

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Karolína Vaničková

Zvýšená AID aktivita jako zdroj genomické nestability v klinicky relevantních nádorech

Genomic instability in patient tumours due to excessive AID activity

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.05.2019

.....

Karolína Vaníčková

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

AID je člen rodiny mutačních enzymů APOBEC. Deaminací cytosinu na uracil generuje v ssDNA nekomplementární U:G páry, které podléhají opravě chybovými DNA reparačními mechanismy. V B buňkách tak zvyšuje mutační nálož *Ig* lokusů v rámci reakce somatické hypermutace během afinitní maturace imunoglobulinů (Ig). Dále pomocí indukce dvouřetězcových zlomů umožňuje rekombinaci *Ig* během izotypového přesmyku nebo primární diverzifikaci *Ig* pomocí templátové genové konverze u některých druhů obratlovců.

Při nedostatečné regulaci těchto indukčních a reparačních procesů získává AID tumorigenní potenciál a stává se zdrojem genomické nestability u nádorů. V epiteliálních tkáních je exprese AID aktivovaná prozánětlivými cytokiny pomocí kanonické dráhy NF- κ B. Původci jsou jak exogenní zdroje (*Helicobacter pylori* nebo HCV), tak endogenní zdroje (žlučové kyseliny), i fyziologické procesy, například ovulace. Proto může být AID pojítkem mezi zánětem a nádory.

Ve většině dokumentovaných případů se AID podílí na iniciaci tumorigeneze. Ektopická exprese AID v myších modelech vede ke vzniku karcinomů plic, jater, žaludku, orálních karcinomů a melanomů, v dalších případech se podílí také na epiteliálně-mezenchymálním přesmyku. V případech CML a adenokarcinomů plic je AID zodpovědná za progresi onemocnění a je zdrojem získané rezistence k léčbě. Farmakologickou inhibicí AID dochází ke zvýšení efektivity léčby, či ke snížení progresi onemocnění.

Klíčová slova

AID, mutageneze, mutační nálož, zánět, karcinom, tumorigeneze, genomická nestabilita

Abstract

AID is a member of APOBEC family of mutational enzymes. AID generates U:G mismatches in ssDNA by deaminating cytosine to uracil. In B cells error-prone repair of these mismatches induces a mutational burden in the process of somatic hypermutation of *Ig* locus during affinity maturation of immunoglobulins (Ig). AID also induces double-strand breaks during Ig class switch recombination or primary Ig diversification through templated gene conversion in some vertebrate species.

AID might gain tumorigenic potential in case of insufficient regulation of induction and repair processes, causing genomic instability and possibly leading to tumorigenesis. AID is induced in epithelial tissues by proinflammatory cytokines via canonical NF- κ B pathway. Both exogenous factors (pathogens *Helicobacter pylori* or HCV), endogenous factors (bile acid) or even physiological state such as ovulation are the initiating factors. Thus, AID might be the link between inflammation and carcinogenesis.

AID is expressed in different stages of carcinomas, mostly during the initial oncogenic transformation. Mice with ectopic AID expression develop lung, gastric, oral and hepatic carcinomas as well as melanomas. AID also regulates epithelial-mesenchymal transition in other tumors. AID is responsible for treatment resistance in both CML and lung adenocarcinoma. Pharmacological inhibition of AID increases treatment efficacy and also decreases the disease progression.

Key words

AID, mutagenesis, mutational load, inflammation, carcinoma, tumorigenesis, genomic instability

Seznam zkratek

AK	Amino acid	Aminokyselina
ALL	Acute lymphoblastic leukaemia	Akutní lymfoblastická leukémie
BER	Base excision repair	Oprava vystřížením báze
CD	Catalytic domain	Katalytická doména
CDR	Complementary determining region	Regiony určující komplementaritu
CLL	Chronic lymphoblastic leukaemia	Chronická lymfocytární leukémie
CML	Chronic myeloid leukaemia	Chronická myeloidní leukémie
CSR	Class switch recombination	Izotypový přesmyk
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barr virus	Virus Epstein-Barrové
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	Epitelovo-mezenchymální tranzice
HCC	Hepatocellular carcinoma	Hepatocelulární karcinom
HCV	Hepatitis C virus	Virus žloutenky typu C
HIGM	Hyper IgM syndrome	Hyperimmunoglobulinemie IgM
ICB	Immune checkpoint blockade	Blok inhibičních kontrolních bodů
Ig	Immunoglobulin	Protilátka
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysacharid
MCC	Merkel cell carcinoma	Karcinom Merkelových buněk
miRNA	microRNA	mikroRNA
MMR	Mismatch repair	Oprava špatného párování bází
MSS	Microsatellite stability	Mikrosatelitní nestabilita
NES	Nuclear export signal	Jaderný exportní signál
NLS	Nuclear localization signal	Jaderný lokalizační signál
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní kyslíkové radikály
SH	Somatic hypermutation	Somatická hypermutace
siRNA	Small interfering RNA	Malé interferující RNA
SSB	Single base substitution signature	Podpis jednonukleotidové substituce
TAA	Thioacetamide	Thioacetamid
TF	Transcription factor	Transkripční faktor
tg	transgenic	transgenní
TMB	Tumour mutational burden	Mutační nálož
wt	wild-type	divoký typ

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Rakovina	1
1.2. Deaminační enzymy	3
2. Aktivací-indukovaná deamináza (AID)	5
2.1. Objev AID.....	5
2.2. Struktura a funkce.....	5
2.3. Oprava mutovaných nekomplementárních bází.....	7
2.4. Indukce exprese AID	8
2.5. Regulace AID.....	9
2.5.1. Regulace na úrovni transkripce	9
2.5.2. Post-transkripční regulace	9
2.5.3. Post-translační regulace	9
3. Role AID v imunitních tkáních	10
3.1. Somatická hypermutace (SHM).....	10
3.2. Genová konverze	11
3.3. Izotypový přesmyk protilátek (CSR).....	11
4. Vliv mutací na tumorigenezi	12
4.1. Mutační nálož nádoru (TMB)	12
4.2. Mutační podpisy	14
4.2.1. Mutační podpis APOBEC	14
4.2.2. Mutační podpis AID	15
5. AID jako zdroj genomické nestability v imunitních tkáních	17
5.1. Lymfomy.....	17
5.2. Leukémie.....	17
6. AID jako zdroj genomické nestability v epiteliálních tkáních	18

6.1.	Historie a vývoj myších modelů pro studium AID	18
6.2.	Karcinomy trávicího traktu	19
6.2.1.	Žaludeční karcinom po infekci Helicobacter pylori	19
6.2.2.	Žaludeční karcinom spojený s infekcí virem Epstein-Barrové	22
6.2.3.	Kolorektální karcinom	22
6.3.	Hepatocelulární karcinom	22
6.3.1.	Cholangiokarcinom	24
6.4.	Adenokarcinom pankreatu	24
6.5.	Barrettův adenokarcinom	24
6.6.	Karcinomy orálního epitelu	24
6.7.	Karcinomy kůže	25
6.7.1.	Karcinom Merkelových buněk (MCC)	26
6.8.	Karcinom plic	26
6.8.1.	AID jako zdroj získané rezistence	27
6.8.2.	Exprese Ig řetězců nádorovými buňkami	27
6.9.	Karcinom prsu	28
6.10.	Uroteliální karcinom	29
6.11.	Karcinom ovarií	29
6.11.1.	Karcinom ovarií u nositelek mutace BRCA	29
7.	Závěr	31
8.	Seznam použité literatury:	35

1. Úvod

1.1. Rakovina

Rakovina je onemocnění, které vzniká postupnou akumulací změn, způsobených převážně mutacemi v genech, které jsou důležité pro růst a proliferaci buňky. Tyto změny umožňují nádorové buňce přežít v podmínkách, ve kterých by zdravé buňky byly odstraněny a dávají tak nádorovým buňkám selekční výhodu ¹. Mezi hlavní charakteristiky nádorových buněk patří nezávislost na růstových signálech, schopnost vyhnout se tumor-supresorovým signálům a apoptóze, neomezený replikační potenciál, dále pak schopnost invaze a metastáze a schopnost indukovat angiogenezi ^{2,3}.

Dvěma rizikovými faktory tumorigeneze je genomická nestabilita a zánětlivé prostředí. Zánětlivé prostředí je charakteristické přítomností cytokinů, které mohou aktivovat různé signální dráhy a množství imunitních buněk, které se po nádorové transformaci samy stávají součástí nádorového stromatu. Při chronickém zánětu dochází k zánětlivé odpovědi, která je silná natolik, že dojde k poškození tkání, které následně není možné opravit. Prozánětlivé cytokiny a chemokiny jsou v místě zánětu produkovány imunitními buňkami, ale také buňkami epiteliálními, endoteliálními a fibroblasty. Právě tyto látky aktivují signální a transkripční dráhy, které mohou vést až k nádorovému bujení a buňky, které je produkují se stávají součástí nádorového mikroprostředí ^{4,5}.

Genomická nestabilita je charakterizovaná jako zvýšená frekvence změn v genomu buňky v průběhu následných cyklů replikace DNA a dělení buňky během buněčného cyklu. Mezi tyto změny, označované souhrnně jako somatické mutace, patří jednobázové substituce (záměna jedné báze za druhou; konkrétně tranzice, v případě záměny purin za purin, či pyrimidin za pyrimidin, a transverze, když dochází k záměně purinu za pyrimidin a naopak), chromozomální alterace (změny počtů chromozomů, translokace aj.) a takzvané indelové mutace (z anglického „Insertion or deletion“; vložení či odstranění části nukleotidové sekvence) ⁶.

Zdrojem mutací v lidském genomu jsou mutageny. Ty mohou být biologické, chemické, či fyzikální povahy. Zda daná mutace bude mít dopad na stabilitu genomu a následný osud buňky, záleží kromě typu mutace také na genu, který daná mutace postihne. V dubnu minulého roku Bailey et al. identifikovali celkem 299 genů, jejichž mutace vedou k tumorigenezi ⁷. Jedná se hlavně o geny, které se podílejí na proliferaci či regulaci buněčného růstu. Rozlišujeme dvě hlavní skupiny – protoonkogeny a tumor supresorové geny. Onkogeny (geny schopné

indukovat rakovinné bujení) vznikají z protoonkogenů (většinou geny podílející se na regulaci buněčného cyklu), pomocí takzvané „Gain-of-function“ mutace. Tato mutace je dominantního charakteru, proto stačí změna pouze v jedné alele a dojde k aktivaci tohoto genu. Příkladem protoonkogenu je obecný amplifikátor genové exprese *MYC*. Tumor supresorové geny kódují proteiny, které zabraňují buněčné proliferaci, fungují tedy jako „brzdy“ buněčného cyklu a induktory opravných mechanismů DNA. Inaktivace probíhá pomocí takzvané „Loss-of-function“ mutace, která je recesivní, musí tedy dojít k mutaci v obou alelách ⁸. Nejvýznamnějším tumor supresorovým genem, který je mutován u více než 50 % lidských nádorů, je *TP53*. Zajišťuje odpověď na buněčný stres pomocí regulace dalších genů, které zastavují buněčný cyklus, umožňují opravu DNA či apoptózu ⁹.

Frekvence vzniku mutací v lidských somatických buňkách je přibližně $2,8 \times 10^{-7}$ na pár bází, což je výrazně vyšší než mutační frekvence v linii germinální ($1,2 \times 10^{-8}$) ¹⁰. Výsledný počet mutací je daný intenzitou vlastní mutagenese a účinností opravných mechanismů. Geny, které jsou více exprimované jsou opravované s větší účinností, více mutací tedy obsahují geny s nízkou expresí. Více mutací pozorujeme v netranskribovaném vlákne DNA. Části chromozomů replikované na začátku replikace obsahují zpravidla méně mutací než části replikované později. Velký vliv na rozložení mutací má také struktura chromatinu – více mutací pozorujeme ve většině případů v oblasti nukleozómů než linker sekvencí. Navázání vazebných proteinů (např. transkripčních faktorů), vede ke změně konformace DNA, což umožňuje větší přístup mutagenům. Stejně tak jsou přístupnější i jednovláknové úseky DNA v takzvaných R-loops, které vznikají při transkripci ¹¹.

Množství mutací daného nádoru označujeme jako mutační nálož (TMB; z anglického „Tumour mutational burden“). Ta označuje celkový počet somatických mutací v kódující oblasti genomu, které jsou spojované s možným vznikem neoantigenů, které mohou být vhodnými cíli pro adaptivní protinádorovou imunitu ¹².

Každý nádor je produktem klonální expanze a má unikátní kombinaci genetických změn. Během vývoje a selekce pod vlivem léčby se nádor neustále mění, a proto obecná léčba, testovaná v randomizovaných klinických studiích, ve velkém procentu případů selhává ¹³. Vhodným přístupem do budoucna se zdá být personalizovaná medicína, která je schopná zachytit individuální charakter nádoru u každého pacienta. Právě proto je výzkum v posledních desetiletích zaměřený na genetické, buněčné i tkáňové mechanismy, pomocí kterých se zdravá buňka mění v buňku nádorovou ¹⁴.

Kromě dobře prozkoumaných exogenních zdrojů mutací, jako je například UV záření či mutageny tabákového kouře, mohou být zdrojem mutací i enzymy, které hrají v buňce

fyziologickou roli, pomocí jimi kontrolované mutageneze. Jedná se hlavně o deaminační enzymy rodin APOBEC a ADAR. Pokud kontrola jejich působení ale není dostatečná, může dojít k mutagenezi mimo cílové geny daného enzymu. To následně zvyšuje genomickou nestabilitu buňky na všech úrovních DNA. Tyto mutageny po sobě v DNA zanechávají stopu, kterou označujeme jako mutační podpis. Ten označuje charakteristické mutace pro daný mutagen v kontextu sekvence DNA ¹⁵.

1.2. Deaminační enzymy

ADAR (z anglického „Adenosine deaminase acting on RNA“) je rodina 3 enzymů. Deaminací adenosinu na mRNA vytvářejí tranzici A>I. Inosin je báze strukturně podobná guaninu, do řetězce je tedy komplementárně doplněn cytosin. Editace RNA pomocí ADAR enzymů se podílí na protivirové obraně. Jednotlivé enzymy jsou shrnuté v [tabulce 1](#):

Tabulka 1 – ADAR rodina deamináz ¹⁶

Enzym	Místo účinku	Funkce
ADAR1	Většina tkání	RNA editace
ADAR2	Většina tkání	RNA editace
ADAR3	Mozek	Pravděpodobně není katalyticky aktivní

APOBEC (z anglického „Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic, polypeptide-like“) je rodina 11 evolučně konzervovaných deaminačních enzymů. Deaminací cytosinu na mRNA vytvářejí tranzici C>U. Jedinou výjimkou je AID, která deaminaci vykonává na úrovni DNA. Jejich funkce jsou různorodé, shrnuté v [tabulce 2](#):

Tabulka 2 – APOBEC rodina deamináz ¹⁷

Enzym	Místo účinku	Funkce
APOBEC1	Tenké střevo	Deaminace <i>ApoB</i>
APOBEC2	Kosterní a srdeční svalovina	Neznámá
APOBEC3A/ B/C/D/F/G/H	Většina tkání	Ochrana proti retrovirům a retrotranspozonům
APOBEC4	Varlata	Pravděpodobně ztratil schopnost deaminace
AID	B buňky	Somatická hypermutace a izotypový přesmyk protilátek

Deregulace RNA editace také pravděpodobně hraje roli v iniciaci tumorigeneze. ADAR 1 a 2 vykazují množství pro-tumorigenních i anti-tumorigenních schopností, a to v hepatocelulárním karcinomu, karcinomu jícnu, kolorektálním karcinomu, karcinomu prsu, karcinomu prostaty, melanomech a gliomech. Protumorigenní schopnosti zahrnují především editaci tumorsupresorových genů a protoonkogenů, která má za důsledek iniciaci rakovinného bujení. Mezi antitumorigenní schopnosti patří editace miRNA sekvencí, která vede ke zvýšení jejich specifity a účinnosti v potlačení nádoru¹⁸. Z APOBEC enzymů má největší tumorigenní potenciál APOBEC3B. Zvýšená exprese je převážně spojovaná s onkogenní transformací prsu, ovarií a plic. APOBEC3G pomocí regulace miRNA umožňuje vznik hepatických metastáz v případech kolorektálního karcinomu¹⁹.

