST4H e della famiglia dell'istone H3F3A, con la conseguente disponibilità dei promotori che risiedono nella cromatina associata a quegli istoni. In aggiunta, PARP10 influenza l'attività del fattore di trascrizione Myc (Figure 16 e 17, B e D).

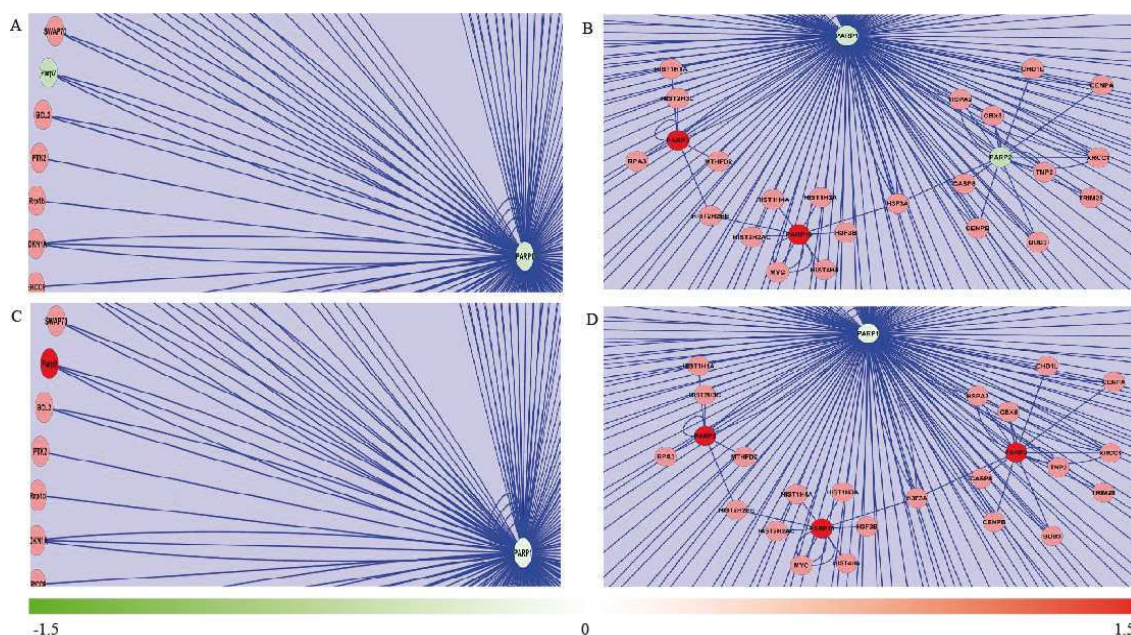


Figura 16: Particolari delle *networks* nelle cellule α e β dopo 24 ore di trattamento con le citochine. In A e C è la variazione di espressione delle PARP1 e PARP2 nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente; in B e D è raffigurata la variazione di espressione delle PARP1, PARP2, PARP3, PARP10 nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente.

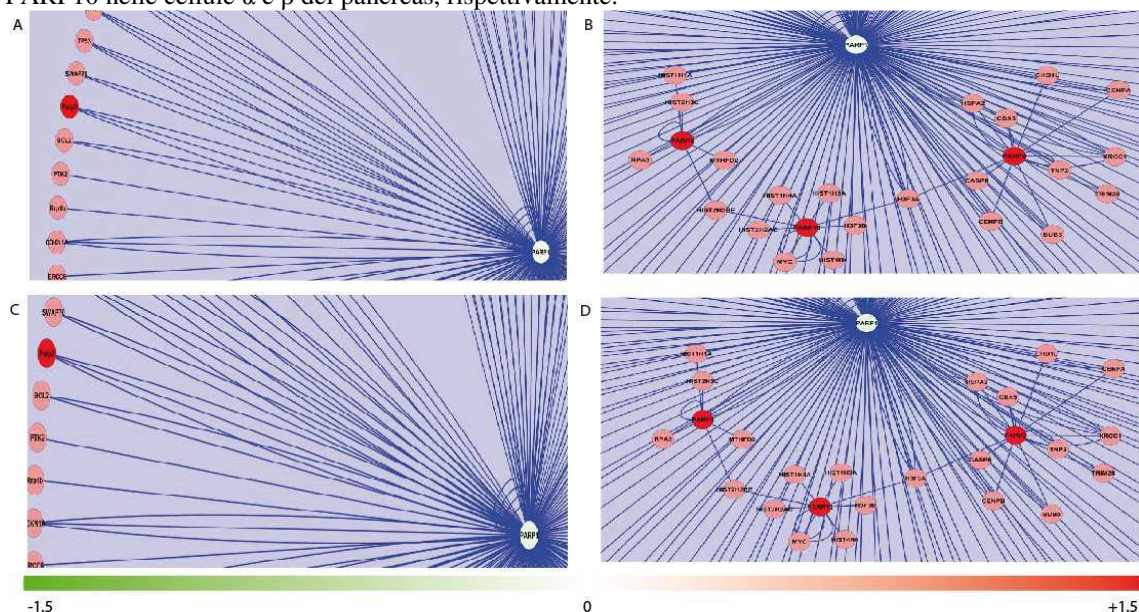


Figura 17: Particolari delle *networks* nelle cellule sia α che β dopo 48 ore di trattamento con le citochine. In A e C è mostrata la variazione di espressione delle PARP1 e PARP2 nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente; in B e D è raffigurata la variazione di espressione delle PARP1, PARP2, PARP3, PARP10 nelle cellule α e β del pancreas, rispettivamente.

Come è stato notato in precedenza per le *networks* di *Mus musculus*, l'aumentata espressione di PARP9 e di PARP14 incide sulla regolazione della trascrizione governata da Stat1 e Stat6. C'è da sottolineare il fatto che le proteine TNKS e TNKS2 sono connesse con proteine coinvolte nel processo di morte cellulare, come MCL1, MAPK1, TERF1 (secondo le annotazioni GO, ricavate tramite DAVIDdb); quindi, danno un

contributo alla segnalazione dell'apoptosi a seguito di induzione con le citochine. Un ulteriore contributo al programma di morte viene dato dalla connessione tra tiPARP e ATM, in seguito alla sovra-espressione di tiPARP (Figure 18 e 19).

