



FACULTAD DE BIOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOQUÍMICA

**Poli-ADP-ribosilación de proteínas y función en
procesos biológicos**

Ronald Fabricio Borja Guachamín

Dpto. de Genética

Tutora: Rosa M.^a Luna Varo

Curso académico:

2021/2022



ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. ADP-ribosilación y familia ADP-ribosiltransferasas.....	3
2.2. Familia ARTDs	4
2.3. Elementos del proceso de PARilación	5
2.4. Mecanismos de regulación de la PARilación.....	8
2.5. Más allá de la ADP-ribosilación de proteínas	9
3. FUNCIONES BIOLÓGICAS.....	10
3.1. Reparación del ADN	10
3.2. Regulación de la cromatina y la expresión génica	13
3.3. Biogénesis del ARN y ribosomas	16
3.3.1. Implicación de PARP en la biogénesis de ARN	16
3.3.2. Implicación de PARP en la ribogénesis	19
3.4. Mantenimiento de la integridad de los telómeros	20
4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS	23
4.1. Inhibidores de ARTDs.....	23
4.2. Aplicaciones de inhibidores ARTDs en cáncer	24
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA	28

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ARH3: ADP-ribosil hidrolasa 3

ARTs: ADP-ribosiltransferasas

ARTD: ART similares a la toxina diftérica

BER: Reparación por escisión de base

CAT: Dominio catalítico

DSB: Rotura de cadena doble en el ADN

Dominio WGR: Dominio triptófano-glicina-arginina

HD: Subdominio helicoidal

HR: Recombinación homóloga

hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa

MAR: Mono-ADP-ribosa

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NMN: Mononucleótido de nicotinamida

NELF: Factor de elongación negativo

NHEJ: Reparación por unión de extremos no homólogos

PAR: Poli-ADP-ribosa

PARG: PAR glicohidrolasa

PARP: Poli-ADP-ribosa polimerasa

PARPi: Inhibidores de PARP

PBM: Dominios de unión a PAR

PBZ: Motivos de dedo de Zinc de unión a PAR

RBP: Proteína de unión a ARN

RNAPII: ARN polimerasa II

snoRNA: ARN nucleolar pequeño

SSB: Rotura de cadena simple en el ADN

TNKS: Tankirasas

1. RESUMEN

Las modificaciones postraduccionales son muy importantes para la regulación de las proteínas y de numerosos procesos biológicos. Entre estas modificaciones destaca la ADP-ribosilación, una modificación reversible catalizada por la superfamilia de ADP-ribosiltransferasas que emplean el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para transferir ADP-ribosa a proteínas diana. Dentro de esta superfamilia, se encuentran las Poli-ADP-ribosa polimerasas PARP1/2 y las tankirasas TNKs1/2 capaces de desempeñar la poli-ADP-ribosilación de proteínas. Esta reacción se conoce como PARilación, la cual puede ser revertida por enzimas hidrolasas como PARG. El proceso de PARilación es un proceso complejo en el que tanto el reclutamiento de las enzimas ADP-ribosiltransferasas como su activación esta mediada por interacciones con ácidos nucleicos y otras proteínas, así como modificaciones postraduccionales incluyéndose la propia autoPARilación de estas enzimas.

La PARilación es muy importante porque está implicada en diferentes procesos celulares esenciales como la reparación del ADN, la regulación de la cromatina y la expresión génica, la biogénesis del ARN y ribosomas, y en el mantenimiento de los telómeros. El número de procesos en el que interviene la PARilación es creciente y en los últimos años, como fruto de la investigación básica, las PARPs y TNKs se han convertido en objetivos terapéuticos para el tratamiento de ciertas patologías en el campo de la Biomedicina.

En este trabajo se revisará el estado de conocimiento de estas enzimas, su función y regulación en el contexto de diferentes procesos biológicos, así como el empleo de inhibidores en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ADP-ribosilación y familia ADP-ribosiltransferasas

Hace casi 60 años Chambon y sus colaboradores descubrieron la poli-ADP-ribosilación (Chambon et al., 1963). Su hallazgo permitió iniciar un nuevo campo de la ciencia, que aún hoy en día continúa siendo explorado.

La ADP-ribosilación es una modificación postraduccional (PTM) reversible de proteínas que ejerce un papel importante en numerosos procesos biológicos. Consiste en la transferencia a un sustrato de una unidad de ADP-ribosa (ADPr), mono-ADP-ribosa (MAR), proceso denominado MARilación, o de varias unidades de ADP-ribosa, poli-ADP-ribosa (PAR), proceso denominado PARilación (Gupte et al., 2017) (fig.1A).

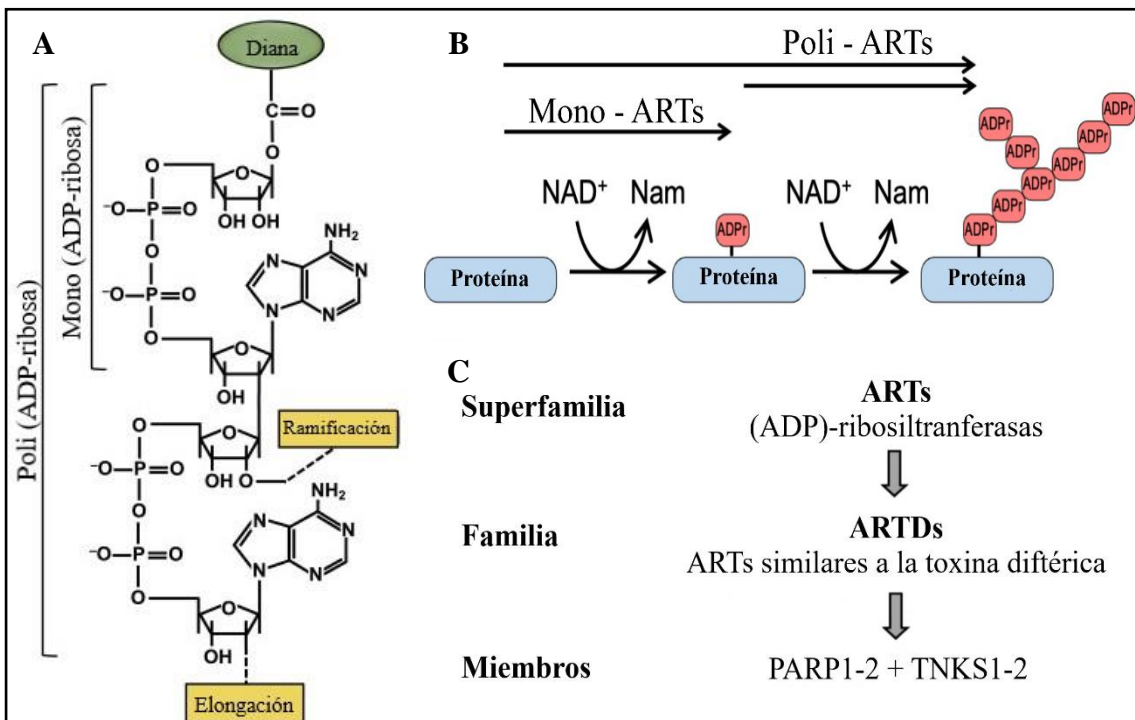


Fig. 1| A) Estructura química de mono-ADPr y poli-ADPr. La poli-ADP-ribosa se puede elongar mediante la adición de unidades de ADP-ribosa de forma lineal o ramificada. B) Reacción de ADP-ribosilación. Se transfiere ADP-ribosa a partir de NAD⁺ con la liberación de Nam. Las proteínas se ven modificadas con una o varias unidades de ADP-ribosa según sean catalizadas por Mono-ARTs o Poli-ARTs, respectivamente. C) Superfamilia de ADP ribosiltransferasas (ARTs). En este esquema se excluyen la familia R-[ST] y la familia HHh. ADPr, ADP-ribosa; NAD⁺, dinucleótido de nicotinamida y adenina; Nam, nicotinamida; PARP, poli-ADP-ribosa polimerasa; TNKS, tankirasas. Adaptada de (Huang & Kraus, 2022; Lüscher et al., 2021).

La ADP-ribosilación es catalizada por una superfamilia de proteínas llamadas ADP-ribosiltransferasas (ARTs), que transfieren ADPr del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) a un sustrato a través de enlaces N-, O- o S- glucosídicos (Lüscher et al., 2021) (fig.1B).

En cuanto a su estructura, la superfamilia ARTs contiene un subdominio específico denominado ART, dentro del cual se encuentran los aminoácidos necesarios para la catálisis y la unión de NAD⁺ (Cohen & Chang, 2018). Según los aminoácidos hallados en el subdominio ART pueden distinguirse tres subfamilias: HY-[EDQ], R-[ST] y HHh. Cada una de ellas comparte una estructura general compuesta por una hoja β dividida y dos regiones helicoidales (Lüscher et al., 2021). En este trabajo me centraré en la familia HY[EDQ] o también llamada ART similares a la toxina diftérica (ARTD) donde se encuentran las Poli-ADP-ribosa polimerasas (PARPs) y tankirasas (TNKs) (fig.1C).

2.2. Familia ARTDs

La familia ARTDs tiene en total 17 miembros que provocan la ADP-ribosilación de proteínas como, por ejemplo, histonas, enzimas, factores de transcripción y hasta de las propias PARP (automodificación) (Malgras et al., 2021). La mayoría de los integrantes de ARTDs llevan a cabo la PARilación de proteínas, mientras que, solo cuatro componentes son capaces de realizar la PARilación (PARPs-1, -2 y TNKs-1, 2) sin necesidad de un molde durante el proceso (McGurk et al., 2019). Será en estos últimos miembros capaces de PARilar en los que se centrará la revisión (tabla 1).

ARTD	PARP1 (116 kDa)	PARP2 (66 kDa)	TNK1 (142 kDa)	TNK2 (127 kDa)
Actividad	Poli	Poli	Poli/Oligo	Poli/Oligo
Secuencia de la tríada catalítica	HYE	HYE	HYE	HYE
Macromoléculas ADP-ribosiladas	Proteínas ADN	Proteínas ADN	Proteínas	Proteínas
Localización	Núcleo	Núcleo	Núcleo Citoplasma Telómeros Aparato Golgi	Núcleo Citoplasma Telómeros Aparato Golgi

Tabla 1|Características principales de las ARTDs encargados de la PARilación. Secuencia HYE (His-Tyr-Glu). Modificado de Manco et al., 2022.

Estos cuatro integrantes de la familia ARTDs tienen diferencias a nivel estructural. A nivel de ejemplo en la figura 2 se muestra el esquema de los dominios de la proteína PARP1. Así, comenzando por el extremo N-terminal, PARP1 consta de un motivo de unión a ADN con tres motivos de dedos de zinc (F1, F2, F3) y una señal de localización

nuclear; tras este se encuentra un dominio de automodificación, que contiene un extremo BRCA1 C-terminal (BRCT) encargado de mediar la interacción proteína-proteína y un motivo de cremallera de leucina (LZ); seguido del cual se localiza un motivo de triptófano, glicina y arginina (WGR); finalmente, en el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico (CAT) compuesto por el subdominio helicoidal (HD) y el subdominio ADP-ribosiltransferasa (ART) (Huang & Kraus, 2022; van Beek et al., 2021) (fig.2).