Možným terapeutickým využitím deaminačních enzymů je cílená editace genomu. Deaminační doména těchto enzymů se spojí s Cas proteinem, který je v současné době využíván ve formě CRISPR/Cas9 metody, a naváděcí guide RNA. To umožní cílenou editaci místa v genomu, které je spojované s konkrétní chorobou. Vývoj této metody je ale ještě v počátcích a bude potřeba zajistit, aby nedocházelo k mutagenезi mimo cílové místo¹⁸.

Právě z důvodu velké pozornosti, která je v současné imunoterapii a nádorové biologii obecně věnována APOBEC enzymům, jsem se rozhodla svou práci zaměřit na jednoho z členů této rodiny, a to konkrétně aktivací-indukovanou deaminázu (AID; z anglického „Activation-induced deaminase“). Jedním z hlavních cílů AID je *Ig* lokus, kde způsobuje nestabilitu DNA vytvářením jednobodových mutací DNA. Tyto mutace jsou součástí procesů somatické hypermutace (SHM; z anglického „Somatic hypermutation“), izotypového přesmyku (CSR; z anglického „Class switch recombination“) a alternativně i genové konverze u některých obratlovců. Tyto procesy vedou ke vzniku protilátek konkrétního izotypu s vysokou afinitou. V důsledku tak lépe chrání naše tělo proti stále se měnícím patogenům²⁰. Jelikož AID je zdrojem mutací, musí být její funkce dostatečně regulovaná. V opačných případech může být AID zdrojem genomické nestability, která je právě zdrojem tumorigenního potenciálu.

Role AID v tumorigenezi byla zkoumaná převážně v B buněčných nádorech, menší pozornost je věnována expresi AID v karcinomech (nádory, které pocházejí z epitelu). Rozvoj této problematiky nastal roku 2003, kdy Okazaki et al. ukázali, že u transgenních myší s konstitutivní expresí AID dochází k vývoji lymfomů, ale také mikroadenomů plic²¹. Tato studie odstartovala řadu experimentů ať již na myších modelech, nádorových buněčných liniích nebo na patientských vzorcích, které se postupně snažily rozklíčovat význam zvýšené exprese AID u karcinomů a jiných pevných nádorů. Společným znakem těchto nádorů je, že v nedávné době prošla tkáň zánětem, nejčastěji způsobeným nějakým chronickým onemocněním v daném

místě. Právě AID bývá tedy mnohými označovaná za „spojku“ mezi zánětem a následným nádorovým bujením ²².

Cílem této práce je představit problematiku deaminačních enzymů jako zdrojů genomické nestability, a to hlavně v zaměření na expresi a funkci AID v neimunitních tkáních, nalezení spojitosti exprese AID s předchozím zánětem a následným vznikem karcinomů. Aktivita AID, mutační frekvence a klinicko-patologický stav pacientů bude porovnáván mezi jednotlivými druhy nádorů, které vznikly z pevných tkání. Otázka, zda je pro moderní léčbu nádorů vhodnější, když nádor obsahuje méně nebo více mutací, bude kriticky posouzená.

2. Aktivací-indukovaná deamináza (AID)

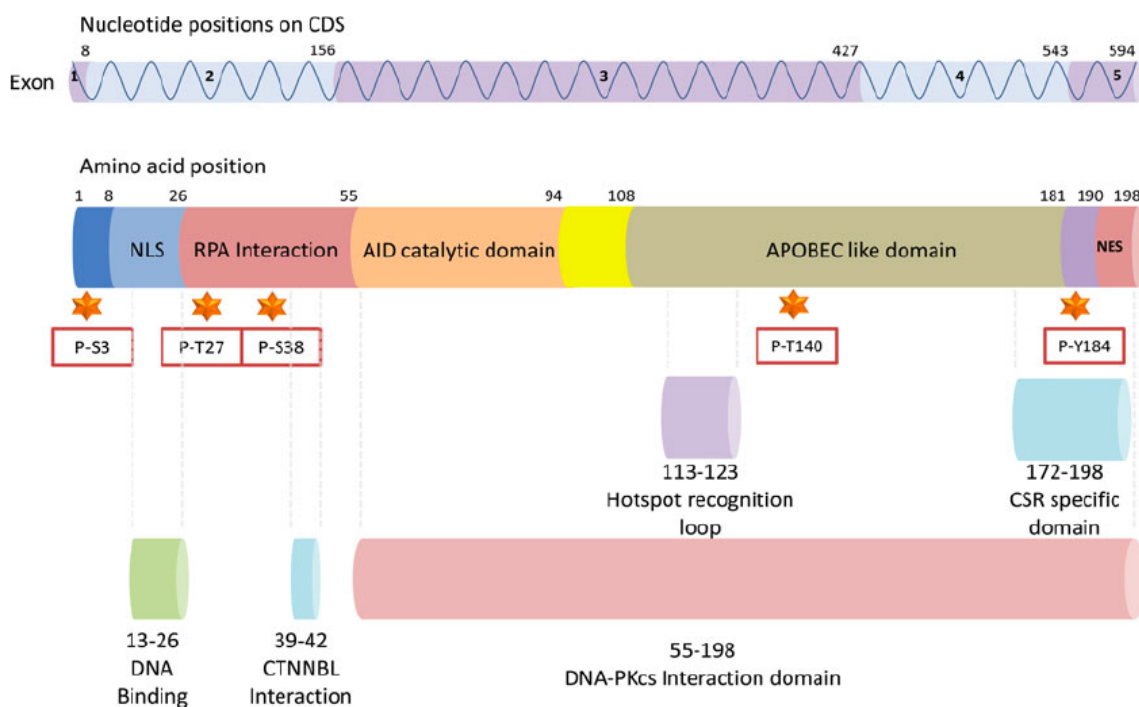
2.1. Objev AID

Aktivací-indukovaná (cytidin) deamináza, je enzym, který v roce 1999 identifikovali Tasuku Honjo et al. Stimulovali B-lymfomové buňky linie CH12F3-2 pomocí IL4, TGFB1 a CD40L, což v B buňkách vyvolalo přesmyk z nízkoafinního IgM, tedy protilátky, která je produkována v prvních fázích imunitní odpovědi, na vysokoafinní a slizničně specifické IgA. Z těchto buněk potom vyizolovali cDNA, kterou identifikovali jako strukturní homolog deaminačního enzymu APOBEC1. Potvrdili, že gen *AICDA* je specificky exprimovaný v B buňkách germinálních center, které se nachází v sekundárních lymfoidních orgánech, slezině a mízních uzlinách, a podílí se na iniciaci CSR, která je indukovaná setkáním s antigenem ²³. O rok později byla role AID v CSR potvrzená a zároveň byla AID identifikovaná jako zdroj mutací během afinitní maturace protilátek, v SHM, během sekundární imunitní odpovědi ²⁴.

2.2. Struktura a funkce

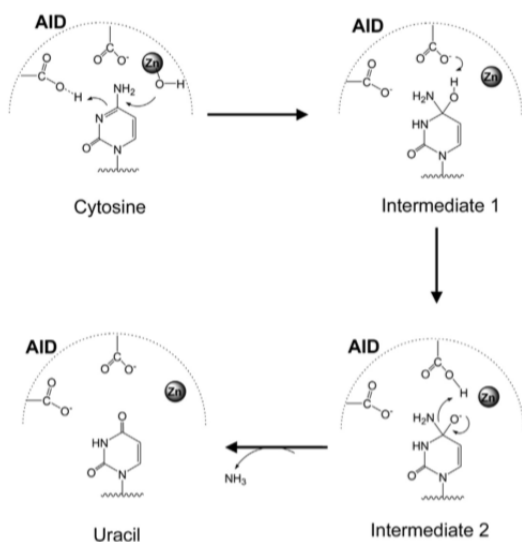
Gen *AICDA* se nachází na krátkém raménku chromosomu 12. Protein AID se skládá z 198 aminokyselin, 24 kDa a je tvořen 4 konzervovanými doménami (Obr. 1). Tyto domény jsou (z N konce): jaderný lokalizační signál (NLS, „Nuclear localization signal“), katalytická doména (CD motiv), linker, APOBEC-like-doména a jaderný exportní signál (NES, „Nuclear export signal“) ²⁰.

N doména funguje analogicky při štěpení jak variabilních domén *Ig* řetězců při SHM, tak přesmykových sekvencí konstantních domén *Ig* při CSR. C doména indukuje rekombinaci pomocí jednořetězcových zlomů, které jsou později procesované na dvouřetězcové zlomy při CSR ^{25,26}.



Obrázek 1 – Organizace exonů a strukturních domén AID s uvedením AA zbytků a klíčových fosforylačních míst (označené v červeném rámečku) ²⁰

Aktivní místo katalytické domény se nachází na N-konci dvou opačně orientovaných alfa helixů. Skládá se ze dvou cysteinů a histidinu, které koordinují zinečnatý iont (Obr. 2). Čtvrtým koordinačním partnerem je molekula vody, která při deaminační reakci vystupuje jako donor OH^- skupiny. Jako donor protonu zde vystupuje glutamová kyselina. Kolem aktivního místa se nachází kladně nabitě AK, které interagují se záporně nabitou DNA a aromatické AK, které stabilizují komplex pomocí „stacking“ interakcí. APOBEC-like doména zajišťuje specifitu substrátu vazbou na sekvenci DNA obklopující cílený cytosin ^{27,28}.



Obrázek 2 – Schéma deaminace $\text{C} > \text{U}$ ²⁹.

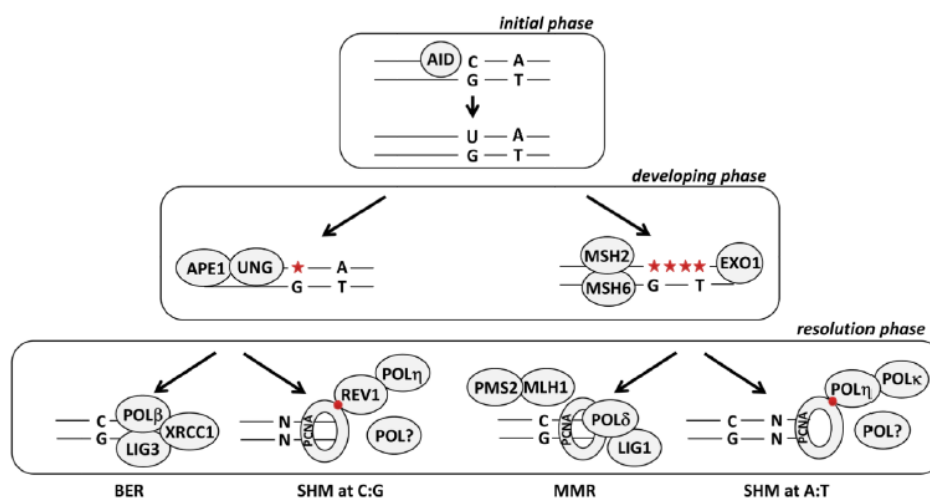
Deaminace cytosinu probíhá jako nukleofilní substituce, OH^- skupina koordinované vody napadá aminoskupinu na C4 cytosinu, aminoskupina potom spolu s protonem odstupuje z reakce jako amonium a z cytosinu vzniká uracil. V sekvenci tedy dojde ke změně původního páru $\text{C}:\text{G}$ na nekomplementární pár $\text{U}:\text{G}$ ^{28,29}.

2.3. Oprava mutovaných nekomplementárních bází

Oprava mutovaných bází probíhá pomocí BER (z anglického „Base excision repair“) či MMR (z anglického „Mismatch repair“) procesů. Může se ovšem stát, že replikace proběhne ještě před nástupem opravných systémů. Pak je do řetězce komplementárně vložený adenin, což vede k finální tranzici původního páru G:C na A:T a k dokončení mutagenese.

V případě opravy pomocí BER (Obr. 3, levá část) dojde k rozeznání daného místa pomocí specifické DNA glykosylázy (UNG, uracil-DNA-glykosyláza) ještě před replikací. Špatně zařazená báze je pak vystřižena za vzniku abazického místa. Toto místo je rozeznáno AP endonukleázou, která vytvoří jednořetězcové přerušení, to je poté doplněno DNA polymerázou β ^{30,31}.

Při MMR (Obr. 3, pravá část) je nekomplementární místo rozeznáno proteinovým komplexem MSH2-MSH6. V tomto případě je jednořetězcové přerušení vytvořeno komplexem MLH1 a PMS2. Exonukleáza-1 vystřihne úsek DNA kolem vzniklého přerušení a tento úsek poté doplní DNA polymeráza δ , která je stabilizovaná PCNA sponkou ^{32–34}.



Obrázek 3 – Možnosti opravy mutovaných bází ³⁵

I přes tyto účinné opravné mechanismy ale v imunoglobulinovém lokusu pozorujeme mutační frekvenci kolem 10^{-3} ³⁶. Ig lokus je místo vystavované cílené mutagenese, která probíhá v takové míře, že klasické reparační mechanismy nestíhají opravovat všechny chyby. A tedy i přesto, že pozorujeme nadmíru mutací, tak stále pozorujeme pouze zlomek původní mutační nálože. Míru mutagenese ještě zvyšuje použití takzvané „error prone“ opravy. Při té se využívají slabě procesivní (translézní) DNA polymerázy, které opravují chyby s nízkou účinností. V případě BER je to REV1, v případě MMR je to pak polymeráza η (POLH) ^{37,38}.

Po deaminaci 5m-C dojde k tranzici na thymin. V případě, že je tato tranzice je rozpoznána a opravená, je do vlákna DNA zařazen cytosin a dojde tak k demethylaci. Tato reakce ale probíhá s mnohem menší pravděpodobností než deaminace klasického cytosinu, vzhledem k sterickému bránění aktivního místa methylovou skupinou. Právě tímto mechanismem se AID pravděpodobně podílí na epigenetickém reprogramování buněk^{39–41}. Vzhledem k rozsáhlosti tématu a množství rozporupných a nejasných výsledků, se tomuto tématu v této práci nebudu dále věnovat.

2.4. Indukce exprese AID

AID je expresí indukovaný enzym. Indukce probíhá pomocí CD154 (CD40L), agregací receptorů IgM, CD19 a CD21, případně propojením signalizace BCR a TLR^{23,42,118}. Pro tuto práci je ale nejzásadnější indukce AID pomocí prozánětlivých cytokinů TNF a IL1, v případě patologických stavů, kterým se budu věnovat dále v této práci, také cytokinu TGFB1 a EGF^{23,44,80,93,107}. Ty se váží na své povrchové receptory a tím aktivují signalizační dráhu NF- κ B⁴⁴.