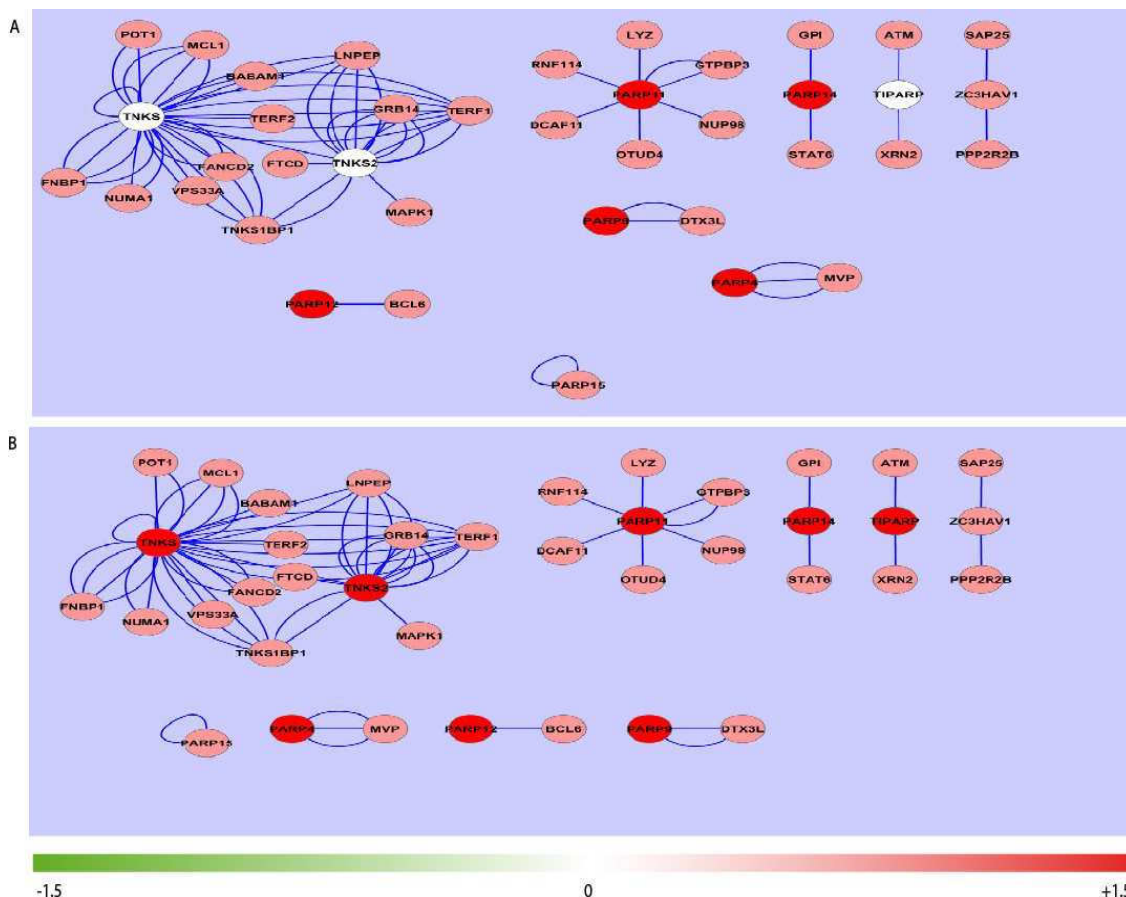


Figura 18: Confronto tra le *networks* nelle cellule α e β dopo 24 ore di trattamento con le citochine. In A e B è raffigurata la variazione di espressione delle PARP4, TNKS, TNKS2, tiPARP, PARP9, PARP11, PARP12, PARP13, PARP14 nelle cellule α e β del pancreas murino, rispettivamente.

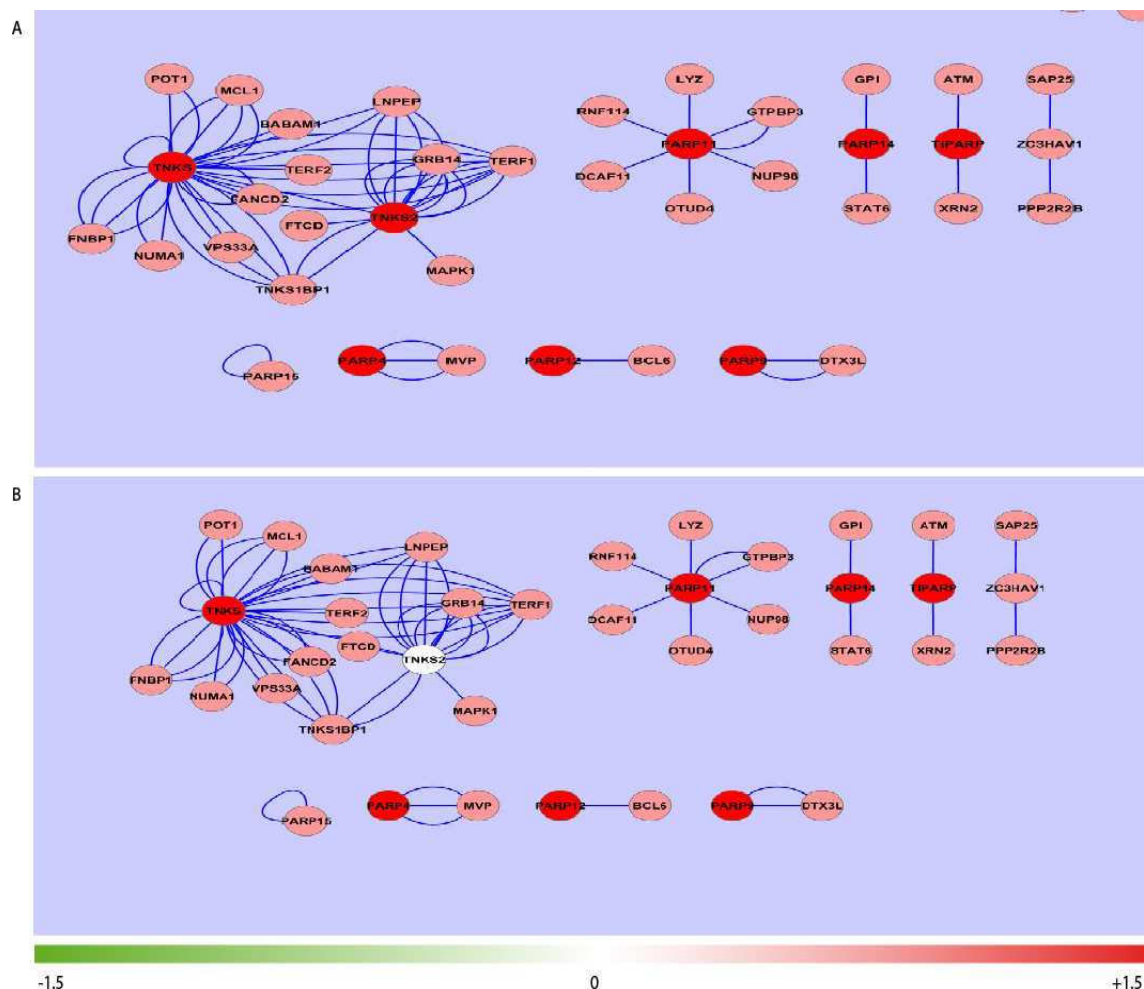


Figura 19: Confronto tra le *networks* nelle cellule α e β dopo 48 ore di trattamento con le citochine. In A e B è raffigurata la variazione di espressione delle PARP4, TNKS, TNKS2, tiPARP, PARP9, PARP11, PARP12, PARP13, PARP14 nelle cellule α e β del pancreas murino, rispettivamente.

Da quest'ultima analisi si può dedurre che l'induzione della morte cellulare da parte delle citochine, coinvolte nella patogenesi del Diabete Mellito, passa attraverso l'espressione delle PARP, che darà una risposta apoptotica differente delle due linee cellulari pancreatiche: infatti, si può osservare che tra cellule α e β alle 24 ore ci sono profili differenti proprio delle PARP, che sono collegate a geni chiave dell'apoptosi.