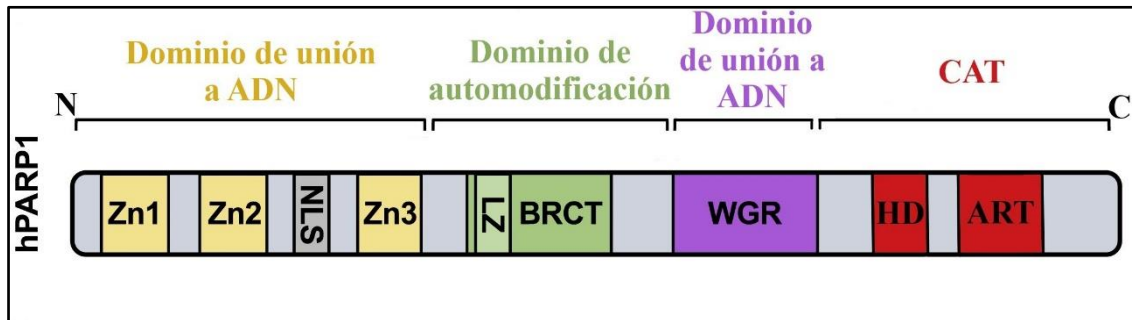


Fig. 2|Esquema de los dominios de PARP1. Se indican los dominios estructurales y funcionales de la proteína PARP1 humana. ART, ADP-ribosiltransferasa; BRCT, BRCA1 C-terminal; HD, subdominio helicoidal; LZ, cremallera de leucina; NLS, señal de localización nuclear; WGR, motivo de triptófano, glicina y arginina; ZN, dedo de zinc. Adaptada de (Huang & Kraus, 2022).

PARP2 comparte la región C-terminal con los dominios WGR y CAT, mientras que su extremo N-terminal, en humanos, es una región intrínsecamente desordenada (van Beek et al., 2021).

En relación con las tankirasas, ambas tienen dominios altamente conservados y comparten el dominio catalítico (CAT) en su extremo C-terminal. También, cerca del extremo N-terminal se localiza un dominio SAM, implicado en la formación de dímeros. Y, tras este, ocupando la mayor parte de la estructura de las tankirasas, se encuentran cinco grupos de repeticiones de anquirina, implicados en las interacciones proteína-proteína. La diferencia entre ambas radica en que, TNK1 contiene una región N-terminal rica en histidina, prolina y serina (HPS) no presente en TNK2 (Yu et al., 2022).

2.3. Elementos del proceso de PARilación

Dentro del proceso de PARilación puede realizarse una clasificación a nivel de funcionalidad, donde se distinguen escritores (*writers*), familia ARTD; lectores (*readers*),

proteínas con motivos de unión a PAR; y borradores (*erasers*), encargados de eliminar cadenas PAR (Poltronieri et al., 2021) (fig.3).

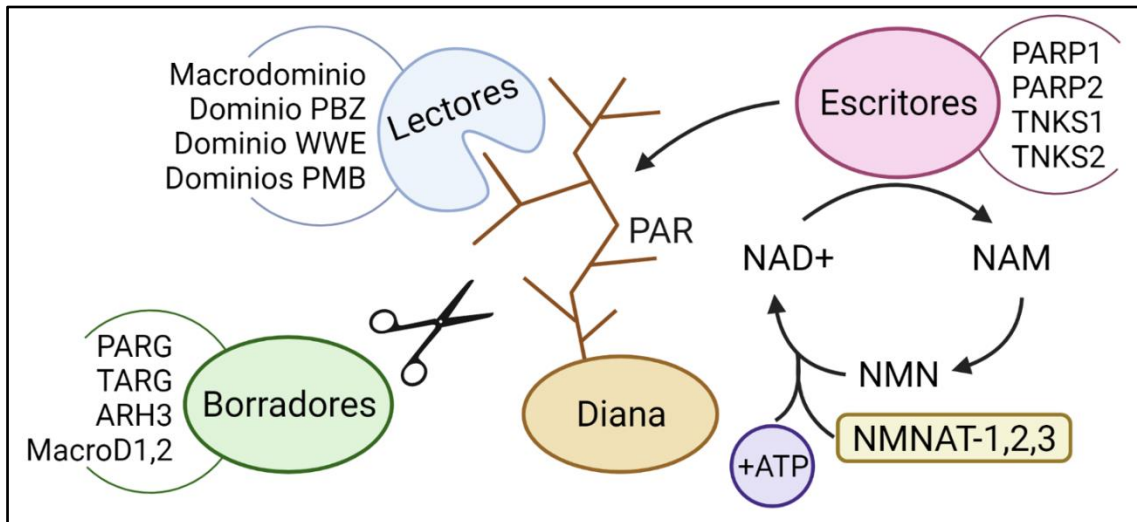


Fig. 3|Dinámica de ADP-ribosilación. Los miembros de la familia ARTD (PARPs1/2 y TNKs1/2) actúan como escritores (*writers*) añadiendo unidades de ADP-ribosa a la proteína diana y formando cadenas PAR. Para ello, requieren NAD⁺, este es suministrado por NMNAT, es decir, ejercen el papel de alimentadores (*feeders*). Las cadenas PAR son reconocidas por lectores (*readers*) que contienen dominios de unión a PAR o dominios WWE, entre otros. La eliminación de PAR es catalizada por borradores (*erasers*) como PARG o ARH3. NAD⁺, dinucleótido de nicotinamida y adenina; NAM, nicotinamida; NMN, mononucleótido de nicotinamida. Adaptada de (Gupte et al., 2017).

Los escritores (*writers*) de la familia ARTD son las polienzimas PARPs (PARP1, PARP2) y las tankirasas (TNK1, TNK2) que unen covalentemente las unidades de ADP-ribosa en los sustratos mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glucosídicos en cadenas lineales o ramificadas (fig.3). Todas ellas albergan la secuencia catalítica HYE (His-Tyr-Glu), siendo los residuos de histidina y tirosina necesarios para la orientación del NAD⁺, mientras que el glutamato es requerido en la actividad catalítica (Gupte et al., 2017). La principal diferencia entre las tankirasas y PARPs radica en la capacidad de poli-ADP-ribosilar. Mientras que PARP1 y PARP2 pueden sintetizar largas cadenas lineales de PAR alternadas con segmentos ramificados, las tankirasas solo modifican los sustratos añadiendo algunas unidades de ADP-ribosa, dando lugar a cadenas cortas de PAR de unas 20 unidades (Manco et al., 2022). Además, PARP1 y PARP2 son dependientes de ADN y tienen la capacidad de formar un heterodímero entre ellas capaz de llevar a cabo la ADP-ribosilación la una sobre la otra (Poltronieri et al., 2021).

Por otra parte, se denominan lectores (*readers*) a aquellas proteínas que poseen dominios o motivos capaces de reconocer y unirse a los sustratos de ADP-ribosa. Dentro de los dominios de estos lectores se encuentran algunos altamente caracterizados como dominios de unión a PAR (PMB), dominios WWE (dominio interacción proteína-proteína), macrodominios y motivos de dedos de Zinc con unión a PARP (PBZ) (fig.3).

Los PMB se caracterizan por ser secuencias cortas de unos 20 aminoácidos, mientras que los macrodominios son grandes dominios globulares de entre 130 y 190 aminoácidos aproximadamente capaces de unirse a un monómero de ADP-ribosa o la parte terminal de ADP-ribosa en una cadena PAR. Los PBZ son algo mayores que los PMB, de unos 30 aminoácidos que se unen en las zonas de unión de las unidades de ADP-ribosa de las cadenas y a los monómeros. Mientras que, los dominios WWE, se unen de forma exclusiva a los oligómeros o polímeros de ADP-ribosa y contienen residuos conservados de triptófano y glutamato (Gupte et al., 2017). Estos dominios o motivos se encuentran en diferentes proteínas, por ejemplo, los macrodominios se encuentran presentes en las histonas y, los PMB son característicos de proteínas involucradas en la respuesta de daño al ADN, la remodelación de la cromatina o el procesamiento del ARN. Por su parte, el dominio WWE se localiza en las E3 ubiquitin ligasas y algunas ARTDs como PARP1 y las tankirasas. Los PBZ se encuentran en proteínas involucradas en la regulación de los puntos de control activados en respuesta al daño del ADN (Poltronieri et al., 2021). Por último, hay que destacar que existen otros dominios que también actúan como lectores, aunque son menos conocidos como los ricos en glicina y arginina (GAR), los motivos de reconocimiento de ARN (RRM) y los dominios asociados a Forkhead de unión a fosfolípidos (FHA) y BRCA1 C-terminal (BRCT) (Gupte et al., 2017).

Finalmente, los borradores (*erasers*), son aquellas enzimas capaces de eliminar los residuos PAR de las proteínas de forma que contribuyen a la dinámica de ADP-ribosa en la célula. Entre estos borradores se incluyen enzimas hidrolasas tales como ADP-ribosil hidrolasa 3 (ARH3), PAR glicohidrolasa (PARG), ADP-ribosa glicohidrolasa terminal (TARG), Mono-ADP ribosilhidrolasa 1 (MacroD1) y Mono-ADP ribosilhidrolasa 2 (MacroD2) (fig.3). Muchas de ellas tienen una estructura característica con un pliegue que permite interaccionar con los sustratos ribosilados de ADP (Gupte et al., 2017). Sin embargo, el mecanismo por el cuál llevan a cabo el proceso de “borrado” es diferente, por ejemplo, tanto PARG como ARH3 muestra actividad hidrolítica exo- o endoglicosilasa y escinden los enlaces ribosa-ribosa dejando un ADPr terminal unido al residuo de aminoácido aceptor del sustrato. Por su parte, TARG, MacroD1 y MacroD2 son capaces de hidrolizar el enlace éster entre la ribosa y los aminoácidos aceptores, llevando a la eliminación completa de PAR (Manco et al., 2022).

Tanto las PARPs como las tankirasas son dependientes de una fuente de NAD⁺ para poder llevar a cabo el proceso de PARilación. Es por este motivo que debe existir una

fuente de NAD^+ en los compartimentos celulares en los que las enzimas ejercen su función. A partir del mononucleótido de nicotinamida (NMN) y ATP, las sintasas de NAD^+ , NMNAT-1, NMNAT-2 y NMNAT-3 (alimentadores o *feeders*), dan lugar a este producto que sirve como sustrato a las PARPs y las tankirasas (fig.3). Todas ellas tienen una diferente localización a nivel celular, distribuyéndose entre el núcleo (NMNAT-1), el citoplasma y aparato de Golgi (NMNAT-2) y las mitocondrias (NMNAT-3) (Gupte et al., 2017).

2.4. Mecanismos de regulación de la PARilación

Dentro de las enzimas involucradas en la PARilación, la regulación de PARP1 es la que mejor se conoce. Su actividad está contralada por interacciones con otras proteínas como, por ejemplo, histonas, HPF1, SIRT6, ERK2, CPB, p53, SAM68 o YB-1. En algunos casos, estas interacciones proteína-proteína son directas y no interviene el ADN, mientras que, en otros casos pueden verse estimuladas en presencia del ADN por la colaboración de sus dominios de unión al mismo (Alemasova & Lavrik, 2019) (fig4).