NF- κ B je rodina pěti transkripčních faktorů (TF): NF κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RELA (p65), RELB, REL (c-Rel). Aktivace této dráhy probíhá kanonickým a nekanonickým způsobem. Kanonickou dráhu tvoří IKK (I κ B) kinázový komplex, který se skládá ze tří částí – CHUK (IKK α), IKBKB (IKK β) a IKBKG (IKK γ , NEMO). Tento komplex pomocí fosforylace inhibuje I κ B α , inhibiční komplex, který udržuje NF- κ B v inaktivovaném stavu v cytoplazmě. Inhibice probíhá pomocí ubikvitinylatione, která vede k degradaci inhibičního komplexu I κ B v proteazomu a uvolněný NF- κ B následně putuje do jádra ve formě dimerů p50/p65 nebo p50/c-Rel^{43,44}.

Při aktivaci pomocí nekanonické dráhy dochází k fosforylaci a následné ubikvitinylaci proteinu p100 (prekurzoru p52) pomocí NF- κ B indukující kinázy (NIK). To vede k degradaci C-konce p100 za vzniku p52. p52 pak ve formě heterodimerů s RelB translokuje do jádra⁴⁴.

V případě kanonické i nekanonické dráhy se heterodimery v jádře váží do regulačního regionu I v promotorové oblasti *AICDA* lokusu. Právě aktivace dráhy NF- κ B pomocí prozánětlivých cytokinů je tedy spojkou mezi zvýšenou expresí AID při zánětu a předpokládané následné roli v genomické nestabilitě, která podporuje tumorigenezi a vývoj nádoru^{22,43,80,93}.

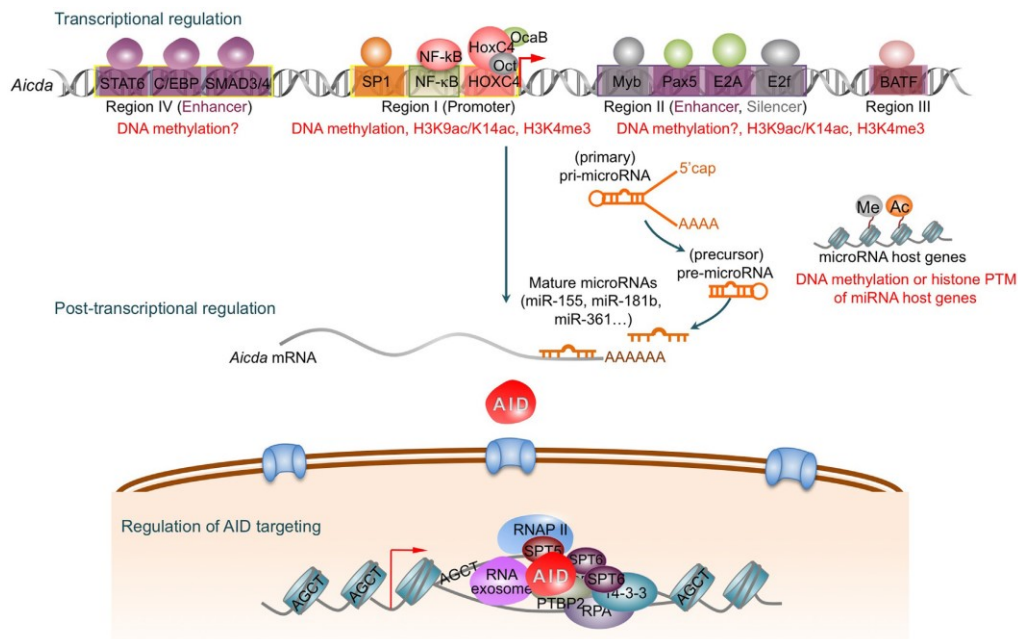
2.5. Regulace AID

2.5.1. Regulace na úrovni transkripce

Lokus genu *AICDA* obsahuje 4 regulační domény (Obr. 4). Tyto domény jsou tvořené vazebnými místy pro více než 19 transkripčních faktorů (TF). Region I slouží jako promotor a vážou se do něj tyto TF: NF-κB, HOXC4, SP1 a SP3⁴⁵. Umlčení a aktivace transkripce probíhá pomocí regionů II a IV, které obsahují dohromady 5 enhancerů a 2 silencery. Aby došlo k vyřazení silencerů, je třeba aktivace enhancerů obou regionů⁴⁶.

2.5.2. Post-transkripční regulace

Na post-transkripční úrovni probíhá regulace AID pomocí microRNA, konkrétně miR-155, a miR-93. Tyto molekuly se komplementárně vážou do 3' nepřekládané oblasti, čímž dochází k umlčení cílové mRNA⁴⁷.



Obrázek 4 – Regulace exprese AID na transkripční a post-transkripční úrovni⁴⁸

2.5.3. Post-translační regulace

I přesto, že AID vykonává svou enzymatickou činnost v jádře, 90 % AID se v buňce nachází v cytoplazmě, kde má také větší stabilitu než jaderná AID, která je neustále ubkvitinylována a degradována v proteozomu⁴⁹. AID udržuje v jádře v nízkých koncentracích také systém proteinů, které zprostředkovávají takzvaný „Nucleocytoplasmic shuttling“, tedy zprostředkovaný přenos mezi jádrem a cytoplazmou⁵⁰.

AID je protein o velikosti 24 kDa, tudíž by měl jadernými póry procházet difúzí. Ve skutečnosti ale k přenosu potřebuje konkrétní přenašeče a již zmíněné lokalizační sekvence na

5' a 3' konci. Jaderný exportní signál je rozpoznán exportinem CRM1, který po navázání přenáší AID z jádra do cytoplazmy⁵¹.

V cytoplasmě se AID nachází ve dvou komplexech. Jako nematurovaná se AID váže na HSP90⁵². Po maturaci se váže na eEF1A, který zabraňuje vstupu do jádra („AID retention“)⁵³.

Poslední významnou regulací je fosforylace enzymu, která probíhá na Thr27, Ser38 nebo Tyr184 pomocí proteinkinázy A (Obr. 1). Fosforylace Ser38 vede k navázání AID na replikační protein A. To umožňuje silnější vazbu komplexu na DNA a zvýšenou účinnost mutagenese. Inhibicí této fosforylace dochází ke snížení účinnosti SHM a CSR⁵⁴.

3. Role AID v imunitních tkáních

Protilátková odpověď je jednou ze základních funkcí adaptivní imunity. Protilátky jsou schopné neutralizovat patogeny a podporovat další efektorové funkce imunitní odpovědi. Proto jsou důležité jak pro obranu organismu proti patogenům, tak proti nádorům. Kvůli množství patogenů, kteří jsou schopni odolávat tlaku imunitního systému a rychle mutovat a vyvíjet nové únikové varianty, je třeba, aby se tak choval i imunitní systém a byl schopný neustále generovat adekvátní množství specifických a funkčních protilátek. Právě na tom se podílí AID.

AID je enzym fyziologicky se vyskytující v imunitních tkáních, přesněji v B buňkách zárodečných (germinálních) center. Tato centra vznikají v sekundárních folikulech lymfatických uzlin po opakovaném setkání s antigenem během sekundární imunitní odpovědi. AID hraje významnou roli ve dvou reakcích, které vedou ke vzniku vysoko afinních antigen-specifických protilátek konkrétního funkčního izotypu, a to v CSR a SHM. Dále se podílí na genové konverzi, která u některých obratlovců nahrazuje proces VDJ rekombinace (Obr. 5).

3.1. Somatická hypermutace (SHM)

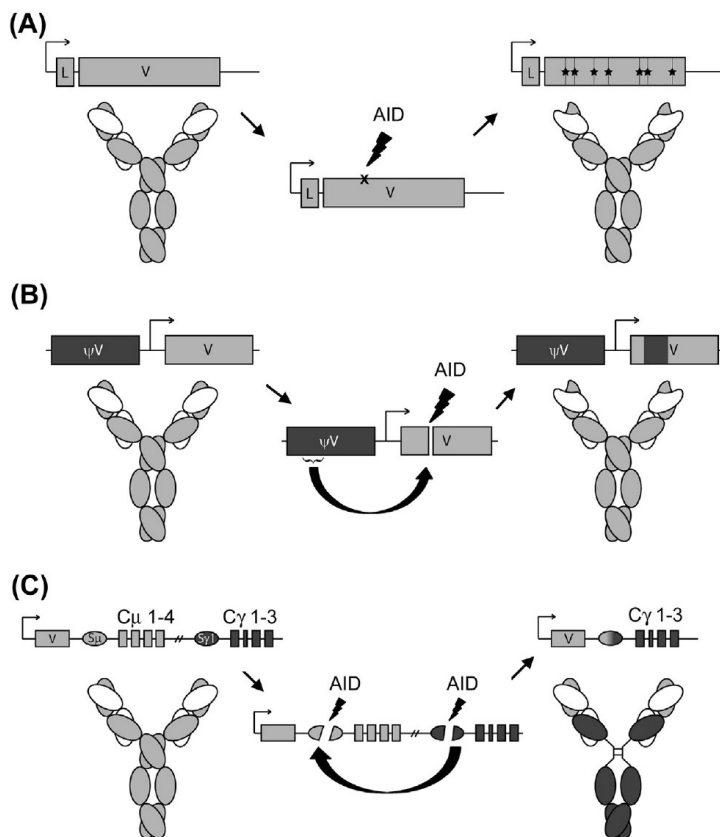
Během procesu SHM vytváří AID jednobodové mutace ve variabilních doménách imunoglobulinových řetězců, konkrétně v CDR („Complementarity determining region“) smyčkách, které rozeznávají antigen (Obr. 5a). Tím dochází ke změně vazebných vlastností protilátky vůči danému antigenu. Při tomto procesu mohou vznikat protilátky s vyšší, či nižší afinitou, může dojít ke změně specifity směrem k jinému antigenu, úplné ztrátě vazby, případně nemusí dojít k žádné změně. Až v dalším kroku dochází ke klonální expanzi a selekci B buněk v germinálních centrech. B buňky se zvýšenou afinitou k antigenu jsou pozitivně selektované a celý proces se může opakovat. Výsledkem afinitní maturace jsou protilátky s mnohonásobně vyšší afinitou k antigenu než mají protilátky produkované při primární odpovědi⁵⁵.

3.2. Genová konverze

Genová konverze nahrazuje VDJ rekombinaci u některých obratlovců. Jejich imunoglobulinové geny obsahují kromě V regionů i pseudo V regiony, které jsou použité templátovým způsobem. Po indukci dvouřetězcových zlomů pomocí AID dochází k vložení sekvence pseudo V regionu do V regionu a tím k primární diverzifikaci Ig repertoáru (Obr. 5b) ⁵⁶.

3.3. Izotypový přesmyk protilátek (CSR)

Při CSR, dochází ke změně izotypu protilátky. Probíhá až ve zralých B buňkách, kdy dochází ke dvouřetězcovým zlomům v přesmykových sekvencích těžkých Ig řetězců (IgH). Gen pro IgH se nachází na 14. chromozomu a skládá se z konstantních (C) exonů, které kódují jednotlivé třídy protilátek a přesmykových (S) sekvencí, které předcházejí každému C exonu a jsou tvořené repetitivními sekvencemi. Vždy dochází k rekombinaci mezi prvním S segmentem a S segmentem předcházejícím C segmentu, který kóduje izotyp cílové protilátky. Tento proces podléhá epigenetické regulaci podle přítomného cytokinového prostředí (Obr. 5c) ⁵⁷.



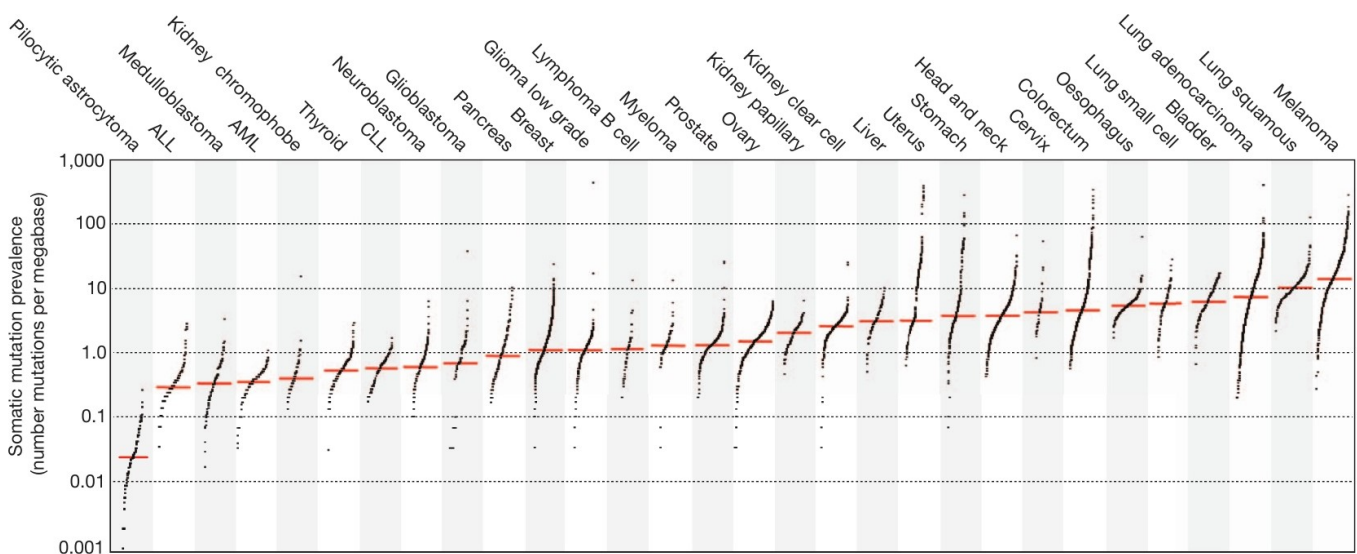
Obrázek 5 – Procesy odehrávající se v Ig lokusu, katalyzované AID:
A) somatická hypermutace,
B) genová konverze
C) izotypový přesmyk ²⁹

4. Vliv mutací na tumorigenezi

4.1. Mutační nálož nádoru (TMB)

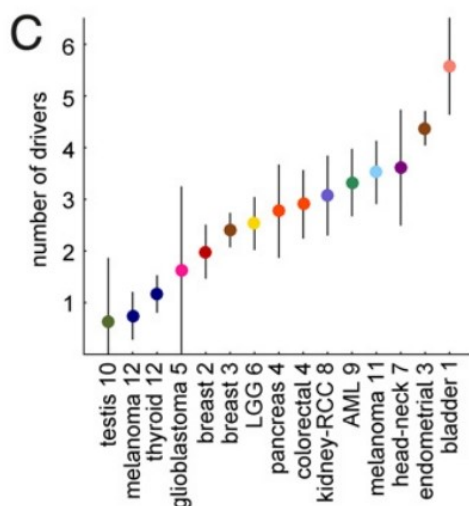
Mutační nálož nádoru označuje kumulované množství mutací v nádorové buňce, které můžou vést k produkci neoantigenů. Určuje se pomocí sekvenování celého exomu dané buňky, případně panelů jednotlivých genů, které jsou s tumorigenezí často spojované. Jednotlivé druhy nádorů (jak mezi tkáněmi, tak mezi jednotlivci) se radikálně liší frekvencí jednotlivých typů mutací, a právě toho můžeme v budoucnu využít při imunoterapii ¹².