5. DISCUSSIONE

Nel Diabete Mellito di tipo 1, le cellule β sono il bersaglio dell'assalto del sistema immunitario a seguito dell'un'invasione del pancreas da parte di cellule mononucleate, che scatenano una reazione infiammatoria; una lunga esposizione a queste *noxae* causa la perdita di molte cellule β . La morte di queste cellule nel corso del processo infiammatorio è causata dal diretto contatto con macrofagi e linfociti T con le cellule bersaglio e dalla presenza di mediatori solubili (citochine, ROS, NO), rilasciati dalle cellule immunitarie. L'esposizione a IL1 β oppure a IL1 β ed INF γ causa cambiamenti simili a quelli osservati nei pazienti prediabatici, nei quali si hanno livelli elevati di insulina / proinsulina. Successivamente si ha l'aggiunta del TNF α , che porta alla completa distruzione delle cellule β [Cnop et al., 2005].

Sebbene queste molecole effettrici abbiano una certa influenza sul ciclo vitale delle cellule, esse non mostrano effetti devastanti sul bersaglio se sono somministrate singolarmente. In alcuni lavori è stato visto che la combinazione tra INF γ e IL1 β *in vitro* svolge un ruolo fondamentale, ma non sufficiente, nella patogenesi del Diabete Mellito di tipo 1 (Figura 20) [Suk et al., 2001].

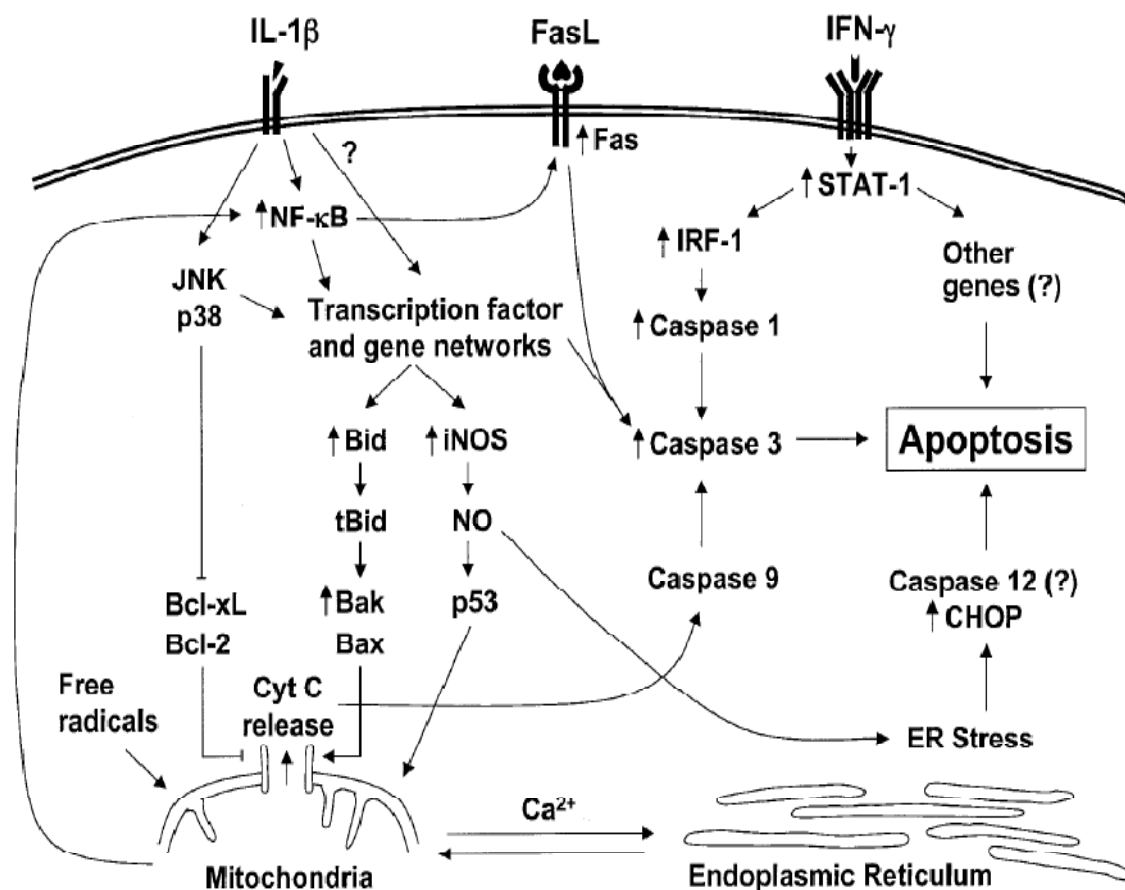


Figura 20: Modello proposto per le pathways che contribuiscono all'esecuzione dell'apoptosi mediata da citochine nelle cellule β.

Alcuni ricercatori hanno suggerito che la sinergia di IFN γ e TNF α sia cruciale per la distruzione delle cellule β: una combinazione di queste molecole, ma non di altre citochine, induce l'apoptosi caspasi-dipendente sia in cellule di insulinoma che nelle isole pancreatiche, mentre IL1 β ha un minore effetto sull'insulinoma [Kim et al., 2009].