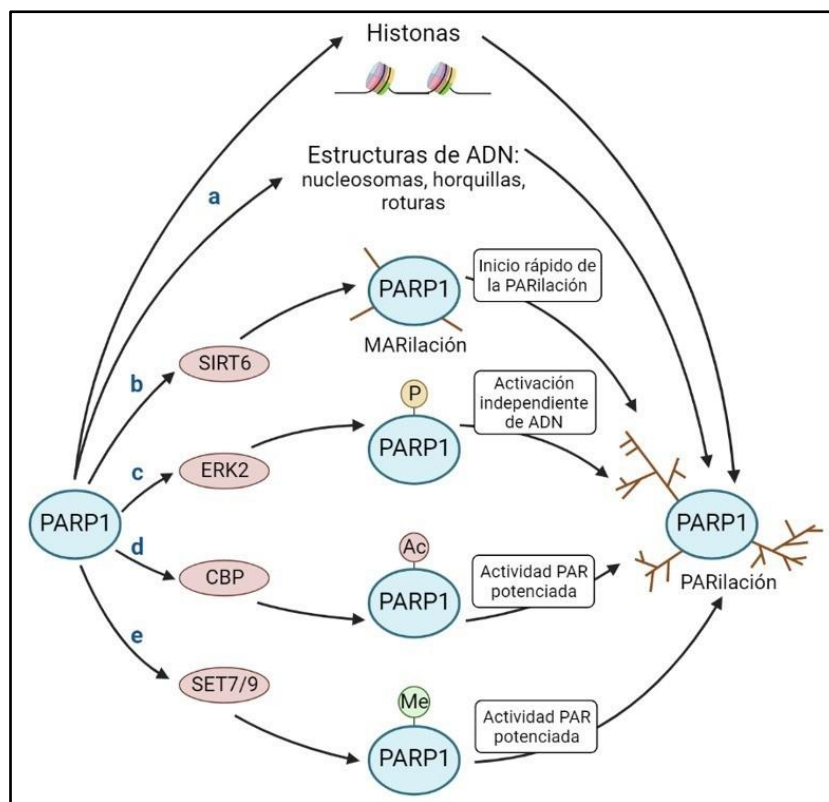


Fig. 4|Activación de PARP1. a) La unión entre PARP1 con las histonas o con ciertas estructuras del ADN estimula su actividad. b) PARP1 o sus sustratos pueden ser objeto de MARilación por SIRT6 desencadenando un método de inicio rápido para la generación de cadenas PAR. c) ERK2 puede fosforilar a PARP1 promoviendo su actividad catalítica o incentivar su autoPARilación sin depender del ADN. d) PARP1 puede ser acetilada por CBP, ocasionando un aumento en su actividad de PARilar. e) La metilación de PARP1 por SET7/9, también, acentuara su actividad de PARilar. CBP, proteína de unión a CREB; ERK2, quinasa 2 regulada por señal extracelular; SET, histona-lisina N-metiltransferasa; SIRT, sirtuina. Adaptada de (Gibson & Kraus, 2012).

Existen ciertos mecanismos posibles que explican cómo PARP1 es regulado por otras proteínas, entre ellos encontramos (1) proteínas de unión a ADN, las cuales pueden inhibir la actividad de PARP1 en función de su desplazamiento del ADN o estimularla al prevenir la unión catalíticamente ineficaz de PARP1 con ADN monocatenario; (2) proteínas que interactúan físicamente con PARP1, y que pueden influir en la actividad alostérica de PARP1; y (3) proteínas de unión a PAR, que pueden detectar la carga negativa de las cadenas PAR durante la elongación y estabilizar los complejos PARP1-ADN o proteger las cadenas PAR de la degradación aumentando su vida útil. En concreto, algunas proteínas que interactúan físicamente con PARP1 regulan su actividad mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la metilación, la PARilación y la acetilación (fig.4). En el caso de las proteínas de unión a PAR, la PARilación se desencadena debido a las ribosas PAR, es decir, la interacción de un sustrato con la cadena PAR perteneciente al PARP1 automodificado produce la PARilación del sustrato. Un ejemplo de esto último sería p53, esta se une a PARP1 automodificado mediante interacciones no covalentes entre PAR y su dominio C-terminal, que ocasionará la ADP-ribosilación covalente de p53 (Alemasova & Lavrik, 2019).

Por otra parte, existen mecanismos de regulación que dependen de la PARilación como es el caso de las modificaciones postraduccionales. En ellas, la PARilación de un sustrato es clave para su posterior modificación (Huang & Kraus, 2022).

2.5. Más allá de la ADP-ribosilación de proteínas

Normalmente la ADP-ribosilación se había considerado como una modificación postraduccional (PTM) reversible de proteínas. En contraste, varios estudios han revelado que los ácidos nucleicos, también, pueden desempeñar el papel de sustrato para la ADP-ribosilación y, por lo tanto, esta deja de ser considerada como una simple modificación postraduccional. Recientemente se ha descrito en bacterias una ribosilación de timidina que podría actuar como un mecanismo de antitoxina y en células de mamífero se ha descrito la ribosilación de extremos de ADN de doble cadena *in vitro*. También se han encontrado evidencias de ribosilación de moléculas de ARN, lo que podría tener una función en el proceso de “capping” o adición de la caperuza. Estas evidencias sugieren que la ribosilación de ácidos nucleicos pueda llegar a tener una gran implicación para los campos de reparación y epigenética del ADN (Gros Lambert et al., 2021).

3. FUNCIONES BIOLÓGICAS

3.1. Reparación del ADN

El ADN puede sufrir múltiples daños ocasionados por diversos factores tanto externos como internos. Para contrarrestarlos, el organismo posee diferentes mecanismos de reparación en los que las PARPs tienen un papel importante.

PARP1 es el principal factor encargado de la actividad celular de PARP durante el daño al ADN. Este factor puede ser activado por distintas formas de lesión, como roturas de ADN de cadena simple, SSB; de cadena doble, DSB; o por estrés replicativo y existencia de horquillas de replicación estancadas (Huang & Kraus, 2022). En concreto, PARP1 es esencial para la reparación de roturas SSB, aunque también se encuentra en la reparación por escisión de base (BER), por escisión de nucleótidos (NER), y en la reparación de roturas DSB por recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). En contraste, PARP2 solo interviene en SSB y en BER (Pandey & Black, 2021) (tabla 2).

PARP	Lesiones de ADN que reconoce	Vías de reparación de ADN
PARP1	Mellas, extremos romos, extensiones 5' o 3'	BER, NER, SSBR, DSBR, HR y NHEJ
PARP2	Fragmentos de ADN 5' fosforilados	BER y SSBR

Tabla 2| Similitudes y diferencias de las PARP que intervienen durante el daño al ADN. Tabla de (Pandey & Black, 2021)

En respuesta al daño del ADN, PARP1/PARP2 se activan catalíticamente y participan en las respuestas celulares de reparación del ADN. Para su estimulación es necesario que haya una alteración en el dominio CAT (exactamente en HD) mediante cambios alostéricos (Huang & Kraus, 2022) (fig.5).

En el caso de PARP1 se produce debido a la unión de los motivos de dedos de zinc (F1, F2, F3) y del dominio WGR al ADN dañado, provocando un cúmulo de dominios que causaran la alteración del dominio CAT y, por ende, la PARilación (Martin-Hernandez et al., 2017). Sin embargo, para la activación enzimática de PARP2 no es tan fundamental la región N-terminal, ya que carece de los motivos de dedos de zinc. Su activación requiere del dominio WGR, que se une a fragmentos de ADN 5'-fosforilados. Este intermediario se forma en etapas posteriores durante la replicación, por lo que se ha sugerido un reclutamiento gradual de PARP1 y después de PARP2 (Eisemann & Pascal, 2020; Pandey & Black, 2021).

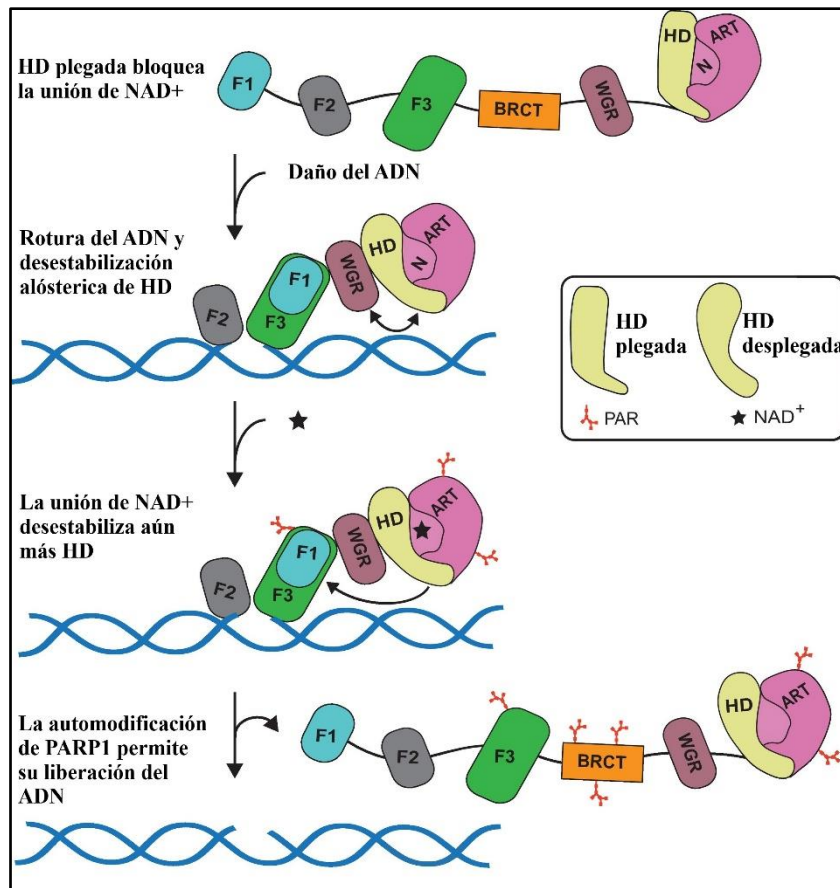


Fig. 5|Ciclo de PARP1 encendido/apagado. En ausencia de daño en el ADN los dominios de PARP1 no se encuentran acoplados y el subdominio HD actúa como inhibidor de la actividad de PARP a través del bloqueo de NAD⁺ al sitio activo (N). Tras el daño del ADN, PARP1 detecta esos daños mediante sus motivos de dedos de zinc y del dominio WGR provocando su colapso en torno al ADN dañado. El contacto entre los dominios causará la desestabilización de HD (flecha de dos puntas) permitiendo, así, la unión de NAD⁺ al sitio activo (N). La salida de PARP1 del ADN se lleva a cabo por la automodificación de PARP1, especialmente en el dominio BRCT. F1/F2/F3, dedos de zinc; HD, dominio helicoidal; N, sitio activo. Adaptada de (Pandey & Black, 2021).