Mezi nádory s největší mutační náloží patří nádory často proliferujících tkání, ve kterých zároveň pozorujeme působení konkrétních mutagenů. V případě melanomů jde o UV záření, u plicních nádorů pak o mutageny tabákového kouře. Tyto nádory mohou dosahovat až 100 mutací na megabázi, zatímco na opačném konci grafu (Obr. 6) se nachází pediatrické nádory. Ty vykazují frekvenci mutací kolem 0,1 mutace na megabázi ^{12,15,58}. Malé množství mutací zde pozorujeme, protože u mladších pacientů prošly buňky v postižené tkáni menším počtem dělení. Tyto nemoci navíc vznikají z tkání, které se neobnovují, a proto veškeré mutace v nich většinou vznikly ještě před vznikem řídicí mutace ⁵⁹.



Obrázek 6 – Počet somatických mutací v jednotlivých nádorech. Tečky představují jednotlivé vzorky, červené čáry medián počtu mutací v nádorech daného typu (ALL – Akutní lymfoblastická leukémie, AML – Akutní myeloidní leukémie, CLL – Chronická lymfocytární leukémie) ¹⁵.

TMB zohledňuje kromě množství mutací i jejich charakter, například rozdělení na takzvané řídicí a vezoucí se mutace. Jen malé procento mutací přináší nádorové buňce selekční výhody. Právě ty se vyskytují v nádorech s vyšší frekvencí a označují se jako řídicí mutace (z anglického „Driver mutation“). Patří mezi ně například mutace v genech *KRAS*, *EGFR*, či *TP53*. Ostatní mutace poté označujeme jako vezoucí se mutace (z anglického „Passenger mutation“). Ty většinou vznikají před samotnou onkogenní transformací a nemají žádný pozorovatelný efekt. Iranzo et al. analyzovali data z téměř 8000 vzorků nádorů 30 různých druhů, které rozřadili do 12 modulů, podle podobnosti mutačního spektra. Dokázali, že průměrný počet řídicích mutací napříč různými druhy nádorů je 1,96. Počet řídicích mutací se ale liší mezi nádory. Například pouze jednu řídicí mutaci obsahují nádory varlat a melanomy, ale více než pět řídicích mutací pozorujeme v nádorech močového měchýře (Obr. 7) ⁶⁰.

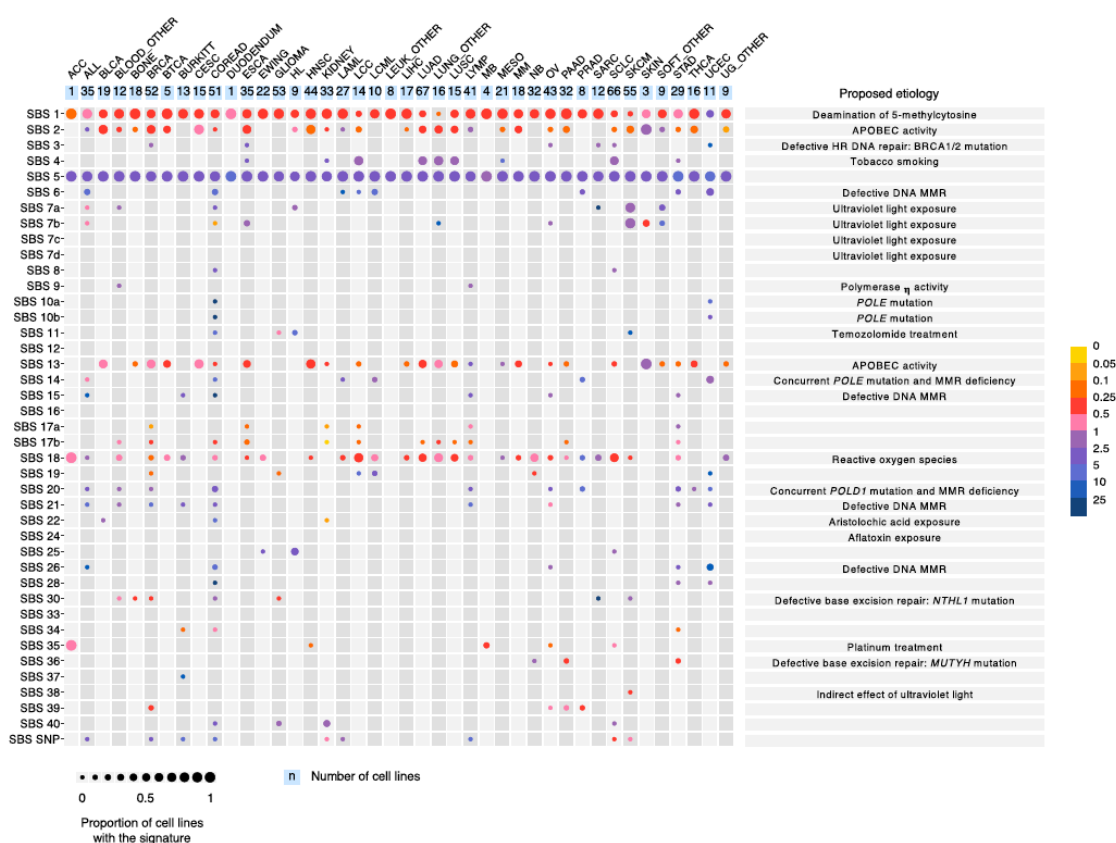


Obrázek 7 - Počet řídicích mutací v nádorech různého typu, v grafu je vždy jeden zástupce daného modulu (označeno číslem vedle názvu nádoru) ⁶⁰.

TMB se dnes využívá jako biomarker pro vhodnost imunoterapie zablokováním inhibičních kontrolních bodů (ICB; z anglického „Immune checkpoint blockade“). K aktivaci T buněk se využívají neoantigeny, které vznikají pomocí nesynonymních mutací z původní tkáně. Jedná se o mutantní peptidy, které zdravé buňky neexprimují. Právě v případě melanomů a adenokarcinomů plic, jakožto nádorů s nejvyšší mutační náloží, je TMB vhodným biomarkerem. Nádory s vyšším TMB mají vyšší pravděpodobnost vzniku neoantigenů a jsou tedy vhodné pro terapii ICB, protože mají vyšší pravděpodobnost rozpoznání specifickým T-buněčným klonem ^{61,62}. Je tomu tak například u adenokarcinomu plic s vysokou expresí APOBEC3, ta koreluje s expresí CD274 (PD-L1) a infiltrací imunitních buněk. Právě nadměrná exprese APOBEC enzymů by mohla do budoucna být dalším z biomarkerů pro zvýšení účinnosti imunoterapie v klinické praxi ⁶³.

4.2. Mutační podpisy

Mutační podpis označuje charakteristické mutace pro jednotlivé mutageny. Zahrnuje v sobě informaci o typu mutace (substituce, indelové mutace, chromozomální aberace), sekvenční kontext a další informace, jako například preferenci (ne)transkribovaného vlákna. Do dnešního dne známe více než 40 mutačních podpisů (Obr. 8), nejvýznamnějšími mezi nimi jsou mutační podpisy stárnutí, UV záření, kouření, mutací *BRC1/2*, defektních systémů zodpovídající za opravu DNA a deaminačních enzymů APOBEC^{15,64}.



Obrázek 8 – Mutační podpisy pozorované v 1001 vzorcích nádorových buněčných linií. Mutační podpisy jsou uspořádané v řádcích, nádorové vzorky ve sloupcích. Označení nádorových linií jsou k nalezení zde, pod záložkou 1,001 COSMIC Cell lines⁶⁴.

4.2.1. Mutační podpis APOBEC

APOBEC enzymům jsou přiřazované dva mutační podpisy (SBS; z anglického „Single base substitution signatures“) – SBS 2 a SBS 13. Oba podpisy vznikají deaminací cytosinu v trinukleotidu TCN. SBS2 je tranzice C>T, která vzniká replikací deaminovaného cytosinu bez opravy. SBS13 je transverze C>G nebo C>A. Ta je výsledkem takzvané „error prone“ opravy s využitím translézních polymeráz⁶⁴.

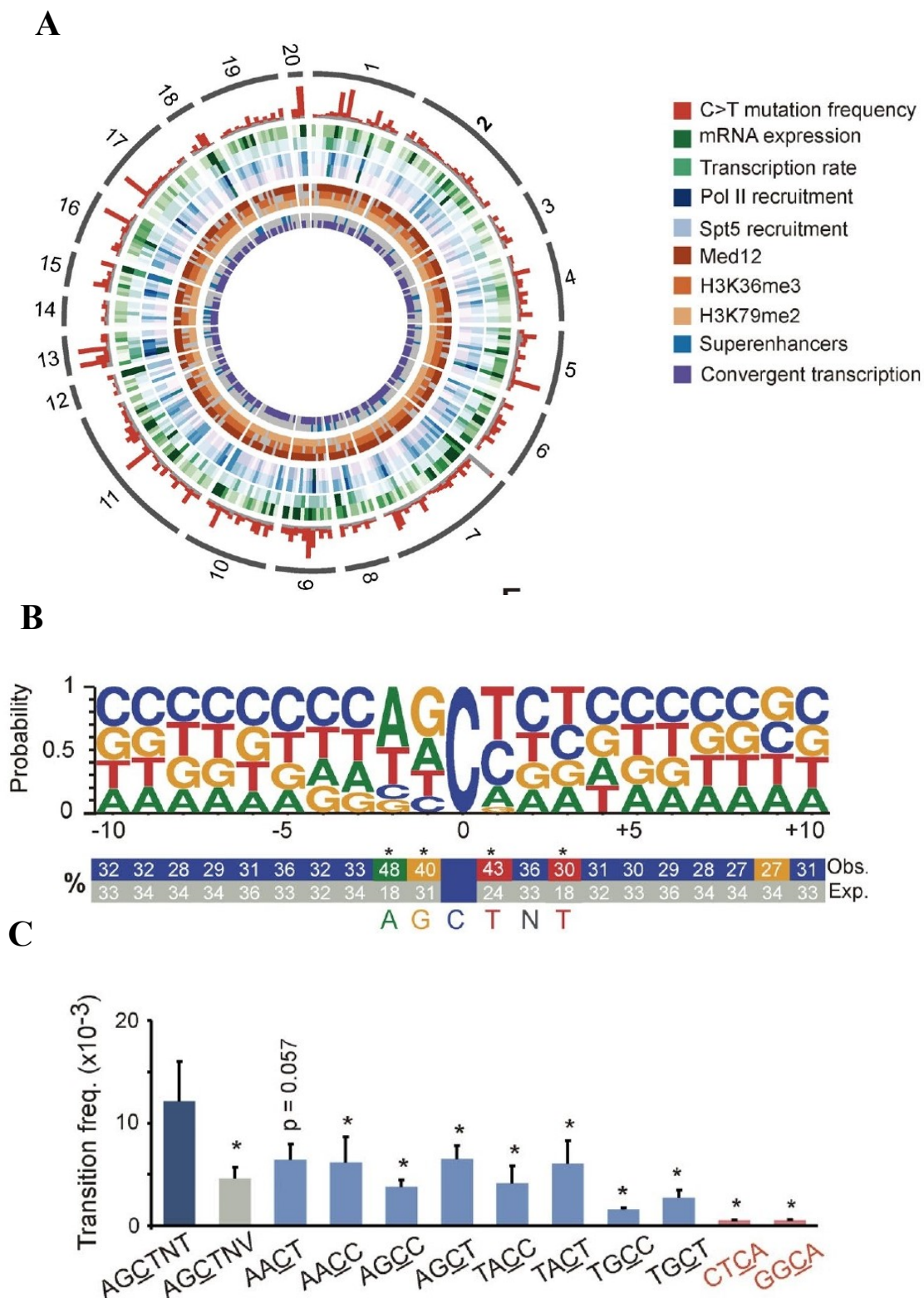
Alexandrov et al. v rozsáhlé studii skoro 5 milionů mutací ve více než 7000 případech nádorů identifikovali podpis APOBEC v 16 ze 30 druhů pozorovaných nádorů¹⁵. Petljak et al. tento častý výskyt APOBEC podpisů potvrdili sekvenováním exomu 1001 nádorových buněčných linií (Obr. 8). Zároveň pozorovali rozdíl v mutační náloži APOBEC podpisů v nádorové buněčné linii BC-1 (B-buněčný lymfom). Rozdíl mezi klony odvozenými z původního klonu byl po 20 dnech kultivace více než stonásobný. Na základě tohoto pozorování označili APOBEC enzymy za zdroj „epizodické mutagenese“, kdy probíhá mutagenese v krátkých, ale intenzivních periodách, následovaných delšími periodami bez mutagenese⁶⁴.

Shlukování mutací do menších sekvencí označujeme řeckým slovem *kataegis*, překládaného jako bouře. U APOBEC enzymů označuje *kataegis* zvýšené množství mutací v TC dinukleotidech situovaných ve vzájemné blízkosti. Mutace vznikají preferenčně v opožděujícím se DNA vláknu, konkrétně dvakrát častěji než ve vláknu vedoucím^{15,65}.

4.2.2. Mutační podpis AID

Hotspotem SHM a zároveň AID je nukleotidová sekvence WRC/GYW (kde W= A nebo T, R= A nebo G, Y= C nebo T)⁶⁶. Stejně jako u ostatních APOBEC enzymů, dochází po deaminaci cytosinu bez nástupu opravných mechanismů k tranzicím C>T a G>A. Po působení opravných mechanismů ale může v řetězci dojít k záměně za libovolnou bázi.

Álvarez-Prado et al. proto studovali mutační podpis AID na myších modelech *Ung^{-/-}Msh2^{-/-}*, u kterých nedochází k opravám mutovaných bází. Sekvenováním více než 1500 genomických regionů potvrdili preferovaný motiv WRCY/RGYW. Nejvyšší počet mutací pozorovali v sekvencích AACT a AGCT. Podle jejich výsledků hrají významnou roli i následující nukleotidové pozice, hlavně, pokud se na třetím místě za deaminovaným cytosinem nachází thymin. Nejvyšší počet mutací obsahuje sekvence AGCTNT (Obr. 9). Touto studií také identifikovali 275 genů, které jsou cílem AID podmíněné mutagenese. Mutace jsou častější v genech, které jsou intenzivněji transkribované, v oblastech (super)enhancerů a v oblastech, kde dochází ke konvergentní transkripci, jak již v minulosti pozorovali Meng et al.^{67,68}



Obrázek 9 – A. Nově identifikované cílové geny AID podmíněné mutagenese, které jsou uspořádané v kruhu. Vnější modré kolo značí chromozomální lokalizaci, červený kruh frekvenci mutací C>T. Vnitřní kruhy označují roli dalších faktorů, viz legenda vpravo. B. Logo preferenčních sekvenčních motivů kolem deaminovaného cytosinu C. Frekvence tranzice cytosinu v dané sekvenci ⁶⁸.

5. AID jako zdroj genomické nestability v imunitních tkáních

Pokud dojde ke vzniku dvouřetězcových zlomů na dvou chromozomech, které jsou vzájemně homologní a dostatečně blízko u sebe, může dojít ke spojení těchto dvou chromozomů, které označujeme jako translokace. Jelikož AID produkuje během CSR dvouřetězcové zlomy v *Ig* lokusech, může její nedostatečná regulace vést ke vzniku translokací, které mají tumorigenní potenciál. Vzhledem k tomu, že tato oblast není primárním cílem této práce, představím tuto problematiku pouze stručně, na nejlépe prozkoumaných případech.

5.1. Lymfomy

V případě B-buněčných lymfomů probíhá translokace do *Ig* lokusu, nejčastěji *IGH*, *IGK* a *IGL*. Nejznámějším a nejvíce prozkoumaným příkladem je Burkittův lymfom, kdy dochází k translokaci protoonkogenu *MYC* z chromozomu 8 do *Ig* lokusu na chromozomu 14, což vede k silné expresi tohoto protoonkogenu pod *Ig* promotorem. Robbiani et al. dokázali, že AID je schopná indukovat zlomy v obou postižených lokusech ⁶⁹.