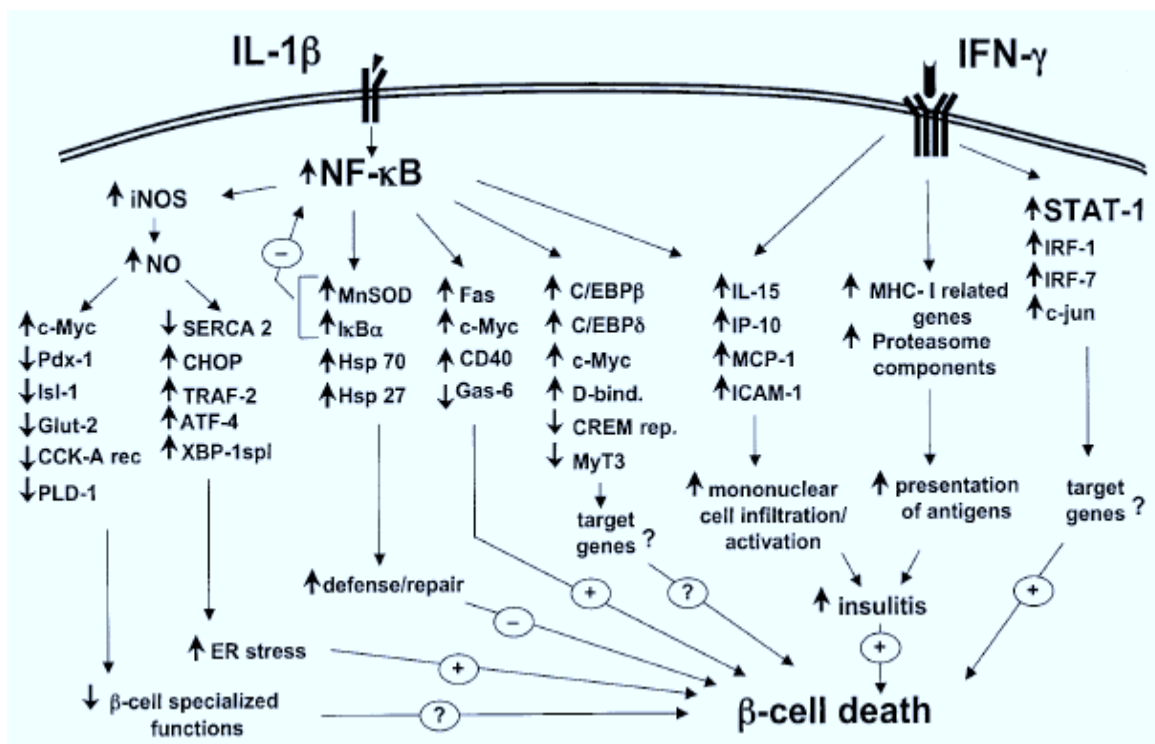


Figura 21: *Network* dei fattori di trascrizione e dei geni coinvolti nella patogenesi del Diabete Mellito. I fattori di trascrizione NF-κB e STAT1 sono le principali vie di regolazione, innescate a seguito di stimolazione da parte di IL1β e INFγ.

Suk et al. (2001) hanno dimostrato che l'INFγ induce l'espressione del *Interferon Regulatory Factor 1* (IRF1), che va a regolare l'espressione di geni proapoptotici (tra cui l'attivazione delle Caspasi) e l'attivazione di STAT1 (Figura 21). Questi risultati suggeriscono una collaborazione dei segnali di trasduzione del segnale, durante l'azione sinergica delle citochine, nella distruzione delle cellule β [Suk et al., 2001; Kano et al., 1999].

È stato visto anche che l'INFγ induce Casp11, che gioca un ruolo importante nell'attivazione di Casp3. A parte la regolazione delle Caspasi, IRF1 partecipa all'induzione di iNOS con la conseguente produzione di NO (Figura 20) [Kano et al., 1999].

Dai nostri esperimenti di espressione (Figure 7 e 8, a e b), si può osservare che anche PARP9 viene indotto dall' INFγ, in quanto nel promotore presenta un elemento di risposta alla stessa citochina [Hakmé et al., 2008a]. Se si vanno ad osservare anche i dati

di co-espressione, è stato visto che questa macroPARP presenta un basso MR (quindi un alto livello di co-espressione) con i geni indotti dall'interferone, con Dtx3l e con Stat1 (Tabella 14).

Coespressi con PARP9	
Gene	MR for Parp
Dtx3l	2.5
Parp14	2.8
Ifi35	4.7
Ifi47	13
Ifit1	15.2
Ifih1	17
Irf9	21.9
Ifit3	24.2
Irf7	31
Stat1	32.9
Ifi44	42
Stat2	48.4
Ifit2	71.3
Irf1	79.4
Parp3	274.3
Irf8	327.1

Tabella 14: Geni co-espressi con PARP9

Ad avvalorare ancora di più il coinvolgimento di PARP9 è lo studio della *network* di PARP9 nel topo a seguito di stimolazione con interferone (Figura 13): si può vedere che in presenza dell'INF γ i meccanismi di segnalazione attivati sono quelli di IFIT1, IFIT2, STAT1.

Allo stesso modo di PARP9, anche PARP12 (membro del sottogruppo delle CCCH-PARP) presenta una forte co-espressione con i geni indotti dall'INF γ , STAT1, Dtx3l; quindi, si può presumere che tale PARP sia coinvolta nello stessa *pathway* di segnalazione (Tabella 15; Figure 7 e 8, a e b; Figura 13).

ID	MR for Parp	ID	MR for Parp
lfi202b	23.8	lfitm1	29.7
lfi27l2a	112.9	lfitm2	255.3
lfi35	61	lfitm3	2
lfi44	33.9	lrf1	137.8
lfi47	60.2	lrf2	355.9
lfi4h1	2.2	lrf7	15.1
lfit1	12.3	lrf9	79.8
lfit2	67.7	Stat1	60.8
lfit3	63.9	Dtx3l	16.9

Tabella 15: Geni co-espressi con PARP12

Aravind (2001) ha proposto che il dominio WWE, trovato in tutte le CCCH-PARP e in PARP14, possa avere la funzione di interagire con altre proteine, come le ubiquitine, e partecipare alla *pathway* di segnalazione [Aravind, 2001].

I nostri dati di espressione dimostrano che alle 24 ore è presente una differenza di profilo di espressione dei membri della famiglia PARP tra le α TC1 e β TC1 (Figura 7, a e b): solo Parp3, Parp9, Parp10, Parp11, Parp12, Parp14 sono i membri della famiglia che hanno l'espressione modificata dopo stimolazione con le citochine. Augustin et al. (2003) hanno osservato che la localizzazione di PARP3 è per lo più a livello dei componenti del centromero. Inoltre, hanno visto che una sovra-espressione di tale PARP interferisce sulla transizione G1/S senza interferire sulla duplicazione del centromero [Augustin et al., 2003]. Nel nostro caso, dopo stimolazione con le citochine, PARP3 viene sovra-espressa. Molti ricercatori hanno considerato le macroPARP (PARP9 e PARP14) come dei fattori che effettuano una regolazione epigenetica di molti geni, in quanto formano complessi con fattori quali HDAC per effettuare una modificazione degli istoni [Hakmé et al., 2008a; Cho et al., 2009; Mehrotra et al., 2011]. PARP9, PARP10, PARP12, PARP14 fanno parte delle *pathways* di regolazione dell'espressione genica, controllata dalle proteine STAT (Figura 10). Come mostrato in precedenza (Figure 10-13), PARP9 si lega a STAT1 per mezzo di DTX3L in risposta alle citochine per regolare molti geni dell'apoptosi; PARP14 con il diretto legame con

STAT6 concretizza il controllo di altri set di geni (Figure 10-13). Goenka e Boothby (2006) hanno suggerito che STAT1 e STAT6 svolgano un ruolo alternativo nella regolazione dei loro *targets* [Goenka e Boothby, 2006]. Questi Ricercatori hanno dimostrato che il macroH2A, variante del *macrodomain*, effettua una regolazione negativa nella trascrizione di molti geni e determina l'inibizione dell'attività di PARP1 [Angelov et al., 2003; Goenka e Boothby, 2006; Hakmé et al., 2008a; Cho et al., 2009]. Dopo stimolazione con TNF α , IL1 β , INF γ , noi abbiamo osservato che PARP3 e PARP10 sono responsabili delle modificazioni dei *clusters* di istoni HIST1H, HIST2H, HIST3H, HIST4H e della famiglia dell'istone H3F3A (Figure 16-19); quindi, si può ipotizzare che nelle regioni di DNA, associate a tali istoni, possano risiedere geni che regolano il processo di trasduzione delle citochine, della regolazione della trascrizione, dell'apoptosi.

Yu et al. hanno suggerito che la sovra espressione di PARP10 inibisca l'azione di c-MYC tramite l'ADP-ribosilazione e blocchi l'espressione dei suoi *targets*, coinvolti nella progressione del ciclo cellulare [Yu et al., 2005].