Tras la detección del daño del ADN mediante los motivos de dedo de zinc/dominio WGR y la posterior activación de PARP por medio de la alteración del subdominio HD, se lleva a cabo el reclutamiento de los factores de reparación del ADN gracias a la producción de PAR (sobre la propia PARP1 y sobre otras proteínas). Por lo tanto, el PAR sintetizado por PARP1, para el caso de roturas SSB, recluta inicialmente a la proteína de reparación de rayos X (XRCC1), que funciona como base para las demás proteínas implicadas en la reparación como la ADN ligasa 3 (LIG3), la ADN polimerasa β y la polinucleótida quinasa bifuncional 3'-fosfatasa (PNKP) (fig.6A). Mientras tanto, para roturas DSB hay dos vías de reparación, cuya elección está definida por la fase del ciclo celular: HR (predomina en las fases S y G2) y NHEJ clásica/alternativo (predomina en G1) (fig.6B). Para el primer caso, PARP1 recluta al complejo MRE11-RAD50-NBS1(MRN) e indirectamente a BRCA1/2, esta última puede reclutarse por otros mecanismos independientes de la PARilación. Para el caso de la NHEJ clásica, se recluta a DNA-PKcs donde PARP1 estimula su actividad sin necesidad del complejo KU70-

KU80, también se reclutan a XRCC4 y LIG4. En el último caso, PARP1 puede fomentar la NHEJ alternativa al competir con el complejo KU y recluta al complejo MRN y CtIP, entre otros factores. En relación con el estrés replicativo (fig.6C), PARP1 regula la progresión de las horquillas estancadas, pudiendo invertirlas o estabilizarlas. La inversión de la horquilla de replicación (*replication fork reversal*) se consigue gracias a que PARP1 inhibe la actividad de la ADN helicasa Q1 dependiente de ATP (RECQ1), la cual podría reiniciar la horquilla sin permitir reparar las lesiones; mientras que, la estabilización se logra debido a la inhibición de la degradación de la horquilla por actividades endonucleasas MRN y EXO1 mediante el reclutamiento de BRCA1 (Huang & Kraus, 2022; Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

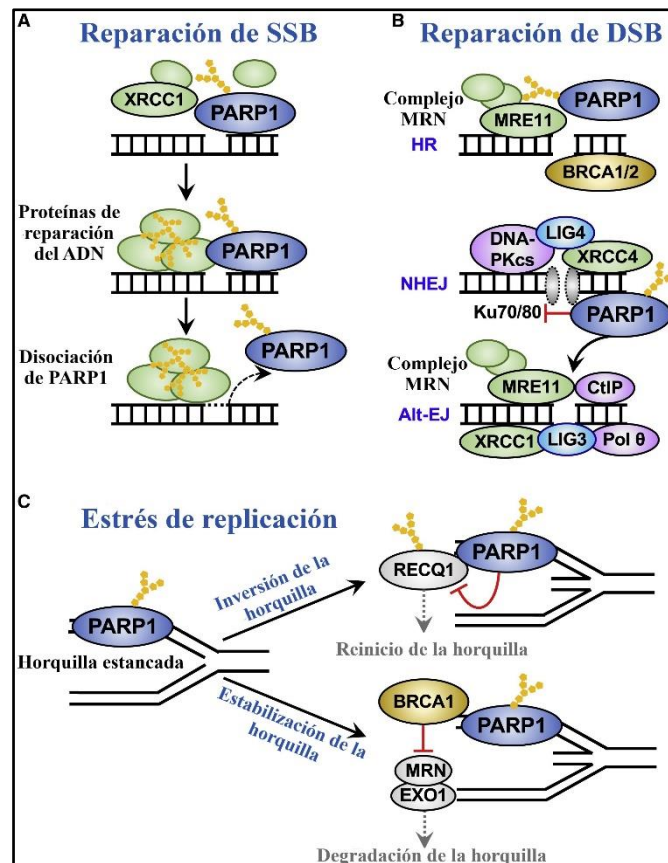


Fig. 6|Funciones de PARP1 en la reparación del ADN. A) Reparación de roturas monocatenarias (SSB). La automodificación de PARP1 provoca su activación y permite el reclutamiento de factores de reparación como XRCC1, igualmente, puede PARilar a otras proteínas de reparación para que contribuyan en el proceso. Por último, se produce la disociación de PARP1 mediante la automodificación para que la reparación del ADN se produzca de manera correcta. **B) Reparación de roturas de doble cadena (DSB).** PARP1 activado recluta al complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) y otros factores de reparación para la reparación realizada por recombinación homóloga. En el caso de NHEJ, PARP1 puede tanto contribuir a la vía clásica mediante la PARilación de DNA-PKcs para su activación como inhibir esta vía mediante la inhibición de las proteínas Ku70/80 y promover la vía alternativa (alt-EJ). **C) Estrés de replicación.** PARP1 regula la progresión de la horquilla estancada mediante dos maneras: invirtiendo la horquilla a través de la inhibición de RECQ1 impidiendo, así, el reinicio de la replicación o estabilizando la horquilla al reclutar BRCA1 que inhibe MRN y EXO1 para obstaculizar la degradación de la horquilla. Adaptada de (Huang & Kraus, 2022).

Finalmente, el ciclo de PARP1 acaba con su liberación del ADN dañado. Esto es posible gracias a la automodificación de PARP1. PARP1 automodificada tiene una carga muy negativa, lo que provoca una repulsión entre el ADN y los polímeros de PAR, que conducirá a la disociación de PARP1 del ADN. En conclusión, la automodificación permite tanto el reclutamiento de factores de reparación como la liberación de PARP1 del ADN (Pandey & Black, 2021). Además, se debe eliminar los residuos de ADPr de los sustratos modificados mediante las enzimas hidrolasas de PAR mencionadas anteriormente (como PARG), ya que una acumulación de PAR debido a un exceso de daño en el ADN induce un modo especializado de muerte celular llamado parthanatos (Eisemann & Pascal, 2020). Esta depende de la hiperactivación de PARP1 y la acumulación de PAR, ya que este favorece la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) de las mitocondrias, quien reclutará al factor inhibidor de la migración de micrófagos (MIF) al núcleo, el cual terminará separando el ADN en grandes fragmentos que causaran la muerte celular (Y. Wang et al., 2019).

Anteriormente se creía que las TNKs no intervenían en la respuesta al daño del ADN, ahora, se sabe que sí y que son fundamentales para la reparación de los daños del ADN telomérico donde PARP1/2 no tienen el mismo impacto (Eisemann & Pascal, 2020). Este papel de las TNKs se abordará con mejor detalle en el apartado de “Mantenimiento de la integridad de los telómeros”.

3.2. Regulación de la cromatina y la expresión génica

Las PARP nucleares se han asociado a los procesos de regulación de la cromatina a nivel de estructura y condensación siendo, esto, importante para mediar la transcripción génica y la reparación del daño al ADN. Tanto es así, que una de las primeras funciones que se atribuyó a PARP1 fue, precisamente, en la regulación de la estructura de la cromatina. En concreto sobre las histonas mediando su ADP-ribosilación (revisado en Huang & Kraus, 2022) (fig7).

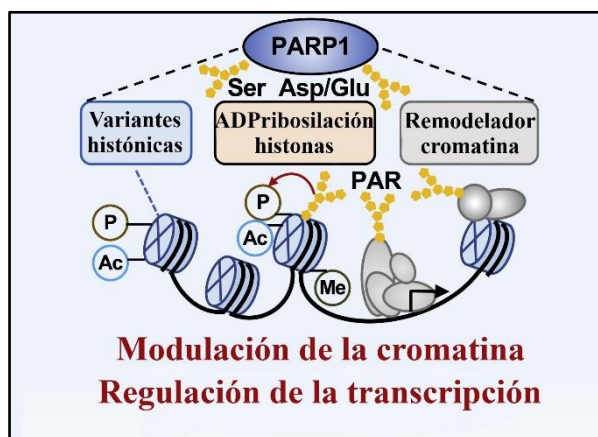


Fig. 7|Funciones de PARP1 en la regulación de la cromatina. PARP1 puede modular la estructura y la función de la cromatina mediante la ADP-ribosilación de histonas y de sus respectivas variantes o regulando a los remodeladores de la cromatina. También, la PARilación puede estimular (flecha roja) o inhibir ciertas modificaciones postraduccionales como la fosforilación. Imagen adaptada de (Huang & Kraus, 2022).

Con el fin de que la estructura de la cromatina se remodele y se vuelva accesible, tanto para la ARN polimerasa como para los factores de transcripción, PARP1 regula las estructuras tridimensionales de la cromatina o puede actuar de forma local (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

A nivel de la estructura 3D, PARP1 actúa regulando estructuras tridimensionales de cromatina de orden superior a través de la interacción con el factor de unión a CCCTC (CTFG). La PARilación estabiliza la unión de CTFG al ADN. Además, esta interacción es recíproca y cooperativa, pudiendo ser el factor el que induzca la activación de PARP1. Como resultado la estructura de la cromatina se abre facilitando las interacciones intracromosómica y dando lugar a la formación de bucles de cromatina que aumentan la expresión de ciertos genes (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

En la regulación localizada, en respuesta a señales ambientales o del desarrollo, PARP1 se une cerca de los promotores de los genes transcripcionalmente activos. Así, PARP1 compite con la histona conectora H1 por la unión a la cromatina, promoviendo una arquitectura abierta de la cromatina e impulsando la expresión génica, suceso independiente de la actividad catalítica de PARP1. Además, PARP1 puede PARilar a la enzima lisina desmetilasa 5B (KDM5B) de forma que impide su unión a la cromatina y previene la desmetilación de las lisinas en la posición cuatro de la histona 3 (H3K4me3), ocasionando un aumento de la transcripción. O sobre la ADN metiltransferasa DNMT1, cuya PARilación inhibe su capacidad de metilar al ADN aumentando, igualmente, la transcripción (Huang & Kraus, 2022).

Las histonas como H1, así como histonas del núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) e incluso muchas variantes histónicas son sustratos para la ADPRilación. Así, se han descubierto sitios específicos de ADPRilación en las histonas, de forma que, dependiendo del residuo en el que se lleve a cabo, la respuesta biológica cambiaría. De esta forma, durante las respuestas al daño del ADN, por ejemplo, la ADP-ribosilación ocurre de forma predominante en los residuos de serina y cuenta con el factor accesorio para la PARilación de histonas HPF1. Siendo el complejo PARP2-HPF1 responsable de la unión de nucleosomas y alineación del ADN roto para su posterior ligadura (van Beek et al., 2021). Por su parte, la histona H4 tiene la capacidad de activar a PARP1 de forma prolongada mediante su unión al dominio CAT manteniendo la cromatina en un estado laxo para que pueda acceder la maquinaria de transcripción (Thomas et al., 2019). Mientras que, en sitios en los que hay daño al ADN, PARP1 se une a variantes histónicas como macroH2A1.2, siendo capaz de reclutar a la desmetilasa KDM5A lo que resulta en la represión de la transcripción génica (Huang & Kraus, 2022).

En general, los PARP nucleares regulan y reclutan a remodeladores de cromatina, complejos de represión de la transcripción en la respuesta al daño del ADN y a factores que median la reparación como NR4A (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). Entre los remodeladores destaca ALC1. Esta enzima es reclutada y activada por PARP1, repositionando los nucleosomas y relajando la cromatina para aumentar la accesibilidad a los factores de reparación. Igualmente, se reclutan de forma dependiente de PARP1 otros remodeladores que promueven la reparación por NHEJ, como SMARCA5 capaz de interaccionar con la ubiquitina ligasa E3 PARilada o CHD2 que desencadena la deposición de la variante histónica H3.3 en las regiones dañadas haciendo que se relaje la cromatina (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). Por el contrario, la PARilación de los remodeladores, también puede provocar su degradación por ubiquitinación, tal es el caso de BRD7, un componente del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF (Huang & Kraus, 2022).

Asimismo, entre los complejos de represión de transcripción reclutados por PARP1 se encuentran las proteínas del complejo de remodelación de nucleosoma y desacetilasa CHD4 y MTA1 (NuRD), así como miembros del complejo represivo Polycomb (PRC1) (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

Por lo tanto, en los lugares de ADN dañado PARP1 puede relajar la cromatina a través del desplazamiento de los nucleosomas para, a continuación, reprimir la actividad

transcripcional evitando la interferencia entre la maquinaria de reparación y la de transcripción (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

3.3. Biogénesis del ARN y ribosomas

Cada vez existe más evidencia de que los eventos de PARilación mediados por PARP1 y PARP2 son reguladores claves en el proceso de síntesis de proteínas. De forma que, estas enzimas, participan activamente en la síntesis, el procesamiento y la traducción del ARN mensajero (ARNm) y, también, en el proceso de transcripción y biogénesis de ribosomas.