V případech difúzního velkobuněčného B lymfomu zvyšuje AID genomickou nestabilitu buněk. Zvýšená mutageneze postihuje geny *PIMI*, *MYC*, *RHOH*, *PAX5* a *BCL6*. Více než 50 % klinických vzorků vykazuje mutace minimálně dvou z těchto genů. Zároveň jsou to geny, které v Non-Hodgkinských typech lymfomů podléhají translokacím. Konkrétní genomické pozice mutací odpovídají místům zlomů při translokacích, což podporuje fakt, že neregulovaná mutageneze AID je schopná indukovat translokace ⁷⁰.

5.2. Leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) a chronická myeloidní leukémie (CML) jsou onemocnění, která jsou charakteristická filadelfským chromozomem. Ten vzniká translokací mezi chromozomy 9 a 22, která vede k fúzi protoonkogenu *ABL1* s genem *BCR*, za vzniku fúzního produktu, onkogenu BCR-ABL1 ⁷¹. AID způsobuje rezistenci v případech CML, která je léčena lékem Imatinib. Urychluje mutagenezi v BCR-ABL-1 kináze a dále tím zvyšuje její genomickou nestabilitu a rozvoj rezistence. Má také vliv na přechod chronického onemocnění do stádia blastické krize. Po umlčení genu *AICDA* nedochází ke vzniku mutací a rezistence ⁷². Obdobně exprese AID zhoršuje prognózu pacientů s chronickou lymfocytární leukémií ^{73,74} a zvyšuje genomickou nestabilitu v myším modelu ALL ⁷⁵.

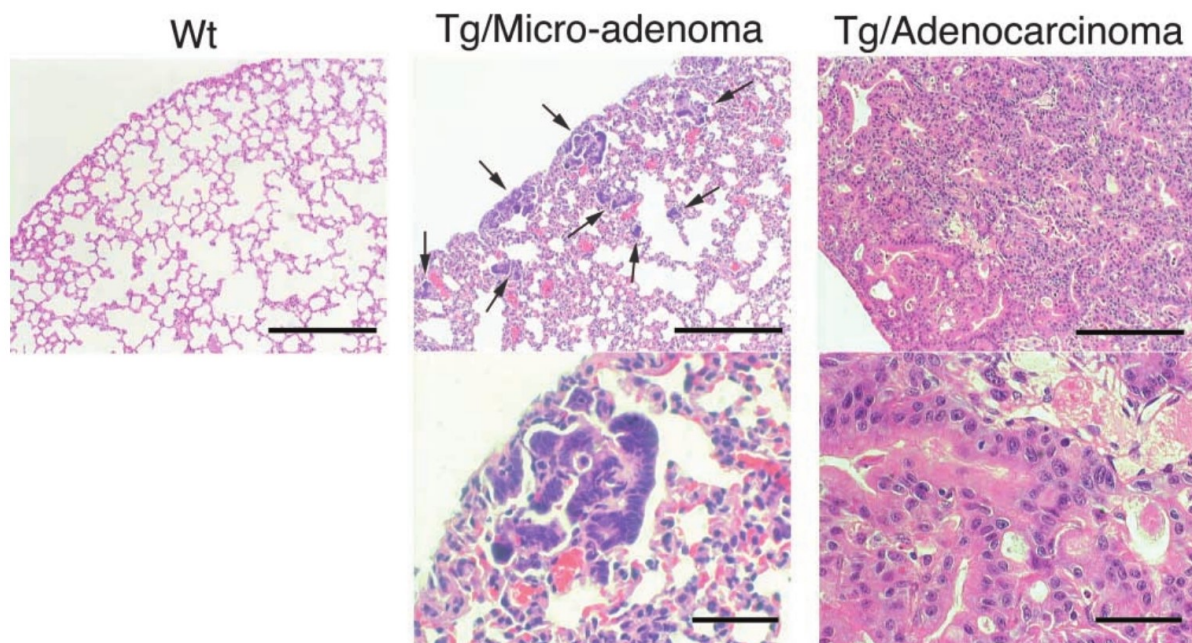
Expresí AID hraje roli i v T buněčných nádorech, konkrétně v těch indukovaných virem T buněčné leukémie (HTLV-1). Onkoprotein Tax zvyšuje expresi AID v infikovaných buňkách, což následně může vést ke vzniku T buněčných leukémií u dospělých ⁷⁶.

6. AID jako zdroj genomické nestability v epiteliálních tkáních

6.1. Historie a vývoj myších modelů pro studium AID

První myší model spouštěl expresi AID pod kuřecím beta-aktinovým promotorem. Transgenní myši (tg) měly oproti kontrolním wild-type myším (wt) kratší dobu dožití a umíraly se zvětšenými lymfoidními orgány. Po pitvě těchto orgánů identifikovali Okazaki et al. buňky připomínající buňky lymfoblastického lymfomu. Buňky pocházely z T buněk a k jejich transformaci došlo pomocí bodových mutací v *Tcr* a *Myc*, a nikoli pomocí translokací, jak se autoři domnívali. Mutované byly především G:C páry a převážně šlo o tranzice C>T, G>A. Plíce všech tg myší obsahovaly mikroadenomy, připomínající novotvary, které nacházíme u lidí. Tyto mikroadenomy by se pravděpodobně postupem času vyvinuly v maligní adenokarcinomy, což se stalo u dvou myší, které se dožily 60 týdnů (Obr. 10). Zbylé myši dříve umírají na agresivní lymfoidní nádory. Okazaki et al. tedy nemohli studovat další vývoj spontánních epiteliálních nádorů, které vznikají až v pozdějším věku ²¹.

Obdobný problém s časným umíráním myších modelů kvůli lymfoidním nádorům pozorovali později i Endo et al. v průběhu hepatokarcinogeneze, Sawai et al. v modelu vzniku adenokarcinomu pankreatu a Nonaka při studiu melanomů ^{43,77,78}.



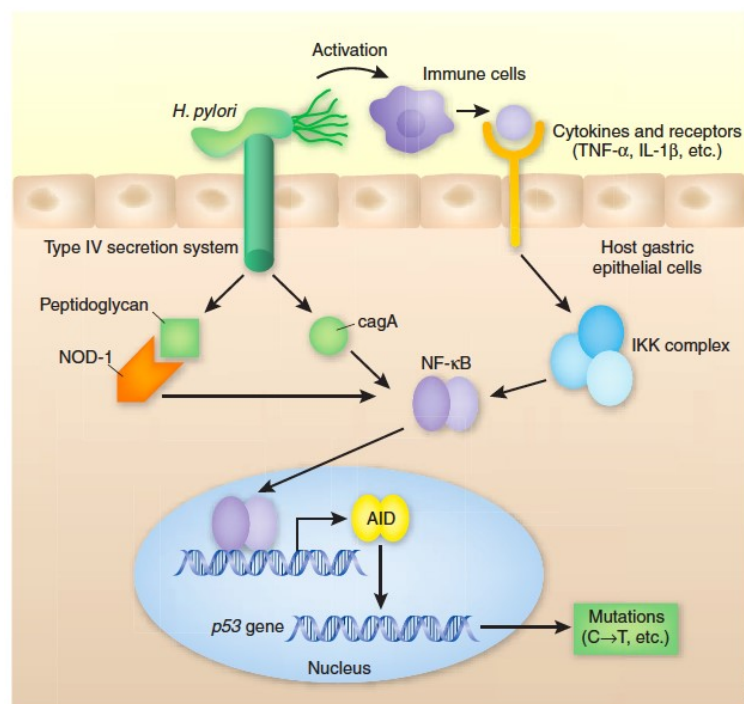
Obrázek 10 – Histologické řezy myší plicní tkáně barvené hematoxylinem a eosinem. Vlevo zdravý jedinec (wt), uprostřed tg myš s vyvinutými mikroadenomy označenými šipkami, vpravo adenokarcinom tg myši, která se dožila 60 týdnů. Měřítko: horní řada 250 μm , spodní řada 50 μm ²¹.

Nový myší model pro hepatokarcinogenezi představili Takai et al. roku 2009. Tg myši, které exprimovaly AID pouze v závislosti na expresi Cre-rekombinázy, křížil s myši, které exprimovaly Cre pouze v buňkách, které produkují alkalickou fosfatázu TNAP. U těchto myši pozorovali hepatocelulární karcinomy (HCC), které exprimovaly α -fetoprotein, (obdobně jako lidské HCC), adenokarcinomy plic a jeden případ adenokarcinomu žaludku. Mutační frekvence *TP53* v nádorové tkáni jater byla $3,29 \times 10^{-4}$, v adenokarcinomu žaludku to bylo $2,32 \times 10^{-4}$. Mutace se nacházely především v dinukleotidech GC. Nejvíce mutací obsahovala DNA vazebná doména genu *Trp53* ⁷⁹.

6.2. Karcinomy trávicího traktu

6.2.1. Žaludeční karcinom po infekci *Helicobacter pylori*

CagPAI-pozitivní kmeny *Helicobacter pylori* se řadí mezi karcinogeny první třídy. Infekce epiteliálních buněk těmito kmeny vede ke zvýšené expresi AID, a to pomocí TNF, který aktivuje NF- κ B. Zvýšení exprese AID probíhá i pomocí sekrečního systému IV, kterým *H.pylori* injikuje do buňky peptidoglykan a *cagA*, které aktivují NF- κ B pomocí nekonvencívních cest a tím zvyšuje genomickou nestabilitu infikovaných buněk (Obr. 11) ⁸⁰.



Obrázek 11 – Schéma aktivace AID infekcí žaludečního epitelu *H. pylori* ⁸⁰

Tabulka 3 – Expresí AID v žaludku

a) Myší modely

Model	Mutace	Další informace
TgAid po infekci <i>H. pylori</i> ⁸¹	Bodové mutace <i>Trp53</i>	2/59 myši vyvíjejí mikroadenomy žaludku
TgAid ⁸²	Delece, bodové mutace <i>Cdkn2a</i> , <i>Cdkn2b</i> Bodové mutace <i>Bcl6</i>	Infekci <i>H.pylori</i> -> zvýšení počtu delecí <i>Cdkn2a</i> , <i>Cdkn2b</i> (Aid-deficitní myši beze změny)
Hupki/Aid-Tg ⁸³	Bodové mutace <i>Trp53</i> (6/7 myši) Tranzice CG > TA v sekvenci GCX (8/9 mutací)	Mutace odpovídají pozicím mutací v lidských nádorech žaludku

b) Buněčné linie

Linie	Mutace	Další informace
AGS infikované cag-PAI ⁺ ⁸¹	Bodové mutace <i>TP53</i> Zvýšená frekvence mutací oproti neinfikovaným kontrolám i cag-PAI ⁻ ($2,23 \times 10^{-4}$ vs. 0)	Cag-PAI ⁺ buňky vykazují takzvaný „Hummingbird“ fenotyp
AGS s indukovanou expresí AID ⁸¹	Transkribovaná část <i>TP53</i> (frekvence mutací $23,5 \times 10^{-4}$) 68/110 mutací missense 4 mutace vedly ke ztrátě funkce	Chybí mutace v <i>MYC</i> (není aktivně transkribován) 40 mutací odpovídá mutacím v lidských nádorech
AGS s indukovanou expresí AID ⁸²	Delece signálu <i>CDKN2A, CDKN2B</i> (27,6 % chromozomů) Bodové mutace: <i>CDKN2A</i> ($3,1 \times 10^{-4}$) <i>CDKN2B</i> ($1,7 \times 10^{-4}$) <i>BCL6</i> ($0,4 \times 10^{-4}$)	-

c) Klinické vzorky

Vzorky	Pozitivita AID	Mutace	Další informace
<i>H. pylori</i> pozitivní chronická gastritida ⁸¹	29/35 (83 %)	<i>TP53</i> 4/10 (40 %)	AID lokalizovaná převážně v cytoplazmě
<i>H. pylori</i> pozitivní adenokarcinom žaludku ⁸¹	21/27 (78 %)	<i>TP53</i> 12/14 (86 %)	

Vzorky	Metoda	Mutace
<i>H. pylori</i> pozitivní nádorová tkáň ⁸³	Celoexomové sekvenování 5 vzorků (1 x MSI, 4 x MSS)	892 mutací v 793 genech (552 missense, 25 nonsense) 11 mutací v sestřihovém místě, 65 indelů mutace <i>TP53</i> (3/5), <i>ARID1A</i> (2/5) CG>TA tranzice: 65,1 % v MSI, 48,9 % v MSS Sekvence: GCA 23,9 %, GCC 24,3 %, GCG 38,4 %, GCT 13,4 %
Kontrolní zdravá tkáň týchž pacientů ⁸³	Celoexomové sekvenování 5 vzorků	142 mutací (91 non-silent)
<i>H. pylori</i> pozitivní tkáň ⁸³	Hluboké sekvenování 28 (adenokarcinom) 6 (bez karcinomu)	13 pozic v <i>TP53</i> (11 případů) 6 pozic <i>ARID1A</i> (4 případy) 3 pozice <i>KMT2D</i> (2 případy) Tranzice C:G > T:A , sekvence GCX 15/19 případů (78,9 % mutací TP53)

Tabulka 3 shrnuje poznatky o expresi AID v buňkách žaludku ve spojení s infekcí *H. pylori* a následný vliv na genomickou nestabilitu. Největší počet mutací pozorujeme v genu *TP53*, tam se jedná převážně o bodové mutace, postižené bývají i lokusy *CDKN2A/B* a *BCL6*, ve kterých kromě bodových mutací pozorujeme i submikroskopické delece (počet kopií genů *CDKN2A/B* byl ve 36 % případů lidských *H. pylori*⁺ gastrických adenokarcinomů snížen o více než polovinu) ⁸².

Shimizu et al. pomocí moderních sekvenačních metod dokázali, že *H. pylori*⁺ nádorová tkáň nese výrazně větší mutační nálož než zdravá tkáň stejných pacientů (892 vs. 142). Většina mutací je nesynonymních a může vést ke změně funkci daných genů a možnému nádorovému bujení. Mutační podpis AID pozorovali u 78,9 % mutací v genu *TP53* ⁸³.

Z množství informací uvedených výše, které porovnávají vliv exprese AID na vývoj nádorů na myších modelech, buněčných liniích a klinických vzorcích vyplývá, že infekce cag-PAI⁺ kmeny *H. pylori* zvyšuje expresi AID v žaludečním epitelu. Tato zvýšená exprese zvyšuje mutační nálož dané tkáně a vzhledem k množství pozorovaných nesynonymních mutací je dost pravděpodobné, že se podílí na vývoji nádoru v žaludečním epitelu.

6.2.2. Žaludeční karcinom spojení s infekcí virem Epstein-Barrové

Vir Epstein-Barrové (EBV) je herpes virus, který byl prvním potvrzeným onkovirem. Po infekci tímto virem dojde u většiny jedinců k nastolení latence, u některých je ale schopný vyvolávat nádory různých tkání, jak lymfoidních, tak epiteliálních⁸⁴. Protein tohoto viru, EBNA-3C, indukuje expresi AID v B buňkách, ve kterých vyvolává somatickou hypermutaci⁸⁵. Překvapivě ale větší pozitivitu AID vykazují adenokarcinomy žaludku, které nejsou indukované EVB. Exprese AID je v EBV-nezávislých karcinomech indukovaná pomocí TF PAX5 a tyto adenokarcinomy zároveň nesou větší množství mutací. EBNA-3C tedy indukuje expresi AID pouze v B buňkách, ale nikoli v buňkách žaludku⁸⁶.