Come mostrato nelle figure 18 e 19, la sovra espressione di PARP12 influisce su BCL6 (un repressore della trascrizione di geni coinvolti nella morte programmata), che è alterato dalle traslocazioni presenti in molte forme di leucemie e linfomi.

Tra le 24 e le 48 ore, nelle α TC1 abbiamo mostrato una sovra-espressione anche di PARP2, PARP4, TNKS, TNKS2, PARP6, tiPARP, PARP8, PARG (Tabella 8, a e b), come si era già osservato nelle β TC1 dopo 24 di trattamento con citochine (Tabella 7, a e b): questo dato fa presupporre che anche nelle α TC1 possano essere avviati i processi, mediati da PARP, che portano all'apoptosi stimolata da citochine. Dall'analisi delle *networks* (Figure 18 e 19, a e b) abbiamo constatato che le Tankirasi e tiPARP hanno come *target* di interazioni proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nelle *pathways* di *signaling*. La regolazione di TNKS principalmente va a incidere sull'attività di TERF1,

gene coinvolto nel mantenimento dei telomeri, e di MCL1, un gene che ha due varianti di *splicing*, che regolano l'apoptosi sia positivamente che negativamente (Figure 18 e 19, a e b). TNKS2 presenta un'interazione con TERF1 e con MAPK1. tiPARP interagisce con ATM, un *tumor suppressor* la cui attività è regolata da p53, CHK2, RAD9, RAD17 a seguito del danno del DNA (Figure 18 e 19, a e b). Tramite STRINGdb abbiamo visto che tiPARP è coinvolta nel processo cellulare di regolazione dell'apoptosi (Figura 22).

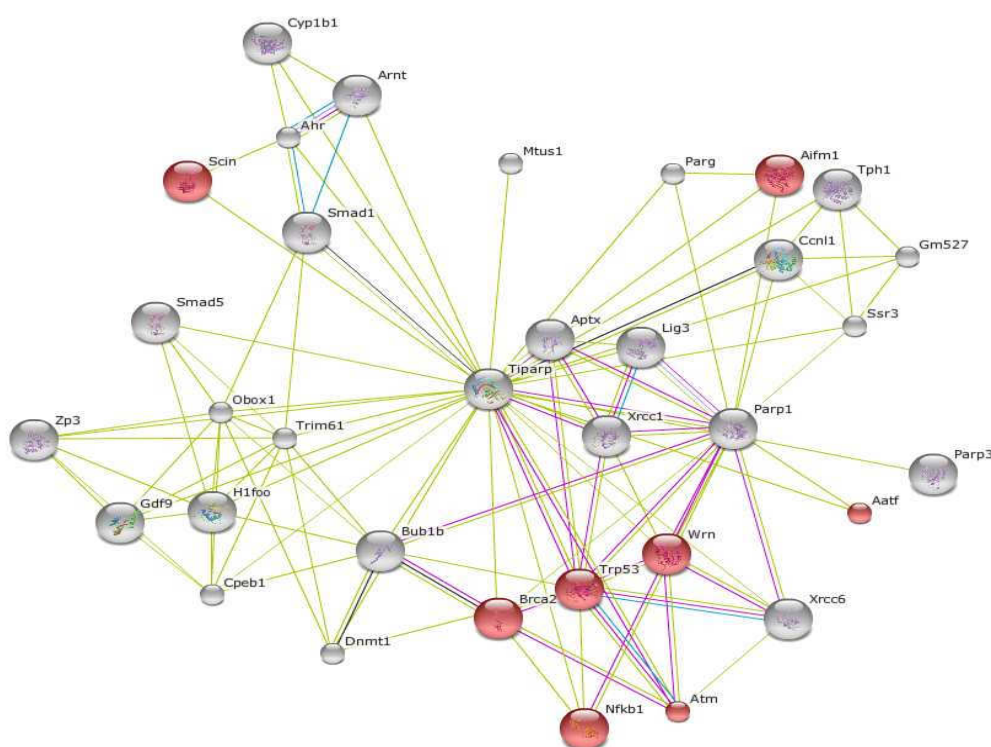


Figura 22: Partecipazione di tiPARP al processo apoptotico (P-value: 0.00397). La sovra espressione di tiPARP influisce sull'attività delle proteine evidenziate in rosso.

Dall'analisi di TNKS, TNKS2, tiPARP si può evincere che queste proteine stanno a monte nella regolazione della morte cellulare.

Yeh et al. (2005) hanno visto che gli effetti citoprotettivi di PARP1 in seguito a *stress* ossidativo (nel nostro caso, la produzione di NO da parte di iNOS) potrebbero essere inibiti dalla sovraespressione della TNKS, mediante deplezione di NAD^+ e successiva

manca di auto-modificazione di PARP1. TNKS consuma più NAD^+ rispetto a PARP1 [Yeh et al., 2005].

Bonicalzi et al. (2005) hanno suggerito che le cellule sottoposte a stimoli apoptotici mostrino una sintesi passeggera di ADP-ribosio, prodotto dalla attività nucleare di PARG. Infatti PARG è implicata in un efficace controllo dei livelli di mono(ADP-ribosio) e PAR, sia liberi che associati a proteine [Bonicalzi et al., 2005].

Gli alti livelli di PARG, visti nelle αTC1 alle 48 ore e nelle βTC1 in entrambi i *time-points* (Tabelle 7b e 8, a e b), suggeriscono che questi siano la conseguenza della regolazione delle modifiche post-traduzionali degli istoni e delle proteine coinvolte nel processo. Inoltre, la produzione di mono-ADP-ribosio e di PAR liberi può entrare a far parte del *signaling* cellulare e regolare del rilascio del calcio dal RE.

Dall'analisi della *network* di PARG (Figure 14 e 15, b e d) risulta molto evidente che PARG è connessa con PARP1 e Casp3: Bonicalzi et al. hanno ipotizzato che la presenza di ADP-ribosio nel citoplasma possa essere causata dal taglio di PARG, effettuato dalla Casp3 (la stessa che taglia PARP1 e altri membri della famiglia che presentano il NLS) [Bonicalzi et al., 2005].

PARP2 ha un ruolo sovrapponibile a PARP1, ma non ridondante [Hassa et al., 2006; Hassa e Hottiger, 2008]: in caso di inibizione del capostipite della famiglia, sarà PARP2 a promuovere la morte cellulare. Cnop et al. (2005) hanno suggerito che NF- κB , stimolato da $\text{IL1}\beta$, regoli l'espressione di iNOS, il quale va a produrre Ossido Nitrico (NO) che a sua volta attiva una cascata di segnale fino ad arrivare allo *stress* ossidativo [Cnop et al., 2005]. Spina-Purrello et al. hanno riportato che a seguito di *stress* ossidativo si ha un aumento dell'espressione di PARP1 e PARP2, che decresce dopo trattamento con anti-stressogeni [Spina-Purrello et al., 2010]. Dai nostri dati, si può evincere che PARP2 aumenta, probabilmente a seguito dell'attività di iNOS che crea

uno *stress* all'interno della cellula mediante l'NO prodotto (Tabelle 7b - 8, a e b).