La regulación de estos procesos puede darse por la unión directa al ARN o sus proteínas de unión, o bien, a través de la PARilación o el reconocimiento de PAR por moléculas diana. En cuanto a los dominios con los que interacciona con el ARN, parecen ser distintos para PARP1 y PARP2. En PARP1 todos los dominios están implicados en la unión, pero cobran mayor importancia el C-terminal y el dominio de Zinc 3, F3, aunque la ausencia de F3 no impide la unión al ARN. En el caso de PARP2, el dominio WGR se requiere tanto para la unión como para la activación de su actividad catalítica (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

3.3.1. Implicación de PARP en la biogénesis de ARN

Para que la transcripción tenga lugar, tanto la ARN polimerasa como los factores de transcripción deben ser capaces de acceder a las secuencias promotoras del ADN. Por lo tanto, el primer paso es la reorganización de la estructura de la cromatina, para el que la implicación de PARP se ha descrito en el apartado anterior. Una vez accesible el ADN, PARP participa como regulador directo de la maquinaria de transcripción (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

Así, PARP1 tiene la capacidad de actuar de forma similar a un factor de transcripción clásico al unirse a los promotores o, interactuar con otros factores de transcripción actuando como coactivador o correpresor (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

Una vez iniciada la transcripción, la ARN polimerasa II (RNAPII) lleva a cabo la elongación del ARNm. En este paso, PARP1 actúa a través del factor negativo de elongación NELF. Durante la pausa de RNAPII, un punto de control para garantizar el reclutamiento adecuado de factores de empalme y alargamiento, NELF se une junto a PARP1 al pre-ARNm. Una vez unidos la fosforilación parcial del dominio C-terminal de la Pol II recluta a la región de baja complejidad del factor de elongación P-TEFb activando a la quinasa CDK9 que, a su vez, hiperfosforila el C-terminal de la polimerasa

y fosforila a NELF-E, subdominio de NELF. Esta fosforilación es la responsable de que PARP1 se autoPARile y PARile a NELF-E, impidiendo la unión de este último factor al ARN y su función. De esta forma tanto PARP1 como NELF-E se liberan del pre-ARNm y, permiten a la RNAPII realizar la elongación de la transcripción (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021; Gibson et al., 2016) (fig.8).

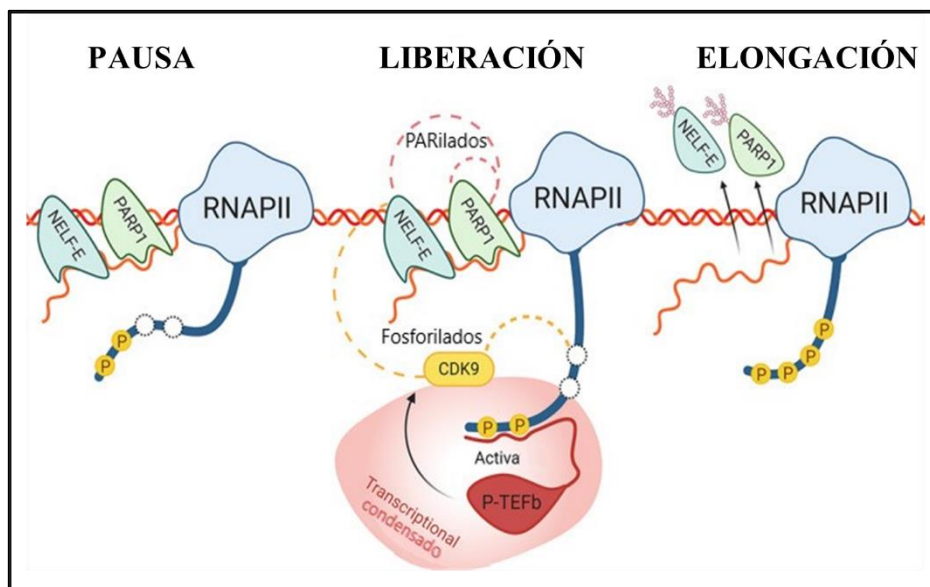


Fig. 8|Papel de PARP1 en la elongación del ARNm. En la pausa de transcripción de RNAPII, el ARNm nascente se asocia a PARP1 y NELF-E. La fosforilación parcial del dominio C-terminal de la polimerasa activa a la región P-TEFb que, a su vez, activa a CDK9. Esta enzima hiperfosforila el C-terminal de la RNAPII y fosforila a NELF-E. La fosforilación de NELF-E actúa como señal de PARilación para PARP1, que también se autoPARila. Estas PARilaciones inhiben sus uniones al ARNm, liberándose y permitiendo la elongación de RNAPII. RNAPII, ARN polimerasa II. Modificado de (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

Durante la elongación del mensajero tienen lugar los eventos de empalme alternativo. En este procesamiento del ARNm, PARP1 se une a los nucleosomas en las regiones entre exones e intrones. Esta asociación entre la cromatina y PARP1 afecta de forma directa al empalme alternativo, mientras que, la autoPARilación de PARP1 regula indirectamente a través de la PARilación de las propias histonas o de los factores de empalme (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

Según la estructura de la cromatina, se han propuesto dos modelos no excluyentes que explican la regulación del procesamiento alternativo de exones/intrones y en los que podría actuar PARP1. El primero es el modelo cinético, en el que la estructura de la cromatina regula la velocidad de elongación de la RNAPII influyendo en el resultado del empalme (Nieto Moreno et al., 2015). En este caso, PARP1 puede modificar la estructura de la cromatina de forma que se crea una barrera a la elongación (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021). En el segundo modelo, denominado adaptador, la cromatina o sus

factores asociados reclutan a factores de empalme que se unen el ARNm (Nieto Moreno et al., 2015). PARP1 se une al pre-ARNm y recluta a los factores de empalme al ARN (E. Matveeva et al., 2016). Además de los factores de empalme, en el procesamiento alternativo están implicadas 3 tipos de proteínas de unión al ARN (RBP): ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP), proteínas ricas en serina (SRP) y ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP). Estas proteínas y factores de empalme pueden ver su actividad alterada por PARP1 a través de interacciones covalentes proteína-proteína, por la PARilación de los propios factores de empalme o por la interacción no covalente de las RBPs a través de las cadenas PAR resultantes de la autoPARilación de PARP1 (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021; Huang & Kraus, 2022).

El paso final del procesamiento de ARNm maduro es la escisión endonucleolítica y la síntesis de la cola poli (A). En este proceso de poliadenilación PARP1 es capaz de PARilar a las enzimas poli(A)polimerasas provocando su disociación del ARNm y consiguiendo que se vea afectada tanto al transporte como la estabilidad del ARN mensajero (di Giammartino et al., 2013).

A nivel de estabilidad del ARNm varios estudios relacionaron a los *knockdown* de PARP1, con una reducción significativa de la vida media del ARNm diana de la enzima. También en estas células con nivel reducido de PARP1 se observó un incremento de la transcripción de genes implicados en la vía NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), que se encarga de eliminar el ARNm con codones de terminación tempranos. Por lo tanto, es probable que PARP1 esté involucrada en la vía NMD (E. A. Matveeva, Mathbout, et al., 2019). Asimismo, la PARilación de HuR, una proteína de unión a AREs (elementos ricos en adenilato y uridilato que se encuentran dentro de la región 3'UTR de los ARNm) aumenta la estabilidad del ARNm. Sin embargo, todos estos mecanismos por los cuales PARP1 media la estabilidad del mensajero son aún desconocidos (Ke et al., 2017).

Por último, para que tenga lugar la expresión de los genes eucariotas, se necesita que el ARNm, así como algunas moléculas de ARN no codificante se transporten desde el núcleo hasta el citoplasma donde tendrá lugar la traducción en los ribosomas. En la exportación el ARNm se transporta formando complejos con proteínas de unión a ARN y proteínas receptoras capaces de interactuar con los poros nucleares. De tal forma que, PARP1 media este proceso bien a través de la interacción con los receptores o con los complejos. Un ejemplo es la PARilación de ciertas subunidades del complejo

THO/TREX, implicado en la transcripción y transporte del ARNm, la cual estimula las interacciones entre las subunidades (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

3.3.2. Implicación de PARP en la ribogénesis

Tanto PARP1 y PARP2 están altamente involucradas en la regulación de la transcripción del ARNr, el procesamiento del pre-ARNr y en la formación de ribosomas. Este proceso de biogénesis de ribosomas y síntesis de ARNr tiene lugar en el nucléolo y es de vital importancia para la traducción adecuada de las proteínas. PARP1 tiene la capacidad de interactuar con dos tipos de ARN nucleolares: ARN asociado a los promotores y ARN nucleolar pequeño (snoRNA) mediando la PARilación en la transcripción del ARNr (Huang & Kraus, 2022).

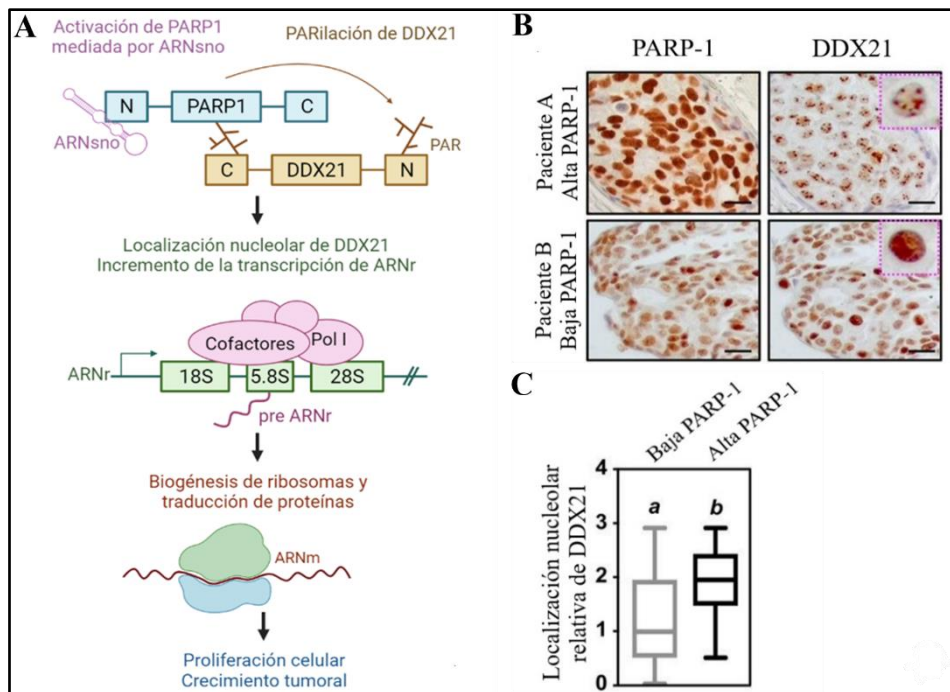


Fig. 9|A) PARilación de DDX21 mediada por snoRNA. B) Tinción inmunohistoquímica de PARP1 y DDX21 en muestras de tejido mamario canceroso de pacientes con PARP-1 alta y baja. C) Cuantificación nuclear de DDX21 en muestras de cáncer de mama con PARP-1 baja (a) y alta (b). Barras de escala 50µm. Las cajas de C son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, prueba t-student de dos colas). Modificado de (Kim et al., 2019).