6.2.3. Kolorektální karcinom

TNF zvyšuje expresi AID v případech kolorektálního karcinomu, který vzniká po chronických střevních zánětech. Expresi AID také umožňuje odpověď Th1 (IL12) a Th2 buněk (IL4, IL13). Aktivace probíhá pomocí TF STAT6, jehož vazebné místo se nachází v regulačních oblastech regionu IV. Buňky s konstitutivní AID expresí vykazují mutace v genu *TP53* (frekvence $2,27 \times 10^{-4}$)⁸⁷. Indukce AID pomocí Tnf a Il12 v myším modelu nespecifického střevního zánětu (Il10^{-/-}) vede ke zvýšenému množství mutací v *Trp53* (frekvence $2,19 \times 10^{-4}$). U 6 z 22 těchto myší dochází k vývoji invazivních kolorektálních karcinomů⁸⁸.

6.3. Hepatocelulární karcinom

Tg myši s konstitutivní expresí AID vyvíjejí hepatokarcinomy ve 4 z 16 případů⁴³. Po umělém navození zánětlivého prostředí pomocí thioacetamidu (TAA) dochází k vývoji makroskopických nádorů do 6 měsíců života ve 100 % případů (Obr. 12)⁸⁹. V jaterní tkáni je exprese AID indukovaná cytokiny TNF, IL1B a TGFB1^{89,90}. Expresi AID zvyšuje i infekce virem hepatitidy C (HCV), který indukuje expresi AID pomocí core proteinu, infekce hepatitidou B nemá na expresi AID vliv. Mutační frekvence genu *TP53* se ve čtyřech vzorcích HCV⁺ hepatocelulárních karcinomů pohybovala v rozmezí $11,6 - 15,1 \times 10^{-4}$ ⁹⁰.

Lidské buněčné linie obsahovaly mutace v genu *TP53*, myší modely v genech *Myc* (frekvence $0,8 \times 10^{-4}$), *Dusp6* ($1,72 \times 10^{-4}$ bez TAA, $3,49 \times 10^{-4}$ s TAA), *Egr1* ($7,73 \times 10^{-4}$ a $13,16 \times 10^{-4}$) a *Id2* ($5,37 \times 10^{-4}$ a $8,92 \times 10^{-4}$). Až na jednu delecí mutace odpovídaly mutačnímu podpisu AID^{43,89}. Roli AID v hepatokarcinogenezi shrnuje tabulka 4.

Tabulka 4 – Exprese AID v játrech

a) Myší modely

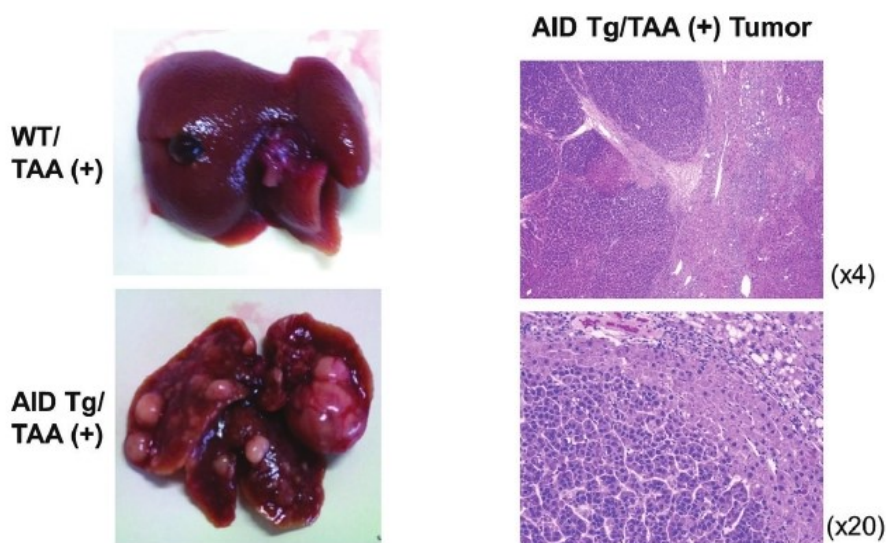
Model	Vnější projevy	Mutace
TgAid ⁴³	Hepatokarcinom (4/16 případů) T buněčné lymfomy	<i>Myc</i> Množství mutací bylo oproti běžným mutacím v TCR nízké
TgAid s indukovaným zánětem (TAA) ⁸⁹	Makroskopické nádory jater (u všech myši do šesti měsíců života)	<i>Dusp6, Egr1 a Id2</i> 416 mutací v nádorové jaterní tkáni (vs. 4 mutace u wt myši s TAA, 40 mutací u TgAid bez TAA) Tranzice C>T a G>A v sekvenci WRCH

b) Buněčné linie

Linie	Indukce AID	Mutace
HepG2 Hep3b Huh-6 ⁴³	TNF, IL1B (přes NF-κB) HCV core protein	2 mutace v genu <i>MYC</i> (frekvence $0,8 \times 10^{-4}$) 1 mutace v genu <i>PIMI</i> (frekvence $0,4 \times 10^{-4}$)
PLC/PRF/5 HepG2 ⁹⁰	TGFBI	mutace v <i>TP53</i> (frekvence $1,4 \times 10^{-4}$)

c) Klinické vzorky

Vzorky	Pozitivita AID	Další informace
Hepatokarcinom (51 případů) ⁹⁰	41/51 (80 %)	Exprese AID zvýšená v nádorové tkáni, tak i v tkáni ji obklopující



Obrázek 12 – Fotka jater wt myši a tg-Aid myši po 6 měsících po ovlivnění TAA (vlevo).

Vpravo histologický řez játry tg-Aid myši. Barvení hematoxylin-eosin⁸⁹.

6.3.1. Cholangiokarcinom

Cholangiokarcinom je nádorové onemocnění, které vzniká ze zdravých buněk žlučových. V těch je exprese AID indukovaná prozánětlivým cytokinem TNF. Komori et al. pozorovali zvýšenou expresi AID v klinických vzorcích sklerotizující cholangitidy (16/20 případů) a intrahepatálního cholangiokarcinomu (28/30 případů). Sekvenováním identifikovali mutace v promotoru tumorsupresorového genu *CDKN2A* (frekvence $0,72 \times 10^{-4}$), *MYC* ($0,51 \times 10^{-4}$) a *TP53*, kde mutace postihují pouze exony 5 a 6 ($0,71 \times 10^{-4}$)⁹¹.

6.4. Adenokarcinom pankreatu

Jedním z nejsmrtelnějších rakovinných onemocnění jsou nádory duktálních buněk pankreatu. Exprese AID koreluje s progresí onemocnění – silnou expresi AID pozorujeme ve 20/20 případů duktálních adenokarcinomů pankreatu, slabou expresi v případech metaplázií a neoplázií. Tg-Aid myši vyvíjejí do 13 týdnů novotvary obdobné lidským prekancerózním lézím. Sawai et al. celoexomovým sekvenováním tkáně pankreatu Tg-Aid myši identifikovali 117 somatických mutací, 37 % z nich odpovídá mutačnímu podpisu AID. Hlubokým sekvenováním prekancerózních lézí Tg-Aid myši odhalili mutace genů *Myc* ($0,79 \times 10^{-4}$), *Kras* ($0,9 \times 10^{-4}$) a *Smad4* ($0,5 \times 10^{-4}$). Mutace *Trp53* se zde nevyskytují⁷⁷.

6.5. Barrettův adenokarcinom

Barrettův jícen je zánětlivé onemocnění, které je ve velkém procentu případů následované Barrettovým adenokarcinomem. Zánětlivé prostředí způsobují žlučové kyseliny, které se do jícnu dostávají při gastroezofageálním refluxu. Dle očekávání byla exprese AID zvýšená v buňkách epitelu Barretova jícnu (24/28 případů, z toho 17 silná exprese), ještě větší pozitivita byla v buňkách adenokarcinomu (20/22 případů, z toho 12 silná exprese). Expresi AID v buněčné linii Het-1A indukují žlučové kyseliny pomocí dráhy NF-κB. Stejně jako u adenokarcinomu žaludku se zde vyskytují mutace v genech *TP53* ($1,52 \times 10^{-4}$) a *CDKN2A* ($2,7 \times 10^{-4}$)⁹².

6.6. Karcinomy orálního epitelu

Zánětlivou kaskádu v případech orálních karcinomů vyvolávají látky, se kterými přijde tkáň úst do styku, nejčastěji se jedná o karcinogeny tabákového kouře a alkohol. Zdrojem zánětu může být i chronické onemocnění zubů a dásní, způsobené mikroorganismy z jídla, které tvoří tenký film kolem zubů. Expresi AID indukují cytokiny EGF a TNF, které aktivují dráhu NF-κB^{93, 94}. Účinky kouření simulovali Nonaka et al. na Tg-Aid myších pomocí látky, která

způsobuje DNA adukty (4NQO). Po 32 týdnech pozorovali vznik orálních karcinomů u 80 % Tg-Aid myši⁷⁸.

Nakanishi et al. potvrdili expresi AID v 37 % vzorků lidských orálních karcinomů. Vzorky počátečních stádií karcinomů (T1 a T2) vykazují vyšší AID pozitivitu, než stádia pokročilá a metastazující (T3 a T4). Roli AID v iniciaci tumorigeneze dále potvrzují i zjištěním, že pouze nemetastazující buněčné linie HSC-2 exprimují AID, metastazující linie HSC-3 nikoliv⁹⁴. Miyazaki et al. také pozorovali expresi AID v počátečních stádiích, konkrétně v epiteliálních dysplaziích. Zároveň ale v buněčné linii HSC-2 ukazují, že AID umožňuje progresi onemocnění pomocí regulace exprese genů *SNAIL* (*Snail*) a *CDH2* (*N-cadherin*). Vliv exprese AID na regulaci *CDH1* (*E-cadherinu*) ale nepotvrdili⁹⁵.

6.7. Karcinomy kůže

Mezi nádory s vysokou mutační náloží patří nádory kůže (melanomy). Jejich vysoká mutační nálož je způsobena UV zářením, které v nukleotidové sekvenci indukuje tranzice C>T. Část nádorů ale vzniká nezávisle na UV záření, a proto se hledá jiný zdroj těchto mutací.

Pro melanomy japonského obyvatelstva je typická mutace v genu *BRAF*, a to na pozici 600, kdy dochází k záměně valinu za glutamovou kyselinu (V600E). První studii, která jasně označuje AID za zdroj genomické nestability v melanomech, provedl Okura na skupině 16 pacientů v oblasti Japonska, která není postižena vysokou UV radiací. Vzorky 10 pacientů vykazovaly silnou AID pozitivitu, 9 z nich neslo mutaci V600E. Po 4 letech monitorování vykazovalo 8 pacientů s vysokou expresí AID multiorgánové metastáze (včetně lymfoidních metastází)⁹⁶.

Sanchez a Grichnik provedli bioinformatickou analýzu mutačních podpisů UVA, UVB záření, AID a spontánní deaminace v melanomech. Jejich výsledek nepotvrdil Okurovo zjištění o roli AID při vzniku *BRAF* mutací. Většina mutací svým sekvenčním kontextem nadále odpovídá UV záření. To ale dle mého názoru nevylučuje možnost, že AID stojí za vznikem mutací v části nádorů, na které UV záření vliv nemá, což ale v této analýze nebylo samostatně posouzeno. To potvrzuje i objevení mutačního podpisu AID ve speciálních melanomech, konkrétně akrálních, mukózních a uveálních, což jsou melanomy, které většinou nejsou indukovány UV zářením. Mukózní melanomy navíc znovu potvrzují zjištění o indukci tumorigeneze pomocí AID v orálních karcinomech⁹⁷.

Myši tg-Aid modely spontánně vyvíjejí melanomy v malém počtu, jejich počet vzrůstá po chemické indukci. Všechny nádory jsou silně proliferující, jedná se hlavně o melanomy, orální karcinomy a karcinomy krku a hlavy, všechny jsou podobné lidským nádorům. AID se

podílí na iniciaci i na dalším šíření nádorů. „Gain-of-function“ mutace vznikají v genu *Hras*, „Loss-of-function“ mutace ve vazebné doméně genu *Trp53*. Mutace *Trp53* odpovídaly mutačnímu podpisu AID, *Hras* nikoliv. V buněčných liniích keratinocytů je AID indukovaná jak vnitřními (TGFB1, IL1B), tak vnějšími faktory (LPS, UVB záření). Klinické vzorky nádorů pokožky vykazují AID pozitivitu ve 42,5 % případů, z toho nejvíc v melanomech (42,9 %) a skvamocelulárních karcinomech (33,3 %), méně pak v případech bazocelulárního karcinomu (15,4 %). V případech karcinomů hlavy a krku byla AID pozitivita vyšší v počátečních stádiích, celkem ve 44 % případů, z toho ve 40 % skvamocelulárních karcinomů a 25 % melanomů. Nonaka et al. také identifikovali expresi AID ve vlasových folikulech a potvrdili mutační podpis AID v nádorech pokožky v oblasti genitálií (48 % odpovídalo mutačnímu podpisu AID), což znovu potvrzuje roli AID ve vzniku melanomů nezávislých na UV záření ⁹⁸.

6.7.1. Karcinom Merkelových buněk (MCC)

Karcinom Merkelových buněk je neurodegenerativní onemocnění, které je v 80 % případů způsobováno polyomavirem Merkelových buněk. V roce 2013 publikovali Watabe a Nakamura popis dvou případů pacientů s tímto typem nádorů v pokročilém stádiu, s metastázemi v lymfoidních tkáních, oba případy karcinomů byly vysoce pozitivní na AID ⁹⁹.

Spojitosť MCC s AID o 4 roky později vyvrátili Matsushita et al., kteří ukázali, že pouze virově nezávislé MCC vykazují zvýšenou expresi AID, i přesto, že NF-κB je několikanásobně zvýšen ve virově závislých nádorech ¹⁰⁰. To potvrzují i sekvenační data, která ukazují, že MCC nezávislé na polyomaviru nesou mnohem větší mutační zátěž (více než 10 mutací na megabázi vs. 0,40 mutací na megabázi), a to převážně tranzice C > T ¹⁰¹.

6.8. Karcinom plic

Mezi nádory s nejvyšší mutační náloží patří nádory plic, a to převážně kvůli karcinogenům tabákového kouře, které z normálních bází dělají báze modifikované. I proto patří mezi jedny z nejpočetnějších s vysokým rizikem úmrtí.

Expresi AID v plicních buněčných liniích indukují TNF a IL1B. V myším modelu s konstitutivní expresí AID dochází po 6 měsících u všech myší ke vzniku mukózních metaplázií plic, v 7 případech z 64 pozorujeme makroskopické tumory plic. Nádorová tkáň obsahuje mutace v genu *Trp53*, jedná se o 5 „missense“ mutací, 4 se nachází v místě, které má vliv na správnou funkci genu. Kitamura et al. navíc jako první ukazují konkrétní příklad cytotoxicity AID – buňky jater a plic tg-Aid myší vykazují zvýšenou buněčnou smrt ¹⁰².

Shinmura et al. pozorovali expresi AID ve 29,4 % nádorových buněčných linií a 31,4 % primárních nádorů. Buněčné linie H1299 s konstitutivní expresí AID vykazují 5-6krát vyšší frekvenci mutací než kontrolní buňky. Nejčastěji se jedná o mutace *TP53* (mutace v 41,1 % případů), hlavně jednonukleotidové substituce G:C > T:A, A:T. Mutační podpis AID byl nejvýraznější u AID pozitivních buněk starších pacientů. Shinmura et al. jako první pozorovali expresi AID v centrozomech. Je tedy možné, že se AID podílí na genomické nestabilitě i dalším mechanismem, a to ovlivňováním funkce centrozomu ¹⁰³.