Dall'analisi della *network*, abbiamo visto che PARP2 è connessa con le proteine centromeriche, come CENP. PARP2 è connessa anche a Casp8 e quando è sovra-espressa va a influenzare il programma di morte (Figure 16-17, b e d).

Dai dati fino a ora ottenuti, si sa poco su PARP4 (vPARP), PARP6, PARP8 e PARP16: la sovra espressione di vPARP è dovuta probabilmente alla formazione del complesso RNP *vault*, assieme a MPV, TEP1, vRNA [Kickhoefer et al., 1999; Amé et al., 2004]; tramite l'analisi dei *geni candidati* abbiamo visto che PARP8, assieme a PARP11, si trova in regioni che danno la suscettibilità al Diabete Mellito (Tabelle 4 e 5): quindi, si può ipotizzare che una loro sovra-espressione predisponga le cellule alla apoptosi mediante meccanismi attualmente poco conosciuti.

In un lavoro svolto in precedenza dal nostro gruppo, abbiamo determinato che tutti i geni, che compongono in complesso NF- κ B, sono sovra-espressi in entrambe le linee e in entrambi i *time-points*, mentre gli inibitori sono espressi maggiormente nelle α TC1. È stato dedotto che la presenza degli inibitori di NF- κ B possa contribuire alla differente risposta delle due linee all'induzione di apoptosi [Barbagallo et al., 2011]. Questi dati fanno presupporre che nelle due linee cellulari le PARP, differentemente espresse alle 24 ore (PARG, PARP2, PARP4, TNKS, TNKS2, PARP6, tiPARP e PARP8) possano essere regolate dal complesso NF- κ B. Tokunaga et al. (2009) hanno scoperto che a regolare la *pathway* di NF- κ B siano coinvolte anche alcune ubiquitine, attraverso la poli-ubiquitinazione di IKK γ (un modulatore negativo di NF- κ B). Inoltre, Akutsu et al. (2010) hanno suggerito che le ubiquitine, oltre che a regolare la *pathway* di NF- κ B, agiscano anche nella regolazione della *pathway* di segnalazione di IRF per mezzo di ISG15. Dall'analisi della *network* delle PARP a seguito di stimolazione esterna, appare molto evidente che ISG15, insieme ai geni stimolati dall'interferone, svolge un ruolo fondamentale in questo processo (Figura 11).

Dati di letteratura ed i nostri dati sottolineano l'importanza della interazione tra PARP9 e DTX3L (un enzima, simile a E3, che fa parte della famiglia delle ubiquitine) per il legame con STAT1 ed il controllo della trascrizione di geni *target*, dopo stimolazione con INF γ (Tabella 13; Figure 10, 18, 19). In aggiunta, è stato visto che entrambi questi geni contengono un elemento di risposta all'INF γ nel promotore [Juszczynski et al., 2005; Hakmé et al., 2008a; Cho et al., 2009].

Molte altre PARP presentano un dominio di legame con le ubiquitine: le CCCH-PARP (tiPARP, PARP10, PARP12, PARP13) hanno al loro interno un dominio WWE, che consente l'interazione con le ubiquitine ed altri enzimi e permette la loro partecipazione alla trasduzione del segnale [Aravind, 2001]. Anche PARP14 presenta al suo interno tale dominio.

Andersen et al. (2005) hanno suggerito che anche vPARP e PARP10 contengano domini che legano le ubiquitine e sono responsabili della degradazione del *target* [Andersen et al., 2005].

6. CONCLUSIONI

La famiglia PARP è una importante famiglia di enzimi, che esercitano una fine regolazione su molti processi di controllo nell'espressione genica. Per mezzo della loro attività di ADP-ribosilazione (sia poli- che mono-ribosilazione), le PARP effettuano modificazioni post-traduzionali, modificano gli istoni, partecipano al reclutamento dei fattori di trascrizione, partecipano alla formazione di complessi RNP, sono coinvolte nel *turn over* e nella degradazione delle proteine. In molti dei suddetti processi, è coinvolta PARG, che idrolizza nel modo appropriato le molecole ADP-ribosio. Grazie alla reciproca collaborazione, le PARP e PARG rendono le reazioni di ADP-ribosilazione uno strumento molto versatile per la regolazione epigenetica: essendo una modificazione reversibile, essa è molto utile per modulare finemente la struttura della cromatina e l'espressione genica. Le PARP formano complessi, che partecipano a *pathways* di trasduzione del segnale, di restauro del DNA, di attivazione o inibizione della morte cellulare. In tutti questi processi, le PARP interagiscono con le ubiquitine. Anche PAR e molecole di mono-ADP-ribosio, generate da PARG, svolgono un ruolo molto importante nella *pathway* di *signaling*.

È evidente che, dopo stimolazione dell'INF γ , un ruolo iniziale nella patogenesi del Diabete Mellito è svolto dalle macroPARP e da alcune CCCH-PARP, che sono coinvolte nella preparazione della cellula alla morte cellulare in seguito alla stimolazione da parte del TNF α ed IL1 β . Le restanti PARP partecipano successivamente in conseguenza della regolazione attuata da NF- κ B.

L'impiego di inibitori potrebbero attenuare o bloccare del tutto la patogenesi del Diabete Mellito: una inibizione di PARP3, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14 potrebbe portare a una desensibilizzazione della cellula nell'attuazione del programma di morte, stimolato da altre citochine; inibitori di vPARP, Tankirasi,

tiPARP, PARP8 potrebbero evitare l'attuazione del programma di morte e ripristinare la funzionalità delle PARP nella protezione della cellula dalle *noxae* diabetogeniche. Queste ricerche sono particolarmente importanti per la messa a punto di approcci terapeutici innovativi per il Diabete Mellito, il cui *esplosivo* aumento di incidenza e prevalenza è stato definito da diversi Autori una *epidemia*.

7. REFERENZE

- Adebajo OA, Anandatheerthavarada HK, Koval AP, Moonga BS, Biswas G, Sun L, Sodam BR, Bevis PJ, Huang CL, Epstein S, Lai FA, Avadhani NG, Zaidi M: **A new function for CD38/ADP-ribosyl-cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis.** *Nat. Cell Biol.* (1999) 1: 409-414.
- Aguiar RC, Takeyama K, He C, Kreinbrink K, Shipp MA: **B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity.** *J Biol Chem.* (2005) 280(40):33756-65.
- Akutsu M, Ye Y, Virdee S, Chin JW, Komander D: **Molecular basis for ubiquitin and ISG15 cross-reactivity in viral ovarian tumor domains.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2011) 108(6):2228-33.
- Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G: **The PARP superfamily.** *Bioessays.* (2004) 26(8):882-93.
- Andersen KM, Hofmann K, Hartmann-Petersen R: **Ubiquitin-binding proteins: similar, but different.** *Essays Biochem.* (2005) 41:49-67.
- Appels B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H: **Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells.** *J Immunol.* (1989) 142(11):3803-8;
- Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A, Derow C, Feuermann M, Ghanbarian AT, Kerrien S, Khadake J, Kerssemakers J, Leroy C, Menden M, Michaut M, Montecchi-Palazzi L, Neuhauser SN, Orchard S, Perreau V, Roechert B, van Eijk K, Hermjakob H: **The IntAct molecular interaction database in 2010.** *Nucleic Acids Res.* (2010) 38(Database issue):D525-31. Epub 2009 Oct 22;
- Aravind L, Koonin EV: **SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization.** *Trends Biochem Sci.* (2000) 25(3):112-4;