Como ejemplo a estas interacciones se encuentra la PARilación de TIP5, un componente del complejo de remodelación nucleolar, que se produce a través de ARN asociados al promotor y promueve el silenciamiento de la cromatina del ARNr en la replicación (Huang & Kraus, 2022). Mientras que, en la PARilación de DDX21, una helicasa de ARN, la activación de PARP1 está mediada por snoRNA. En este caso, DDX21 PARilada se localiza en el nucléolo, potenciando la transcripción del ARNr, aumentando el ensamblaje de los ribosomas y la síntesis de proteínas. En el cáncer de

mama, un alto nivel de PARP1 provoca la localización nucleolar de DDX21 que conlleva un aumento de la proliferación celular y el crecimiento tumoral (Kim et al., 2019) (fig.9).

En ausencia de estrés, sobre un 40% de PARP1 se encuentra en el nucléolo, esto es debido a que PARP1 contiene una señal de localización nucleolar en su extremo N-terminal. Y, no sólo su ubicación en el nucléolo es importante sino también su capacidad para localizar a otras proteínas nucleolares implicadas en la biogénesis ribosomal. Como muestra de ello, PARP1 y PARP2 activas relocalizan a la ADP-ribosa hidrolasa TARG1 al nucleoplasma mediante PARilación en respuesta al daño en el ADN. Mientras que, en ausencia de daño, la hidrolasa TARG1 se localiza principalmente en el nucléolo controlando la transcripción del ARNr (Huang & Kraus, 2022; Kim et al., 2020).

Además, la PARilación también podría interrumpir el ensamblaje de los ribosomas interfiriendo con la interacción entre el ARNr y las proteínas ribosómicas. Encontrándose que algunas subunidades ribosómicas ribosiladas darían lugar a una unión debilitada y a la interrupción del ensamblaje. Del mismo modo, las propias proteínas ribosómicas PARiladas también podrían ser causantes de defectos en la traducción proteica (Eleazer & Fondufe-Mittendorf, 2021).

3.4. Mantenimiento de la integridad de los telómeros

Los telómeros son complejos de nucleoproteínas necesarios para la conservación de la estabilidad genómica, ya que se encargan de proteger los extremos de los cromosomas. Su pérdida ocasionaría múltiples enfermedades humanas. Entre los factores que tienen un papel en la preservación de la integridad de los telómeros se encuentran las ADP-ribosiltransferasas, sobre todo las TNKs1/2, aunque recientemente, hay estudios que indican que tanto PARP1 como PARP2, también, tendrían una función en la protección de los telómeros (Muio et al., 2022).

Los telómeros están formados por ADN telomérico compuesto por repeticiones de TTAGGG, cuya hebra rica en G acaba en un saliente monocatenario 3' que se pliega hacia atrás uniéndose con la hebra C del ADN de doble cadena aguas arriba. Por consiguiente, se forma un bucle D que dará lugar a una estructura de orden superior llamada bucle T. Otra peculiaridad de los telómeros es su vinculación con Shelterina, un complejo proteico de 6 subunidades (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1), que protege al telómero de reparaciones de ADN no solicitadas, y también contribuye al mantenimiento de su estructura. Por último, se encuentra la telomerasa, una

ribonucleoproteína que mantiene la longitud de los telómeros al incorporar repeticiones de TTAGGG. La cual se encuentra compuesta por una transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT) y un componente de ARN (hTERC), además de otros factores proteicos (Muio et al., 2022).

Las TNKs intervienen en la conservación de los telómeros mediante tres maneras: regulando la telomerasa, resolviendo la cohesión de los telómeros, reparando el ADN telomérico (Azarm & Smith, 2020).

Las TNKs participan en la regulación de la telomerasa mediante la PARilación de TRF1, una subunidad de Shelterina, regula la telomerasa por medio del control de su acceso al ADN telomérico. La PARilación de TRF1 provoca su liberación del ADN y, como consecuencia, que la telomerasa pueda ingresar a los telómeros y alargarlos. Esta acción puede verse interrumpida por la subunidad TIN2 que impide la PARilación de TRF1, aunque aún no se comprende qué circunstancias desencadenan este acontecimiento (fig.10A). En definitiva, la sobreexpresión de las TNKs ocasiona el alargamiento de los telómeros en tanto que su inhibición o mutación provoca el acortamiento (Azarm & Smith, 2020; Muio et al., 2022) (fig.10B).

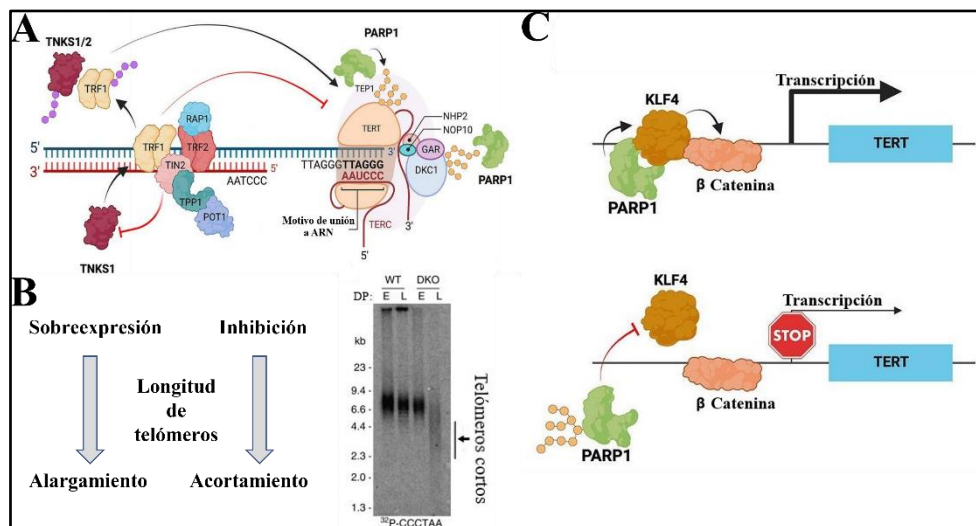


Fig. 10| Vías de regulación de la telomerasa y análisis de líneas celulares *knockout* de TNKs humanas generadas por CRISPR-Cas9. A) Actividad de TNKs sobre TRF1 y de PARP1 sobre TERT. La PARilación de TRF1 por TNKs provoca su desplazamiento del ADN para que la telomerasa acceda a los telómeros. Además, TIN2 regula negativamente a TNK1. Por otro lado, PARP1 podría PARilar a TERT para que la telomerasa pueda unirse al ADN. B) Análisis de la longitud de telómeros de células *knockout* de TNKs (DKO). Análisis Southern blot con sondas específicas para telómeros de células WT y DKO a un tiempo temprano (E) y a un tiempo tardío (T). Se observa un acortamiento de los telómeros en células DKO. C) Regulación de la expresión del gen de la telomerasa por PARP1. PARP1 podría controlar la expresión del gen hTERT al interactuar con el factor KLF4. La PARilación afecta a la interacción PARP1/KLF4 y disminuye la expresión de hTERT. DKO, doble *knockout* de TNKs1/2; DP, duplicaciones de población. Imagen adaptada de (Bhardwaj et al., 2017; Muio et al., 2022).

Existen ciertas incertidumbres en cuanto al papel que tiene PARP1 en la regulación de la telomerasa. Un posible mecanismo sería que PARP1 ejerce su actividad sobre hTERT permitiendo que se reclute la telomerasa al ADN telomérico (fig.10A), otro mecanismo sería la interacción de PARP1 con factores de transcripción como KLF4, de tal manera que actúa en el control de la expresión del gen hTERT (Muoio et al., 2022) (fig.10C). Por último, también hay evidencias de que PARP1 puede regular el ensamblaje de la telomerasa (Savelyev et al., 2021).

Las TNKs, también, intervienen en la resolución de la cohesión de los telómeros. En *knockdown* de TNKs se observa que las cromátidas hermanas presentan separación en los centrómeros y en los brazos cromosómicos, pero no se ven separadas en los telómeros, indicando que las TNKs tienen un papel en la resolución de los telómeros. (Eisemann & Pascal, 2020). Al contrario que en la regulación de la telomerasa, TNK1 y TNK2 no tienen funciones superpuestas, ya que las células *knockout* de TNK1 y TNK2 muestran el mismo fenotipo, es decir, una cohesión persistente de los telómeros. Es más, el doble *knockout* muestra un fenotipo más acusado que los *knockout* individuales (Bhardwaj et al., 2017). Además, una mutación, generada por CRISPR, en el sitio de unión a TNK de TRF1 permitió ver que se necesita esta subunidad para reclutar a TNK en los telómeros y, así, hacer la resolución (Azarm & Smith, 2020).

Finalmente, las TNKs ayudan a mantener la integridad del genoma mediante la reparación del ADN telomérico. Al no ser enzimas dependientes de ADN, no se activan directamente por el daño causado a este, sino que actúan indirectamente en la reparación mediante sus socios de unión como MDC1 (fomenta la reparación de DSB por HR), MERIT40 (también participa en las respuestas a DSB) o la proteína telomérica TRF1 (Azarm & Smith, 2020; Eisemann & Pascal, 2020). Este último es fundamental para la intervención de las TNKs en los telómeros, ya que la interacción TNKs-TRF1 resulta clave para el reclutamiento de proteínas de reparación como XRCC1 y Pol β involucradas en las rutas de reparación de SSB y BER (Muoio et al., 2022).

De igual importancia, con relación a la replicación de los telómeros, estos están sujetos al estrés de replicación ocasionando que las repeticiones teloméricas formen estructuras G4 que pueden ser un obstáculo para la replicación y contribuir a la inestabilidad genética. Se ha visto que la PARilación por PARP1 de ciertas helicasas favorecería la resolución de estas estructuras, evitando problemas en el avance de la replicación (Muoio et al., 2022).

4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

4.1. Inhibidores de ARTDs

Los inhibidores de ARTDs son sustancias que interfieren con las funciones de las enzimas encargadas de la PARilación. En concreto, inhibidores de PARP1 y PARP2 han sido ampliamente estudiados a nivel clínico. La mayoría de los inhibidores desarrollados hasta la fecha carecen de especificidad por cada una de las PARPs, pudiendo un mismo inhibidor contrarrestar la actividad tanto de PARP1 como de PARP2 y, con alta probabilidad la de otras PARPs (Lüscher et al., 2021). Este efecto pleiotrópico puede tener consecuencias no deseadas por lo que debería buscarse una mayor especificidad en los inhibidores. En cuanto al mecanismo de acción de los inhibidores, la mayoría interfiere con el bolsillo de unión a NAD^+ , de ahí la inespecificidad de la inhibición (Gupte et al., 2017). Aunque parece que dependiendo del inhibidor se muestran mayor selectividad para algunas ARTDs como olaparib, que tiene alta potencia, pero es menos selectivo para PARP1 y PARP2 (Thorsell et al., 2017). Actualmente, los inhibidores aprobados son aquellos específicos para el tratamiento del cáncer en el que hay defectos en la reparación del daño al ADN por recombinación homóloga, como es el caso de los tumores con mutaciones en los supresores tumorales BRCA1 o BRCA2 (Lüscher et al., 2021).