6.8.1. AID jako zdroj získané rezistence

Podobně jako u léčby CML, dochází v případech adenokarcinomů plic ke zvýšené rezistenci k léčbě tyrozinkinázovými inhibitory s prodlužující se dobou léčby. Jedná se konkrétně o adenokarcinomy, které vykazují zvýšenou expresi *EGFR*. U většiny případů je tato rezistence způsobena jednonukleotidovou tranzicí v genu *EGFR*. Tranzicí C>T dojde k záměně threoninu za methionin, tedy T790M. Cytosin v dané sekvenci je methylovaný a tudíž tranzice C>T odpovídá mutačnímu podpisu AID. Po aplikaci tyrozinkinázových inhibitorů tří různých generací dochází ke zvýšení exprese AID ve všech případech. Po inhibici nekanonické NF-κB aktivační dráhy dochází k opětovnému snížení této exprese. Po knock-down genu *AICDA* pomocí CRISPR mutace T790M nevzniká. Je pravděpodobné, že ordinování tyrozinkinázových inhibitorů spolu s inhibitorem AID by mohlo vést k prodloužení doby funkce terapie ¹⁰⁴.

6.8.2. Exprese Ig řetězců nádorovými buňkami

Roku 2003 dokázali Qiu et al., že nádorové buňky epitelálního původu mohou exprimovat IgG. Inhibicí pomocí krátkých řetězců antisense DNA dochází k inhibici růstu a apoptóze nádorových buněk ¹⁰⁵. Tento fakt potvrdili Jiang et al. v případech adenokarcinomu a skvamózního plicního karcinomu. 85 % těchto nádorů expimovalo Igλ a Igμ, a to hlavně v cytoplazmě a na plazmatické membráně. Dále také exprimují enzymy potřebné k syntéze a maturaci protilátek – rekombinační enzymy (RAG1, RAG2) a AID. Exprese IgG koreluje s klinicko-patologickým stavem pacienta a množstvím lymfatických metastáz. Roli exprese IgG v metastatickém procesu potvrzuje také fakt, že po inhibici IgG pomocí siRNA došlo ke snížení migrace buněk, pravděpodobně pomocí regulace genu *MTAI* ¹⁰⁶.

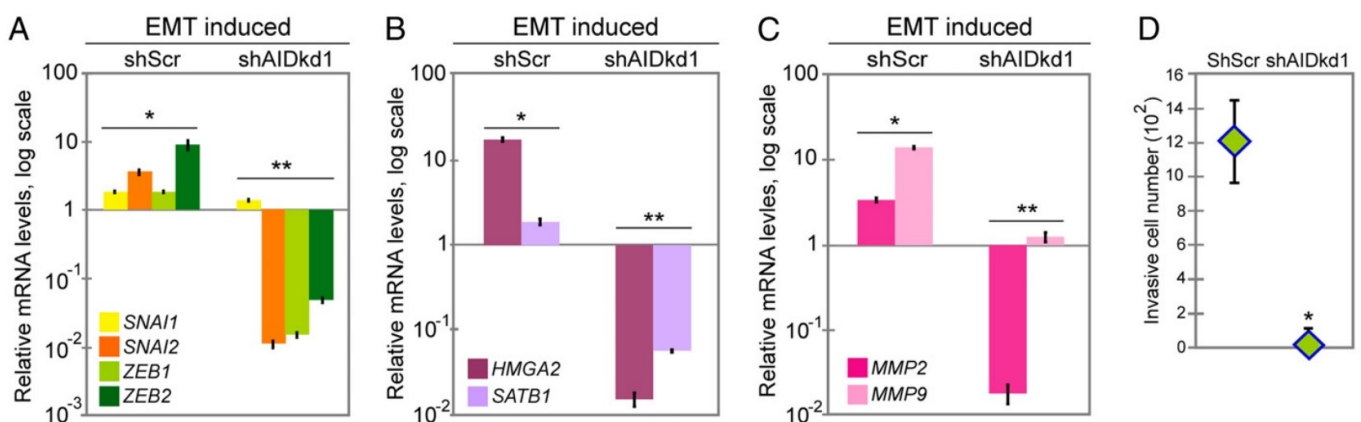
Duan et al. dokázali, že AID indukuje izotypový přesmyk v imunoglobulinových genech exprimovaných nádorovými buňkami různého charakteru, konkrétně Raji, CNE1, CM, HeLa,

Hela S3, A549. Stejně jako při klasickém CSR indukují expresi AID cytokiny TNF přes kanonickou NF- κ B dráhu ¹⁰⁷.

6.9. Karcinom prsu

Babbage et al. studovali expresi těžkého řetězce V_H na 6 nádorových liniích rakoviny prsu (konkrétně BT474, MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3, T47D a ZR75-1), všechny byly silně AID pozitivní. Úroveň exprese AID v nádorových buněčných liniích karcinomu prsu odpovídala úrovni exprese v buňkách B-buněčného lymfomu. U čtyř linií pozorovali přestavěné řetězce V_H, u dvou z nich nastaly dokonce dvojité přestavby (SKBR3, ZR75-1). Stejně řetězce pozorovali i po třídění na jednotlivé buňky – přibližně 32 % buněk exprimovalo V_H. Přestavěné řetězce vykazovaly somatické mutace a všechny linie vykazovaly obdobné mutační podpisy mezi jednotlivými klony. Je tedy dost pravděpodobné, že AID hraje roli v expresi těchto Ig podobně jako v klasické protilátkové odpovědi v B buňkách ¹⁰⁸.

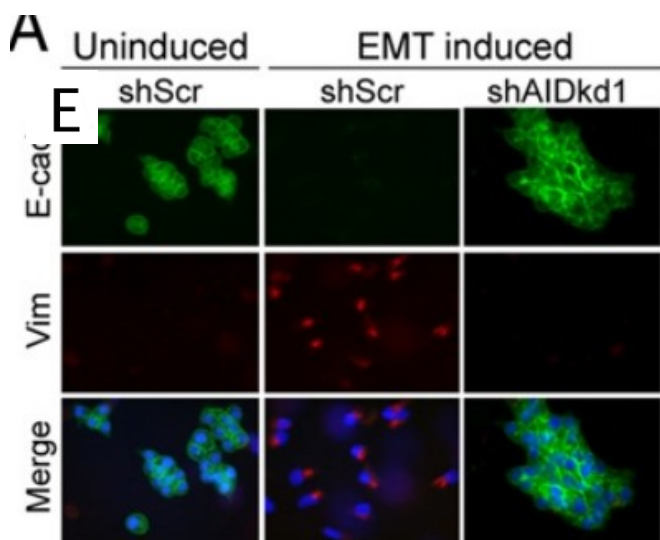
Epiteliálně-mezenchymální přesmyk (EMT) je proces podstatný pro progresi a metastazování nádorových buněk. Nádorové buňky se mění ze statických buněk na buňky schopné migrace. Ztrácí těsné spoje, desmozomy a cytoskeletální proteiny, snižují expresi E-cadherinu (*CDH1*), místo toho exprimují N-cadherin (*CDH2*), fibronektin (*FNI*), vimentin (*VIM*) a metaloproteázy ¹⁰⁹. Muñoz et al. dokázali, že TNF a TGF1B jsou induktory jak EMT, tak exprese AID. Inhibicí exprese AID v buněčné linii ZR75.1 dochází ke snížení exprese faktorů významných pro EMT, konkrétně *CDH2*, *VIM*, *HMGA2*, *SATB1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *MMP2*, *MMP9* (Obr. 13). Dochází k tomu pravděpodobně pomocí změn methylace promotorů daných genů. Inhibice exprese AID také snižuje schopnost migrace buněk ¹¹⁰. První nádorová tkáň je po melanomech druhou tkání, kde AID reguluje progresi onemocnění.



Obrázek 13 – Vliv inhibice AID na expresi faktorů spojených s EMT v buněčné linii ZR75.1

A, B, C – množství mRNA v buňkách s inhibovanou expresí AID (shRNA ~ shAIDkd1),

porovnáváno s expresí v buňkách s normální expresí AID („scrambled“ shRNA ~ shScr)



D – množství buněk schopných migrace a invaze v buňkách s normální a inhibovanou expresí AID.

E. Immunoflorescence týchž buněk. Při normálním EMT (shScr) ztrácí buňky expresi E-cadherinu a nabývají expresi Vimentinu, v buňkách s inhibovaným AID (shAIDkd1) nikoliv¹¹⁰.

6.10. Uroteliální karcinom

Uroteliální karcinom je třetí případ potvrzené exprese IgG ve spojení s AID kde 91,1 % klinických vzorků vykazuje expresi IgG. I zde po inhibici exprese IgG dochází ke snížení buněčného růstu a zvýšení apoptózy buněk¹¹¹. Stejně tak po knock-down genu *AICDA* dochází k apoptóze buněk a snížení schopnosti migrace nádorových buněk. Nádorové buňky s inhibovanou expresí AID nejsou po injekci do nahých myší schopny vytvořit nádor. Proteomická analýza ukázala, že inhibicí AID dochází ke změně exprese množství genů – u 99 genů dochází ke zvýšení aktivity, u 142 ke snížení. Převážně se jednalo o geny vykonávající katalytickou aktivitu (44,7 %) a geny s vazebnou funkcí (38,6 %). Nejvýraznější změny byly v genu *TP53*, je tady pravděpodobné, že AID reguluje tumorigenezi uroteliálních buněk pomocí deregulace *TP53*, případně pomocí regulace methylace promotoru genu *MMP14*, která vede k jeho zvýšené expresi¹¹².

6.11. Karcinom ovarií

6.11.1. Karcinom ovarií u nositelek mutace BRCA

BRCA1 a *BRCA2* (z anglického „Breast cancer“) jsou tumorsupresorové geny, exprimované v různých tkáních, v největším procentu v prsní tkáni a v ovariích. Do současné doby bylo identifikováno více než 1600 mutací genu *BRCA1* a přes 1800 mutací genu *BRCA2*, velké procento z nich vede k omezení funkce. Nositelé těchto mutací mají kromě zvýšené pravděpodobnosti rakoviny ovarií (u mužů rakoviny prostaty) a prsu, také větší procento melanomů, rakovin žaludku, žlučníku a žlučovodu. Podle statistik okolo 60 % nositelek mutací *BRCA1* a 45 % mutací *BRCA2* bude do 70 let věku diagnostikovaná rakovina prsu¹¹³.

Epigenetické reprogramování buněk je zásadním krokem rakovinného bujení. Barlett et al. se ve své práci zaměřují na „high-grade“ serózní karcinomy, které vznikají z buněk vejcovodu, a to pouze v jeho distální části. Proximální část vejcovodu slouží jako negativní kontrola pro porovnání míry míry epigenetických modifikací a vlivu na vznik nádoru ¹¹⁴.

Na vzorcích ovariální tkáně 52 nositelek mutace BRCA a 49 kontrolních pacientek studovali změny methylace CpG ostrůvků (Tab. 5). To samé studovali i v primárních kulturách, ve kterých indukovali expresi AID (exprese opět probíhá pomocí cytokinů TNF a IL1B přes kanonickou dráhu NF-κB).

Tabulka 5 – Změny methylace v případech ovariálního karcinomu

Vzorek	Rozdíl v methylaci	Další informace
Zdravé pacientky bez BRCA mutace	37991	-
Zdravé nositelky BRCA mutace	106723	81 % hypometylováno 19 % hypermetylováno
Primární kultura s expresí AID	44760	64 % hypometylováno 36 % hypermetylováno

Nejvýraznější rozdíly v methylaci postihují geny spojené s vývojem ovariálních karcinomů, mezi nimi hlavně gen *HOXC4*, který je silným induktorem AID. Konkrétně se jedná o promotor tohoto genu, který obsahuje estrogen-responsivní element a vazebné místo pro transkripční faktor NF-κB. Methylace v primární kultuře odpovídá methylačním vzorům v distální části ovarií nositelek mutace BRCA, i methylaci v klinických vzorcích ovariálních karcinomů ¹¹⁴.

Zdrojem zánětu v místě ovarií může být hluboký pánevní zánět, ale i pravidelná ovulace. Již roku 1971 Fathalla prezentoval svou „Incessant ovulation theory“, ve které označil pravidelnou a nepřerušenu ovulaci za rizikový faktor při kterém epitel opakovaně prochází poškozením a je vystavován folikulární tekutině, což následně vede ke vzniku neoplázií v ovariích ¹¹⁵. Folikulární tekutina je komplexní tekutina obsahující steroidní hormony, růstové faktory, cytokiny, ROS, prostanoidy a proteolytické enzymy, umožňující dozrávání oocytů a ovulaci ¹¹⁶. Utváří tak prostředí, které je nápadně podobné prostředí zánětlivé reakce a může tak být rizikovým faktorem pro vznik nádoru.

Vlivu ovulace na expresi AID se věnovali Sapoznik et al. Epiteliální buňky vejcovodu inkubovali s folikulární tekutinou, což zvýšilo expresi AID více než 4x. Po této indukci byla AID funkční a schopná mutageneze i demethylace (snížení methylace přibližně o 20 %). Ještě větší míru demethylace (až 50 %) pozorovali v buňkách s konstitutivní expresí AID. I zde měla

AID vliv na expresi dalších genů – v buňkách s konstitutivní expresí AID dochází ke zvýšení exprese 145 genů a snížení exprese 24 genů. V těchto buňkách také dochází k nárůstu genomické nestability – dvouřetězcových DNA zlomů (50% nárůst), abazických míst (36% nárůst) a genomických přestaveb. Klinické vzorky karcinomů ovarii vykazovaly AID pozitivitu v 72,8 % případů – v 18,2 % silná, 24,3 % střední a 30,3 % slabá exprese. Bioinformatická analýza 293 exomů karcinomů ovarii ukázala nárůst somatických mutací o celkem 33 859 mutací, z nichž 32,5 % byly C:G > T:A tranzice. Většina nádorů obsahovala zvýšenou frekvenci výskytu AID podpisů, ale mutace v nich nebyly tak časté. V tomto případě má pravděpodobně na genomickou nestabilitu větší vliv APOBEC3B, v jehož mutačním podpisu pozorujeme zvýšené procento mutací ¹¹⁷.

7. Závěr

Tato práce shrnuje poznatky o expresi AID v nádorech pevného typu, která se poté promítá do jejich genomické nestability. Právě role AID v buněčných patologiích je vhodným příkladem dvousečnosti jednotlivých komponent imunitního systému. AID je enzym, který podmiňuje specifickou a efektivní protilátkovou odpověď a chrání tak náš organismus před cizorodými patogeny. Při jeho nedostatečné expresi dochází k patologiím autoimunitního charakteru jako je HIGH2 a člověk snadno podléhá onemocněním bakteriálního a virového typu. Při zvýšené expresi naopak může docházet k translokacím a bodovým mutacím, které mohou vést k nádorům lymfoidních i epitelálních tkání.