- Aravind L: **The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation.** *Trends Biochem Sci.* (2001) 26(5):273-5;
- Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, Ménissier-De Murcia J, Piel M, Schmit AC, Apiou F, Vonesch JL, Kock M, Bornens M, De Murcia G: **PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression.** *J Cell Sci.* (2003) 116(Pt 8):1551-62;
- Barbagallo D, Piro S, Ragusa M, Condorelli AG, Maniscalchi ET, Mascali LG, Duro L, Monello A, Rabuazzo MA, Di Pietro C, Purrello F, Purrello M: **A Molecular Systems Medicine approach pinpoints the molecular bases of the higher resistance to cytokine-induced apoptosis of mammalian pancreas α cells respect to β cells.** 2011, Submitted;
- Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schmid JA: **Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus.** *J Biol Chem.* (2002) 277: 10842-10851;
- Bonicalzi ME, Haince JF, Droit A, Poirier GG: **Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when?** *Cell Mol Life Sci.* (2005) 62(7-8):739-50;
- Boulikas T: **Poly (ADP-ribose) synthesis and degradation in mammalian nuclei.** *Anal Biochem.* (1992) 203, 252-8;
- Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah GM, Poirier GG.: **Mode of action of poly (ADPribose)-glycohydrolase.** *Biochim Biophys Acta*, (1994) 1219: 342-50;
- Cancela JM: **Specific Ca²⁺ signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3.** *Annu. Rev. Physiol.* (2001) 63:99-117;
- Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhøffer M, Ørntoft T, Eizirik DL: **A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-**

- kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells.** *J Biol Chem.* (2001) 276(52):48879-86.
- Ceol A, Chatr Aryamontri A, Licata L, Peluso D, Briganti L, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G: **MINT, the molecular interaction database: 2009 update.** *Nucleic Acids Res.* (2010) 38(Database issue):D532-9. Epub 2009 Nov 6;
 - Cho SH, Goenka S, Henttinen T, Gudapati P, Reinikainen A, Eischen CM, Lahesmaa R, Boothby M: **PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells.** *Blood.* (2009) 113(11):2416-25. Epub 2009 Jan 15;
 - Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL: **Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.** *Diabetes.* (2005) 54 Suppl 2:S97-107;
 - D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG: **Poly (ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions.** *Biochem J.* (1999) 342 (Pt 2):249-68;
 - De Flora A, Zocchi E, Guida L, Franco L, Bruzzone S: **Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2004) 1028:176-191;
 - De Rycker M, Venkatesan RN, Wei C, Price CM: **Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization.** *Biochem J.* (2003) 372(Pt 1):87-96;
 - Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S: **Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin geneoncogene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988) 85:9037-9041;
 - Goenka S, Cho SH, Boothby M: **Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly(ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription.** *J Biol Chem.* (2007) 282(26):18732-9.

- Goodwin PM, Lewis PJ, Davies MI, Skidmore CJ, Shall S.: **The effect of gamma radiation and neocarzinostatin on NAD and ATP levels in mouse leukaemia cells.** *Biochim Biophys Acta*, (1978) 543, 576-82;
- Hakmé A, Huber A, Dollé P, Schreiber V: **The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues.** *Dev Dyn.* (2008) 237(1):209-15;
- Hakmé A, Wong HK, Dantzer F, Schreiber V: **The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects'** Review Series. *EMBO Rep.* (2008) 9(11):1094-100. Epub 2008 Oct 17;
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO.: **Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?** *Microbiol Mol Biol Rev*, (2006) 70: 789-829;
- Hassa PO, Hottiger MO: **The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases.** *Front Biosci.* (2008) 13:3046-82;
- Hayden MS, Ghosh S: **Signaling to NF- κ B.** *Genes Dev.* (2004) 18: 2195-2224;
- Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F: **Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling.** *Nature.* (2009) 461(7264):614-20. Epub 2009 Sep 16;
- Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G: **PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development.** *DNA Repair (Amst).* (2004) 3(8-9):1103-8;

- Ishizuka S, Martin K, Booth C, Potten CS, de Murcia G, Bürkle A, Kirkwood TB: **Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a survival factor for radiation-exposed intestinal epithelial stem cells in vivo.** *Nucleic Acids Res.* (2003) 31(21):6198-205;
- Juszczynski P, Kutok JL, Li C, Mitra J, Aguiar RC, Shipp MA: **BAL1 and BBAP are regulated by a gamma interferon-responsive bidirectional promoter and are overexpressed in diffuse large B-cell lymphomas with a prominent inflammatory infiltrate.** *Mol Cell Biol.* (2006) 26(14):5348-59;
- Kano, A., T. Haruyama, T. Akaike, and Y. Watanabe.. **IRF-1 is an essential mediator in IFN-g-induced cell cycle arrest and apoptosis in primary cultured hepatocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) 257:672;
- Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, Ahrén D, Tsoka S, Darzentas N, Kunin V, López-Bigas N: **Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes.** *Nucleic Acids Res.* (2005) 33(19):6083-9. Print 2005;
- Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, Telikicherla D, Raju R, Shafreen B, Venugopal A, Balakrishnan L, Marimuthu A, Banerjee S, Somanathan DS, Sebastian A, Rani S, Ray S, Harrys Kishore CJ, Kanth S, Ahmed M, Kashyap MK, Mohmood R, Ramachandra YL, Krishna V, Rahiman BA, Mohan S, Ranganathan P, Ramabadran S, Chaerkady R, Pandey A: **Human Protein Reference Database--2009 update.** *Nucleic Acids Res.* (2009) 37(Database issue):D767-72. Epub 2008 Nov 6;
- Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH: **The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase.** *J Cell Biol.* (1999) 146(5):917-28;
- Kim KA, Lee MS: **Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines.** *Front Biosci.* (2009) 14:657-64;

- Kleine H, Poreba E, Lesniewicz K, Hassa PO, Hottiger MO, Litchfield DW, Shilton BH, Lüscher B: **Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation.** *Mol Cell.* (2008) 32(1):57-69;
- Krishnakumar R, Kraus WL: **The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets.** *Mol Cell.* (2010) 39(1):8-24;
- Li Q, Verma IM: **NF- κ B regulation in the immune system.** *Nature Rev Immunol*, (2002) 2: 725-734;
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods.* (2001) 25(4):402-8;
- M. A. Atkinson: **ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease?** *Diabetes* (2005) 54: 1253-1263;
- Marshall OJ: **PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR.** *Bioinformatics.* (2004) 20(15):2471-2.
- Mehrotra P, Riley JP, Patel R, Li F, Voss L, Goenka S: **PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation.** *J Biol Chem.* (2011) 286(3):1767-76. Epub 2010 Nov 16;
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY: **The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition.** *Protein Sci.* (2004) 13(6):1435-48;
- Nusinow DA, Hernández-Muñoz I, Fazzio TG, Shah GM, Kraus WL, Panning B: **Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is inhibited by a histone H2A variant, MacroH2A, and contributes to silencing of the inactive X chromosome.** *J Biol Chem.* (2007) 282(17):12851-9.
- Obayashi T, Kinoshita K: **COXPRESdb: a database to compare gene coexpression in seven model animals.** *Nucleic Acids Res.* (2011) 39(Database issue):D1016-22.