Nombre	Descripción	Referencia
Olaparib	Es muy eficaz en pacientes con cáncer de mama con mutación BRCA de línea germinal.	(Robson et al., 2017)
Rucaparib	Puede ser empleado en pacientes con cáncer de ovario con mutación en BRCA.	(Shirley, 2019)
XAV939	Puede ser usado en el carcinoma hepatocelular.	(W. Wang et al., 2021)
G007-LK	Puede ser aplicado en el cáncer colorrectal.	(Solberg et al., 2018)

Tabla 3|Inhibidores de PARP/TNKS y sus usos clínicos.

Sin embargo, es más reciente la investigación de los inhibidores de las tankirasas, que están arrojando datos prometedores de cara a su empleo en terapia contra el cáncer. Los inhibidores que se están probando actualmente son moléculas pequeñas que, en su mayoría, compiten con el NAD^+ por el dominio catalítico de las TNKs. Este sitio de unión se compone de un subsitio de unión a nicotinamida y otro de unión a adenosina. Por lo

tanto, los inhibidores pueden agruparse en tres grupos, miméticos de nicotinamida que pueden unirse a su correspondiente subsitio, miméticos de adenosina restringidos al subsitio de adenosina y, los que pueden interactuar con ambos. También se están buscando otros inhibidores que interactúen con dominios diferentes al sitio catalítico, como las repeticiones de anquirina bloqueando la interacción proteína-proteína, aunque son ejemplos más aislados (Yu et al., 2022).

4.2. Aplicaciones de inhibidores ARTDs en cáncer

En el tratamiento del cáncer muchos de estos inhibidores han resultado ser claves en terapia. Los ejemplos más conocidos son aquellos tumores de mama, ovario, trompas de Falopio o peritoneal con mutaciones a nivel de los supresores tumorales BRCA1 o BRCA2, los cuales intervienen en la reparación del ADN. Varios de estos PARPi han sido aprobados para su uso en clínica, como es el caso de *olaparib*, *rucaparib*, *niraparib* o *talazoparid*. Dado que los inhibidores afectan a la vía de reparación de ADN, causando una acumulación de SSB y la formación de DSB, si se aplican en cánceres con mutaciones en los supresores tumorales BRCA implicados en recombinación homóloga dan lugar a la letalidad sintética. Es decir, al encontrarse el ADN en un estado comprometido de reparación debido a que está inhibido de manera simultánea BRCA1/2 y PARP, se producirá la muerte de las células tumorales (Patel et al., 2020).

Sin embargo, es frecuente que las células cancerosas desarrollen resistencia a las monoterapias con PARPi. Estos mecanismos de defensa de las células tumorales pueden ser el resultado de mutaciones secundarias en genes como BRCA1, BRCA2 o Rad51C (otra proteína implicada en la reparación de DBS) que restauran su actividad en respuesta al daño o de modificaciones epigenéticas. Por ejemplo, estas células malignas pueden deshacer la hipermetilación de promotores de supresores tumorales restaurando la recombinación homóloga y permitiendo su supervivencia y proliferación. En definitiva, los pacientes con BRCA1/2 mutados o hipermetilados no tendrán una sensibilidad a los inhibidores de PARP debido a los mecanismos de resistencia creados por el cáncer. (Patel et al., 2020).

Una solución a estos problemas de resistencia son las terapias combinadas. En ellas, el inhibidor de PARP se complementa con otra terapia ya sea un fármaco de quimioterapia como el paclitaxel o de inmunoterapia (anticuerpo monoclonal), un agente antiangiogénico, un inhibidor de ATR (proteína quinasa implicada en el arresto del ciclo

celular en respuesta al daño en el ADN) e incluso una terapia de triple fármaco en la que se combinen tres de los anteriores (Y. Wang et al., 2021).

El uso de estas terapias está siendo ampliamente estudiado mediante múltiples ensayos clínicos en diferentes tipos de cánceres y contra diferentes tipos de células cancerosas. Por ejemplo, para los tumores gastrointestinales como pueden ser el cáncer de estómago o páncreas; y los carcinomas hepatobiliares, gastroesofágicos o colorrectales, con una alta incidencia en la población (Alhusaini et al., 2021).

En el cáncer colorrectal (CRC) inducido por inflamación PARP1 juega un papel crucial. Así, en etapas tempranas tiene un papel antitumoral, mediando la reparación del ADN. Sin embargo, a medida que progresa la enfermedad PARP1 activa a NFκB, lo que promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la metástasis como integrinas y metaloproteasas. La IL-6 además actúa a nivel de la vía STAT3 provocando la sobreexpresión de ciclina D1 y la proliferación celular (Alhusaini et al., 2021).

En el tratamiento del cáncer colorrectal se ha probado la terapia combinada del *olaparib* como inhibidor de PARP1 junto con un inhibidor de la quinasa ATM, KU55933. La proteína quinasa ATM es reclutada y activada en la reparación de las roturas de doble cadena del ADN y, sin embargo, su expresión génica se encuentra afectada en el cáncer colorrectal bien por mutaciones en el gen o bien por alteraciones en el número de copias de éste. Los resultados de la terapia conjunta fueron positivos mostrándose una mayor sensibilidad a *olaparib* en las células cancerosas tratadas con el inhibidor. Además, también se comprobó que la sensibilidad aumentaba en células con delección en el supresor de tumores p53 (C. Wang et al., 2017).

Otra de las terapias usadas para el cáncer colorrectal probó la eficacia de la combinación entre el PARPi *rucaparib* y el fármaco de quimioterapia *irinotecán*. Este fármaco actúa inhibiendo a la topoisomerasa I y provocando roturas en el ADN y la muerte celular. Para ello, llevaron a cabo xenotrasplantes de células HCT116 (células de cáncer colorrectal humano) en ratones y se comprobó que se producía una sinergia entre ambos fármacos. A nivel de volumen tumoral se observaba una reducción significativa con tan solo uno de los fármacos, pero la combinación conseguía que el peso del tumor disminuyese en un 96% (fig.11A), siendo los resultados claramente visibles en los propios ratones (fig.11B). También se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica en el tejido

del xenotrasplante, en concreto se estudió la presencia de caspasa 3 (marcador de apoptosis temprana y activadora de proteasas implicadas en la muerte celular), Ki67 (proteína nuclear empleada como marcador del crecimiento tumoral), pancitoqueratina y RPS6KB1 (proteína quinasa ribosomal). Los resultados de estos análisis mostraron un aumento significativo de la expresión de la caspasa 3 solo en el tratamiento con ambos agentes. Mientras que la expresión de Ki67, pancitoqueratina y RPS6KB1 era significativamente menor también al usar ambos fármacos y no en los grupos tratados con uno solo. Esto sugiere que la terapia combinada suprime el crecimiento y la diferenciación del tumor al inhibir la proliferación e inducir la apoptosis *in vivo*. Además, la ausencia de pancitoqueratina puede ser un indicador de la reducción de la migración celular y la metástasis; así como la reducción de la expresión de RPS6KB1 parece indicar una disminución en la actividad de mTOR (más activo en células cancerosas, contra la el crecimiento celular) (Augustine et al., 2019).

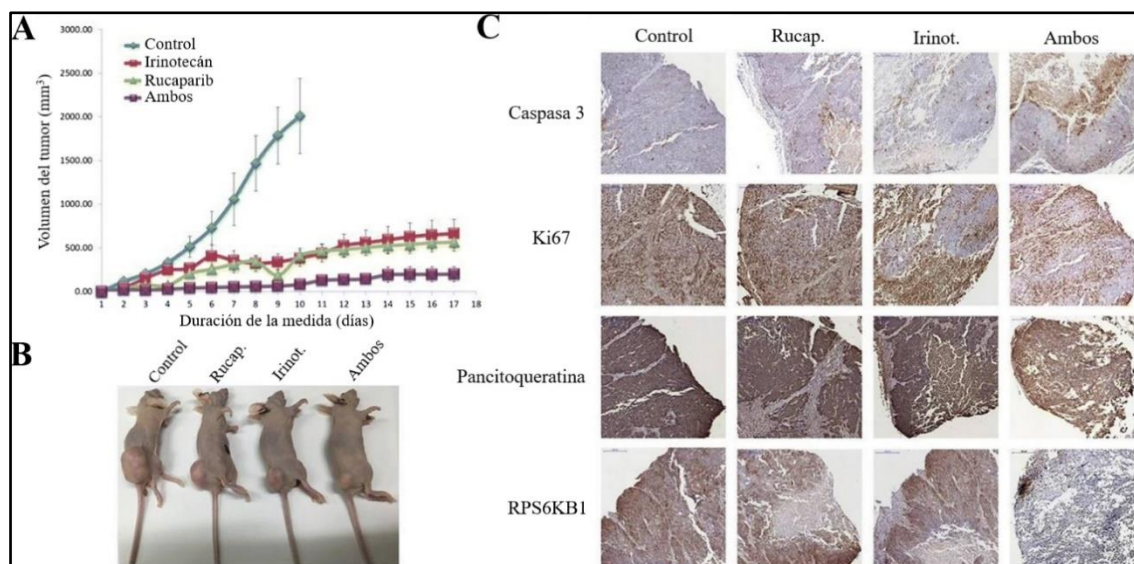


Fig. 11|Estudio de xenotrasplante in vivo. A) Gráfico de líneas que muestra la reducción significativa del tamaño del tumor en los ratones con xenotrasplantes de HCR116 ($p=0,005$) en los grupos control y tratado. Cada valor se expresa como media \pm SD para 6 ratones por grupo. B) Imágenes de los ratones tras aproximadamente dos semanas de tratamiento. C) Tinción inmunohistoquímica para caspasa 3, Ki67, pancitoqueratina y RPS6KB1 en tejido xenotrasplantado HCT1116 (aumento 10x). Imagen de (Augustine et al., 2019).

En el mismo contexto del cáncer colorrectal también se han realizado múltiples estudios utilizando inhibidores de las TNKs. En concreto, la relación entre el uso de estos inhibidores y el cáncer colorrectal viene dada por la implicación de las TNKs en la vía Wnt/ β -catenina. Esta vía se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los tumores colorrectales bien por la mutación de supresores (APC o AXIN) o de oncogenes (CRNNB1), lo que lleva a la acumulación de β -catenina nuclear y con ello a la activación de sus genes dianas que impulsan la proliferación celular. Los inhibidores de TNKs impiden que la axina del complejo degradador de β -catenina sea PARilada, lo que en

ausencia del inhibidor conduce a su degradación proteolítica y a la acumulación de la β -catenina (Zamudio-Martinez et al., 2021). Un ejemplo de estos inhibidores es el fármaco preclínico RK-582, que se une al subsitio de unión de la nicotinamida de forma altamente selectiva frente a otras PARPs. Se ha comprobado que este inhibidor bloquea la vía Wnt/ β -catenina, elevando los niveles de axina y reduciendo los de β -catenina. De forma que, muestra un potente efecto inhibiendo el crecimiento tumoral en modelos de ratones xenotrasplantados con adenocarcinomas humanos colorrectales (Shirai et al., 2020).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión de los múltiples componentes que son necesarios para el proceso de PARilación. Concretamente, se centró en las enzimas capaces de llevar a cabo la poli-ADP-ribosilación de proteínas, asimismo, se dilucidaron los mecanismos de regulación de una de ellas, PARP1, en los que se percibió que la PARilación puede verse afectada por modificaciones postraduccionales y que, a su vez, hay mecanismos de regulación que dependen de ella. Posteriormente, se indicaron las funciones biológicas, enfocadas a nivel del núcleo, en las que participan tanto PARPs1/2 como TNKs1/2. En el caso de la reparación del ADN, los principales involucrados son PARPs1/2 que al ser activados por una alteración en su dominio CAT participan en la reparación de roturas de ADN SSB, DSB o en la regulación de las horquillas de replicación estancadas. En los aspectos de regulación de la cromatina y expresión génica, PARP1 modula la estructura de la cromatina para permitir la expresión de genes o reprimir la transcripción para que no interfiera con la maquinaria de reparación en casos de ADN dañado. Respecto a la biogénesis del ARN, PARP1 actúa en todos los niveles del procesamiento del ARNm mediante su autoPARilación o la PARilación de factores implicados, pero aún se desconoce algunos mecanismos como el modo en el que PARP1 estabiliza el mensajero. En cuanto a la ribogénesis, PARP1 ejerce su función mediante la interacción con dos tipos de ARN nucleolares, ARN asociado a los promotores/snoRNA, que permiten la PARilación de elementos que provoquen el silenciamiento o la transcripción del ARNr. En el último caso, se observó que no sólo las TNKs1/2 sino que también las PARPs1/2 contribuyen en la protección de los telómeros. No obstante, debido a las múltiples localizaciones que poseen, albergan más funciones, no tratadas en este trabajo, implicadas en las infecciones virales, el metabolismo o la mitocondria. Finalmente, se habló de los inhibidores de estas enzimas, los cuales han resultado ser eficaces con aquellas células cancerosas que tienen mutados los supresores tumorales

BRCA1 o BRCA2. Aunque, para mejorar aún más el resultado de las terapias debido al desarrollo de resistencia por parte del cáncer, se propuso el uso de las terapias combinadas. En ellas, se emplea el inhibidor de ARTDs junto con otros fármacos como es el caso de *irinotecán*, un fármaco de quimioterapia, dando lugar a resultados positivos al disminuir la proliferación del cáncer de colon.