- Patel S, Santani D: **Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications.** *Pharmacol Rep.* (2009) 61(4):595-603;
- Petrucco S: **Sensing DNA damage by PARP-like fingers.** *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:6689-6699;
- Powers AC, Efrat S, Mojsov S, Spector D, Habener JF, Hanahan D: **Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumor.** *Diabetes* (1990) 39:406-414;
- Raman K: **Construction and analysis of protein-protein interaction networks.** *Autom Exp.* (2010) 2(1):2;
- Rastogi S, Rost B: **LocDB: experimental annotations of localization for Homo sapiens and Arabidopsis thaliana.** *Nucleic Acids Res.* (2011) 39(Database issue):D230-4. Epub 2010 Nov 11;
- Ruf A, Menissier de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE: **Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996) 93(15):7481-5;
- Schaefer CF, Anthony K, Krupa S, Buchoff J, Day M, Hannay T, Buetow KH: **PID: the Pathway Interaction Database.** *Nucleic Acids Res.* (2009) 37(Database issue):D674-9. Epub 2008 Oct 2;
- Schott WH, Haskell BD, Tse HM, Milton MJ, Piganelli JD, Choisy-Rossi CM, Reifsnyder PC, Chervonsky AV, Leiter EH.: **Caspase-1 is not required for type 1 diabetes in the NOD mice.** *Diabetes.* (2004) 53(1):99-104;
- Shall S, de Murcia G: **Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?** *Mutat Res.* (2000) 460(1):1-15;
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME: **Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication.** *Mol Cell Biochem.* (1999) 193(1-2):137-48;

- Skidmore CJ, Davies MI, Goodwin PM, Halldorsson H, Lewis PJ, Shall S, Zia'ee AA:
The involvement of poly (ADP-ribose) polymerase in the degradation of NAD caused by gamma-radiation and Nmethyl-N-nitrosourea. *Eur J Biochem*, (1979) 101: 135-42;
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T: **Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization.** *Bioinformatics*. (2011) 27(3):431-2.
- Spina-Purrello V, Giliberto S, Barresi V, Nicoletti VG, Giuffrida Stella AM, Rizzarelli E: **Modulation of PARP-1 and PARP-2 expression by L-carnosine and trehalose after LPS and INF γ -induced oxidative stress.** *Neurochem Res*. (2010) 35(12):2144-53.
- Stark C, Breitkreutz BJ, Chatr-Aryamontri A, Boucher L, Oughtred R, Livstone MS, Nixon J, Van Auken K, Wang X, Shi X, Regulj T, Rust JM, Winter A, Dolinski K, Tyers M: **The BioGRID Interaction Database: 2011 update.** *Nucleic Acids Res*. (2011) 39(Database issue):D698-704. Epub 2010 Nov 11;
- Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature*. (2000) 403(6765):41-5;
- Suk K, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, Shong M, Lee MS.: **IFN γ /TNF α Synergism as the Final Effector in Autoimmune Diabetes: A key role for STAT1/IRF-1 in pancreatic b-cell death.** *J Immunol*. (2001) 166(7):4481-9;
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C: **The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored.** *Nucleic Acids Res*. (2011) 39(Database issue):D561-8.
- Tao Z, Gao P, Liu HW: **Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications.** *J Am Chem Soc*. (2009) 131(40):14258-60;

- Thomas HE, Irawaty W, Darwiche R, Brodnicki TC, Santamaria P, Allison J, Kay TW: **IL-1 receptor deficiency slows progression to diabetes in the NOD mouse.** *Diabetes*. (2004) 53(1):113-21;
- Thompson MJ, Lai WS, Taylor GA, Blackshear PJ: **Cloning and characterization of two yeast genes encoding members of the CCCH class of zinc finger proteins: zinc finger-mediated impairment of cell growth.** *Gene*. (1996) 174(2):225-33;
- Wang Y, Pontesilli O, Gill RG, La Rosa FG, Lafferty KJ: **The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1991) 88(2):527-31;
- Yeh TY, Sbodio JJ, Nguyen MT, Meyer TN, Lee RM, Chi NW **Tankyrase-1 overexpression reduces genotoxin-induced cell death by inhibiting PARP1.** *Mol Cell Biochem*. (2005) 276(1-2):183-92;
- Yu M, Schreek S, Cerni C, Schamberger C, Lesniewicz K, Poreba E, Vervoorts J, Walsemann G, Grötzinger J, Kremmer E, Mehraein Y, Mertsching J, Kraft R, Austen M, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B: **PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation.** *Oncogene*. (2005) 24(12):1982-93;

8. RINGRAZIAMENTI

Alla fine di un percorso di vita professionale, mi sembra giusto e doveroso ringraziare le persone che più mi sono state accanto in questi ultimi anni:

Ringrazio il Professor Michele Purrello per la fiducia e la stima che ha mostrato nei miei confronti e per aver coordinato e seguito attentamente il mio lavoro. Lo ringrazio, inoltre, per aver dato un valido sostegno alla passione che provo nei confronti della ricerca scientifica.

Ringrazio la Professoressa Cinzia Di Pietro per avermi dato un valido sostegno morale e preziosi consigli, utili per la mia formazione. La ringrazio anche per le volte che mi ha proposto di collaborare alle sue ricerche, dandomi così modo di crescere professionalmente.

Ringrazio le Professoresse Vittoria Spina-Purrello e Marina Scalia per avermi coinvolto nel loro lavoro, nonché argomento della mia tesi di dottorato. Le ringrazio, inoltre, per supporto scientifico che mi hanno dato.

Ringrazio i Dottori Marco Ragusa, Davide Barbagallo e tutti i miei Colleghi di laboratorio per la stima e disponibilità dimostrata in tutti questi anni di appassionato lavoro comune.

Un grandissimo Ringraziamento va alle persone che mi sono state sempre vicine nella vita privata:

Un Grande Ringraziamento va ai miei genitori, a mio fratello, a mia cognata, ai miei zii e altri parenti che sono sempre stati una famiglia esemplare e che non mi hanno mai fatto mancare il loro indispensabile aiuto e sostegno morale, anche nei momenti difficili. Ringrazio anche la piccola Virginia, mia nipote, che con il suo arrivo mi ha dato gioia e serenità.

Ed in fine, un Affettuoso Ringraziamento va ai miei amici di Giarratana, di Monterosso Almo, di Ragusa, di Catania, ai miei coinquilini attuali e passati perché sono stati sempre presenti anche nei momenti difficili, dispensando utili consigli e validi sostegni morali, e per gli straordinari momenti di vita passati insieme ... fino ad ora!!!