Los futuros estudios se deberían centrar más en la identificación de los sitios de ADP-ribosilación para poder establecer las consecuencias de esa modificación y así, identificar con más detalle los papeles en los que intervienen las enzimas causantes de la PARilación. De esta manera, una mejor comprensión ayudaría a poder atacar a las ARTDs de forma más efectiva y perfeccionar el uso de inhibidores como terapia.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alemasova, E. E., & Lavrik, O. I. (2019). Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: Reaction mechanism and regulatory proteins. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 47, Issue 8, pp. 3811–3827). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>
- Alhusaini, A., Cannon, A., Maher, S. G., Reynolds, J. v., & Lynam-Lennon, N. (2021). Therapeutic potential of parp inhibitors in the treatment of gastrointestinal cancers. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081024>
- Augustine, T., Maitra, R., Zhang, J., Nayak, J., & Goel, S. (2019). Sensitization of colorectal cancer to irinotecan therapy by PARP inhibitor rucaparib. *Investigational New Drugs*, 37(5), 948–960. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-00717-9>
- Azarm, K., & Smith, S. (2020). Nuclear PARPs and genome integrity. In *Genes and Development* (Vol. 34, Issue 5, pp. 285–301). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.334730.119>
- Bhardwaj, A., Yang, Y., Ueberheide, B., & Smith, S. (2017). Whole proteome analysis of human tankyrase knockout cells reveals targets of tankyrase-mediated degradation. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02363-w>
- Chambon, P., Weill, J. N., & Mandel, P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. In *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (Vol. 11, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(63\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(63)90024-X)
- Cohen, M. S., & Chang, P. (2018). Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 236–243). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2568>
- di Giammartino, D. C., Shi, Y., & Manley, J. L. (2013). PARP1 Represses PAP and Inhibits Polyadenylation during Heat Shock. *Molecular Cell*, 49(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.005>
- Eisemann, T., & Pascal, J. M. (2020). Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 1, pp. 19–33). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03366-0>
- Eleazer, R., & Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2021). The multifaceted role of PARP1 in RNA biogenesis. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1617>
- Gibson, B. A., & Kraus, W. L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 411–424). <https://doi.org/10.1038/nrm3376>
- Gibson, B. A., Zhang, Y., Jiang, H., Hussey, K. M., Shrimp, J. H., Lin, H., Schwede, F., Yu, Y., & Kraus, W. L. (n.d.). *Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation*. *Science* (New York, N.Y.), 353(6294), 45–50. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7865>
- Gros Lambert, J., Prokhorova, E., & Ahel, I. (2021). ADP-ribosylation of DNA and RNA. *DNA Repair*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103144>
- Gupte, R., Liu, Z., & Kraus, W. L. (2017). *PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes*. *Genes & development*, 31(2), 101–126. <https://doi.org/10.1101/gad.291518>
- Huang, D., & Kraus, W. L. (2022). The expanding universe of PARP1-mediated molecular and therapeutic mechanisms. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.02.021>

- Ke, Y., Han, Y., Guo, X., Wen, J., Wang, K., Jiang, X., Tian, X., Ba, X., Boldogh, I., & Zeng, X. (2017). PARP1 promotes gene expression at the post-transcriptional level by modulating the RNA-binding protein HuR. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14632>
- Kim, D. S., Camacho, C. v., Nagari, A., Malladi, V. S., Challa, S., & Kraus, W. L. (2019). Activation of PARP-1 by snoRNAs Controls Ribosome Biogenesis and Cell Growth via the RNA Helicase DDX21. *Molecular Cell*, 75(6), 1270-1285.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.020>
- Kim, D. S., Challa, S., Jones, A., & Kraus, W. L. (2020). PARPs and ADP-ribosylation in RNA biology: From RNA expression and processing to protein translation and proteostasis. In *Genes and Development* (Vol. 34, Issue 5, pp. 302–320). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.334433.119>
- Lüscher, B., Ahel, I., Altmeyer, M., Ashworth, A., Bai, P., Chang, P., Cohen, M., Corda, D., Dantzer, F., Daugherty, M. D., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Deindl, S., Fehr, A. R., Feijs, K. L. H., Filippov, D. v., Gagné, J. P., Grimaldi, G., Guettler, S., ... Ziegler, M. (2021). ADP-ribosyltransferases, an update on function and nomenclature. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.16142>
- Malgras, M., Garcia, M., Jousselin, C., Bodet, C., & Lévêque, N. (2021). The antiviral activities of poly-adp-ribose polymerases. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13040582>
- Manco, G., Lacerra, G., Porzio, E., & Catara, G. (2022). ADP-Ribosylation Post-Translational Modification: An Overview with a Focus on RNA Biology and New Pharmacological Perspectives. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12030443>
- Martin-Hernandez, K., Rodriguez-Vargas, J. M., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2017). Expanding functions of ADP-ribosylation in the maintenance of genome integrity. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 63, pp. 92–101). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.09.009>
- Matveeva, E. A., Mathbout, L. F., & Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2019). PARP1 is a versatile factor in the regulation of mRNA stability and decay. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39969-7>
- Matveeva, E., Maiorano, J., Zhang, Q., Eteleeb, A. M., Convertini, P., Chen, J., Infantino, V., Stamm, S., Wang, J., Rouchka, E. C., & Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2016). Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing. *Cell Discovery*, 2. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.46>
- McGurk, L., Rifai, O. M., & Bonini, N. M. (2019). Poly(ADP-Ribosylation) in Age-Related Neurological Disease. In *Trends in Genetics* (Vol. 35, Issue 8, pp. 601–613). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.05.004>
- Muoio, D., Laspata, N., & Fouquerel, E. (2022). Functions of ADP-ribose transferases in the maintenance of telomere integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(4). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04235-z>
- Nieto Moreno, N., Giono, L. E., Cambindo Botto, A. E., Muñoz, M. J., & Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin, DNA structure and alternative splicing. In *FEBS Letters* (Vol. 589, Issue 22, pp. 3370–3378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.002>
- Pandey, N., & Black, B. E. (2021). Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 46, Issue 9, pp. 744–757). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.014>
- Patel, M., Nowsheen, S., Maraboyina, S., & Xia, F. (2020). The role of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of cancer and methods to overcome resistance: A review. In *Cell and Bioscience* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00390-7>
- Poltronieri, P., Miwa, M., & Masutani, M. (2021). Adp-ribosylation as post-translational modification of proteins: Use of inhibitors in cancer control. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221910829>
- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 10, pp. 610–621). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delalogue, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1706450>
- Savelyev, N. v., Shepelev, N. M., Lavrik, O. I., Rubtsova, M. P., & Dontsova, O. A. (2021). PARP1 Regulates the Biogenesis and Activity of Telomerase Complex Through Modification of H/ACA-Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621134>
- Shirai, F., Mizutani, A., Yashiroda, Y., Tsumura, T., Kano, Y., Muramatsu, Y., Chikada, T., Yuki, H., Niwa, H., Sato, S., Washizuka, K., Koda, Y., Mazaki, Y., Jang, M. K., Yoshida, H., Nagamori, A., Okue, M., Watanabe, T., Kitamura, K., ... Koyama, H. (2020). Design and Discovery of an Orally Efficacious Spiroindolinone-Based Tankyrase Inhibitor for the Treatment of Colon Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(8), 4183–4204. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00045>

- Shirley, M. (2019). Rucaparib: A Review in Ovarian Cancer. *Targeted Oncology*, 14(2), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s11523-019-00629-5>
- Solberg, N. T., Waaler, J., Lund, K., Mygland, L., Olsen, P. A., & Krauss, S. (2018). TANKYRASE inhibition enhances the antiproliferative effect of PI3K and EGFR inhibition, mutually affecting β -CATENIN and AKT signaling in colorectal cancer. *Molecular Cancer Research*, 16(3), 543–553. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0362>
- Thomas, C., Ji, Y., Wu, C., Datz, H., Boyle, C., MacLeod, B., Patel, S., Ampofo, M., Currie, M., Harbin, J., Pechenkina, K., Lodhi, N., Johnson, S. J., & Tulin, A. v. (2019). Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), 9941–9946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901183116>
- Thorsell, A. G., Ekblad, T., Karlberg, T., Löw, M., Pinto, A. F., Trésaugues, L., Moche, M., Cohen, M. S., & Schüler, H. (2017). Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(4), 1262–1271. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00990>
- van Beek, L., McClay, É., Patel, S., Schimpl, M., Spagnolo, L., & Maia de Oliveira, T. (2021). Parp power: A structural perspective on parp1, parp2, and parp3 in dna damage repair and nucleosome remodelling. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22105112>
- Wang, C., Jette, N., Moussienko, D., Bebb, D. G., & Lees-Miller, S. P. (2017). ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib. *Translational Oncology*, 10(2), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.01.007>
- Wang, W., Liu, P., Lavrijssen, M., Li, S., Zhang, R., Li, S., van de Geer, W. S., van de Werken, H. J. G., Peppelenbosch, M. P., & Smits, R. (2021). Evaluation of AXIN1 and AXIN2 as targets of tankyrase inhibition in hepatocellular carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87091-4>
- Wang, Y., Luo, W., & Wang, Y. (2019). PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. In *DNA Repair* (Vol. 81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102651>
- Wang, Y., Zheng, K., Huang, Y., Xiong, H., Su, J., Chen, R., & Zou, Y. (2021). PARP inhibitors in gastric cancer: beacon of hope. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02005-6>
- Yu, M., Yang, Y., Sykes, M., & Wang, S. (2022). Small-Molecule Inhibitors of Tankyrases as Prospective Therapeutics for Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(7), 5244–5273. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02139>
- Zamudio-Martinez, E., Herrera-Campos, A. B., Muñoz, A., Rodríguez-Vargas, J. M., & Oliver, F. J. (2021). Tankyrases as modulators of pro-tumoral functions: molecular insights and therapeutic opportunities. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01950-6>