Expresi AID pozorujeme v řadě pevných nádorů, a to konkrétně v adenokarcinomu žaludku, plic, pankreatu a prsu, hepatokarcinomu, cholangiokarcinomu, Barrettově adenokarcinomu, kolorektálním karcinomu, ovariálních karcinomech a karcinomů krku a hlavy, včetně karcinomů orálních, ale také v řadě melanomů. Bylo to prokázáno jak na úrovni klinických vzorků a buněčných linií, tak i myších modelů s konstitutivní/inhibovanou expresí AID, jak shrnuje [tabulka 6](#). Aktivace probíhá ve většině případů pomocí kanonické NF-κB dráhy, v menším procentu pak i pomocí alternativní nekanonické dráhy. Tyto dráhy jsou aktivované cytokiny TNF, TGFB1 a IL1B, které jsou v tkáních vylučované při zánětu, dále také růstovým faktorem EGF. Zdrojem zánětu v tkáni jsou exogenní faktory, nejčastěji patogeny, například *Helicobacter pylori* v žaludku, HCV v játrech, či HTLV-1 v případech T buněčné leukémie. Endogenními faktory jsou zánětlivá onemocnění daných tkání – cirhóza jater v případě hepatokarcinomu, hluboký pánevní zánět, který vede ke vzniku ovariálních karcinomů či záněty zubů a dásní v případech orálních karcinomů. Zánětlivé prostředí je

simulováno i fyziologickými procesy lidského těla jako je ovulace, případně je zánětlivé prostředí navozené pomocí refluxu žlučových kyselin.

Zvýšená exprese AID v tkáních vede ke zvýšení mutační nálože v několika tumorsupresorových genech, nejčastěji se jedná o *TP53*, v menším procentě pak v genech *KRAS*, *MYC* a *CDKN2A/B*. Jedná se o jednonukleotidové substituce, nejčastěji C>T a G>A, v sekvenci WRC/GYW, v malém procentu se vyskytují i delece. Tyto mutace zvyšují genomickou nestabilitu daných buněk.

Expresi AID při nádorovém bujení pozorujeme v různých stádiích tumorigeneze. Studie na myších modelech s konstitutivní expresí Aid dokazují přímý vliv na onkogenní transformaci a iniciaci nádorového bujení. Stejný fakt pozorujeme i v množství patientských vzorků, kdy nejvyšší expresi vykazují tkáně procházející zánětem a následná počáteční stádia nádorů. V dalších případech stoupá exprese AID s progresí onemocnění. Zvýšená mutageneze pomocí AID je v těchto případech významným faktorem zhoršujícím prognózu pacienta. AID je také důležitá při progresi a tvorbě metastáz. Část studií dokonce ukazuje, že mutageneze AID může být zdrojem rezistence k léčbě. AID se kromě přímé mutageneze podílí na tumorigenezi i pomocí epigenetické regulace dalších genů spojovaných s tumorigenezí, a to pomocí změn methylace promotorů těchto genů.

Doposud publikovaná fakta, uvedená v této práci, dle mého názoru neumožňují podat jasný závěr o funkci AID v procesu nádorového bujení. Rakovina je komplexní onemocnění, které vzniká působením mnoha faktorů dohromady. Na základě výše uvedených faktů bych AID (a obecně mutační enzymy/deaminázy) označila za jeden z nich. Na základě velkého množství informací, které pocházejí od různých výzkumných skupin, které danou problematiku zkoumali na množství odlišných vzorků, bych AID označila za zdroj genomické nestability v buňkách, která vede k onkogenní transformaci. Protože se ovšem exprese a funkce daného enzymu liší případ od případu, je neustále potřeba studovat faktory, které AID podmíněnou mutagenezí ovlivňují, a to včetně charakteristik dané tkáně, zánětlivých podmínek, stáří a progresse onemocnění. Myslím si, že problematika deaminačních enzymů je téma, kterému do budoucna bude věnováno ještě velké množství pozornosti. V první řadě kvůli tomu, že se dá očekávat, že nádory exprimující mutační enzymy budou obsahovat více mutací, a tedy budou i vhodnější pro imunoterapeutickou léčbu. Právě přítomnost exprese této skupiny enzymů v nádorové tkáni by mohla sloužit jako vhodný biomarker.

Tabulka 6 – Shrnutí zjištění o expresi AID v epiteliálních nádorech

Tkáň	Expresie AID v klinických vzorcích	Myší model s konstitutivně exprimovanou AID	Mutované geny v buněčných liniích	Zdroj zánětlivého prostředí	Mutační podpis AID	Aktivace cytokiny	Role v EMT	Expresie IgG
Žaludek	chronická gastritida (29/35) adenokarcinom žaludku (21/27)	mikroadenomy žaludku	TP53 delece a mutace <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>BCL6</i>	<i>H. pylori</i>	ANO	TNF	/	/
Tlusté střevo + konečník	ulcerózní kolitida neoplastické buňky nádorových lézí	invazivní kolorektální karcinom (6/22) mutace <i>Trp53</i> ($2,19 \times 10^{-4}$)	<i>TP53</i> ($2,27 \times 10^{-4}$)	chronické střevní záněty	/	TNF IL4 IL12 IL13	/	/
Játra	hepatokarcinom (41/51)	hepatokarcinom (4/16), navození zánětlivého prostředí -> hepato- karcinom u všech myší	<i>TP53</i> ($1,4 \times 10^{-4}$)	HCV cirhóza jater chronická hepatitida	ANO	TNF IL1B TGFB1	/	/
Žlučovod	sklerotizující cholangitida (16/20) intrahepatální cholangiokarcinom (28/30)	/	<i>CDKN2A</i> ($0,72 \times 10^{-4}$) <i>MYC</i> ($0,51 \times 10^{-4}$) <i>TP53</i> ($0,71 \times 10^{-4}$)	primární sklerotizující cholangitida	/	TNF	/	/
Slinivka břišní	duktální adenokarcinom pankreatu (20/20) slabá exprese v metaplaziích a neopláziích (AID koreluje s progresí)	útvary obdobné lidským prekancerózním lézím do 13 týdne života, mutace <i>Myc</i> , <i>Kras</i>	/	/	ANO	/	/	/
Jícen	Barretův jícen (24/28) Barretův adenokarcinom (20/22)	/	<i>TP53</i> ($1,52 \times 10^{-4}$) <i>CDKN2A</i> ($2,7 \times 10^{-4}$)	žlučové kyseliny	/	/	/	/

Orální epitel	epiteliální dysplázie orální karcinom 37 % vyšší exprese v počátečních stádiích	Po 32 týdnech 4NQO 80 % Tg-Aid myši orální karcinomy	exprese AID v nemetastazujících buněčných liniích	záněty ústní dutiny způsobené jídlem, alkoholem, kouřením	/	EGF TNF	ANO	/
Kůže	10/16 melanomů (Japonsko) nádory pokožky 42 % nádory hlavy a krku 44,4 %	melanomy, orální karcinomy a karcinomy krku a hlavy	/	LPS, UVB záření	v nádorech nezávislých na UV ANO	TGFB1 IL1B	/	/
Plíce	pozitivita 31,4 %	MALL (64/64) Makroskopické tumory (7/64)	mutace <i>TP53</i>	/	ANO	TNF IL1B	/	ANO
Prsa	/	/	exprese AID ve všech liniích > přestavěné Ig řetězce s mutacemi, role AID v regulaci EMT genů	/	ANO	TNF TGF	ANO	ANO
Močový měchýř	uroteliální karcinom	inhibicí AID dojde k inhibici růstu nádorů	inhibicí AID snížená proliferace a migrace, regulace genů pomocí AID	/	/	/	ANO	ANO
Ovaria	72,8 % případů - 18,2 % silná - 24,3 % střední - 30,3 % slabá exprese	/	exprese AID ve FTECs změna methylace genů, nejvýznamněji <i>HOXC4</i>	ovulace, hluboký pánevní zánět	ANO	TNF	/	/

8. Seznam použité literatury:

Symbol * označuje přehledový článek

1. *Basu, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
2. *Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
3. *Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. *Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* **8**, 761–773 (2017).
5. *Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–7218 (2017).
6. *Yao, Y. & Dai, W. Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen* **5**, (2014).
7. *Bailey, M. H. *et al.* Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* **173**, 371–385.e18 (2018).
8. *Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
9. *Ozaki, T. & Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* **3**, 994–1013 (2011).
10. Milholland, B. *et al.* Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nature Communications* **8**, 15183 (2017).
11. *Gonzalez-Perez, A., Sabarinathan, R. & Lopez-Bigas, N. Local Determinants of the Mutational Landscape of the Human Genome. *Cell* **177**, 101–114 (2019).
12. Chalmers, Z. R. *et al.* Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* **9**, (2017).
13. Brady, S. W. *et al.* Combating subclonal evolution of resistant cancer phenotypes. *Nature Communications* **8**, 1231 (2017).
14. *Zugazagoitia, J. *et al.* Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther* **38**, 1551–1566 (2016).
15. *Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
16. *Savva, Y. A., Rieder, L. E. & Reenan, R. A. The ADAR protein family. *Genome Biol* **13**, 252 (2012).
17. *Conticello, S. G. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol* **9**, 229 (2008).
18. *Kung, C.-P., Maggi, L. B. J. & Weber, J. D. The Role of RNA Editing in Cancer Development and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol.* **9**, (2018).
19. *Rebhandl, S., Huemer, M., Greil, R. & Geisberger, R. AID/APOBEC deaminases and cancer. *Oncoscience* **2**, 320–333 (2015).
20. *Choudhary, M. *et al.* AID Biology: A pathological and clinical perspective. *Int. Rev. Immunol.* **37**, 37–56 (2018).
21. Okazaki, I. *et al.* Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis. *J Exp Med* **197**, 1173–1181 (2003).
22. *Mechtcheriakova, D., Svoboda, M., Meshcheryakova, A. & Jensen-Jarolim, E. Activation-induced cytidine deaminase (AID) linking immunity, chronic inflammation, and cancer. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 1591–1598 (2012).
23. Muramatsu, M. *et al.* Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 18470–18476 (1999).
24. Muramatsu, M. *et al.* Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
25. Ta, V.-T. *et al.* AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* **4**, 843–848 (2003).
26. Shivarov, V., Shinkura, R. & Honjo, T. Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15866–15871 (2008).
27. *Salter, J. D., Bennett, R. P. & Smith, H. C. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci* **41**, 578–594 (2016).

28. Ko, T.-P. *et al.* Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution. *J. Biol. Chem.* **278**, 19111–19117 (2003).
29. *Martin, A., Chahwan, R., Parsa, J. Y. & Scharff, M. D. Chapter 20 - Somatic Hypermutation: The Molecular Mechanisms Underlying the Production of Effective High-Affinity Antibodies. in *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)* (eds. Alt, F. W., Honjo, T., Radbruch, A. & Reth, M.) 363–388 (Academic Press, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397933-9.00020-5
30. Bennett, R. A., Wilson, D. M., Wong, D. & Demple, B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7166–7169 (1997).
31. Rada, C. *et al.* Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* **12**, 1748–1755 (2002).
32. Wiesendanger, M., Kneitz, B., Edelmann, W. & Scharff, M. D. Somatic Hypermutation in Muts Homologue (Msh)3-, Msh6-, and Msh3/Msh6-Deficient Mice Reveals a Role for the Msh2–Msh6 Heterodimer in Modulating the Base Substitution Pattern. *J Exp Med* **191**, 579–584 (2000).
33. Bardwell, P. D. *et al.* Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat. Immunol.* **5**, 224–229 (2004).
34. Roa, S. *et al.* Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16248–16253 (2008).
35. *Saribasak, H. & Gearhart, P. J. Does DNA repair occur during somatic hypermutation? *Semin Immunol* **24**, 287–292 (2012).
36. Kleinstein, S. H., Louzoun, Y. & Shlomchik, M. J. Estimating Hypermutation Rates from Clonal Tree Data. *The Journal of Immunology* **171**, 4639–4649 (2003).
37. Delbos, F. *et al.* Contribution of DNA polymerase eta to immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* **201**, 1191–1196 (2005).
38. *Diaz, M. & Lawrence, C. An update on the role of translesion synthesis DNA polymerases in Ig hypermutation. *Trends Immunol.* **26**, 215–220 (2005).
39. Ao, X. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase selectively catalyzed active DNA demethylation in pluripotency gene and improved cell reprogramming in bovine SCNT embryo. *Cytotechnology* **68**, 2637–2648 (2016).
40. Wijesinghe, P. & Bhagwat, A. S. Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* **40**, 9206–9217 (2012).
41. Abdouni, H. *et al.* Zebrafish AID is capable of deaminating methylated deoxycytidines. *Nucleic Acids Res* **41**, 5457–5468 (2013).
42. Pone, E. J. *et al.* BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway. *Nat Commun* **3**, 767 (2012).
43. Endo, Y. *et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-κB signaling. *Oncogene* **26**, 5587–5595 (2007).
44. *Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, 17023 (2017).
45. Park, S.-R. *et al.* HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat. Immunol.* **10**, 540–550 (2009).
46. Huong, L. T. *et al.* In Vivo Analysis of Aicda Gene Regulation: A Critical Balance between Upstream Enhancers and Intronic Silencers Governs Appropriate Expression. *PLoS One* **8**, (2013).
47. Borchert, G. M., Holton, N. W. & Larson, E. D. Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer* **11**, 347 (2011).
48. *Zan, H. & Casali, P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front Immunol* **6**, (2015).
49. Aoufouchi, S. *et al.* Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1357–1368 (2008).
50. Ito, S. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1975–1980 (2004).

51. McBride, K. M., Barreto, V., Ramiro, A. R., Stavropoulos, P. & Nussenzweig, M. C. Somatic Hypermutation Is Limited by CRM1-dependent Nuclear Export of Activation-induced Deaminase. *J Exp Med* **199**, 1235–1244 (2004).
52. Orthwein, A. *et al.* Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J. Exp. Med.* **207**, 2751–2765 (2010).
53. Methot, S. P. *et al.* Consecutive interactions with HSP90 and eEF1A underlie a functional maturation and storage pathway of AID in the cytoplasm. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 581–596 (2015).
54. Vuong, B. Q. *et al.* Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat Immunol* **10**, 420–426 (2009).
55. *HWANG, J. K., ALT, F. W. & YEAP, L.-S. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* **3**, (2015).
56. Arakawa, H. & Buerstedde, J.-M. Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Dev. Dyn.* **229**, 458–464 (2004).
57. *Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 517–531 (2012).
58. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer genes. *Nature* **499**, 214–218 (2013).
59. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–278 (2012).
60. Iranzo, J., Martincorena, I. & Koonin, E. V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *PNAS* **115**, E6010–E6019 (2018).
61. *Yarchoan, M., Johnson, B. A., Lutz, E. R., Laheru, D. A. & Jaffee, E. M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **17**, 209–222 (2017).
62. *Chan, T. A. *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol* **30**, 44–56 (2019).
63. Wang, S., Jia, M., He, Z. & Liu, X.-S. APOBEC3B and APOBEC mutational signature as potential predictive markers for immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **37**, 3924 (2018).
64. Petljak, M. *et al.* Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell* **176**, 1282–1294.e20 (2019).
65. Seplyarskiy, V. B. *et al.* APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication. *Genome Res* **26**, 174–182 (2016).
66. Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J. & Goodman, M. F. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424**, 103–107 (2003).
67. Meng, F.-L. *et al.* Convergent Transcription at Intragenic Super-Enhancers Targets AID-Initiated Genomic Instability. *Cell* **159**, 1538–1548 (2014).
68. Álvarez-Prado, Á. F. *et al.* A broad atlas of somatic hypermutation allows prediction of activation-induced deaminase targets. *Journal of Experimental Medicine* jem.20171738 (2018). doi:10.1084/jem.20171738
69. Robbiani, D. F. *et al.* AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* **135**, 1028–1038 (2008).
70. Pasqualucci, L. *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341–346 (2001).
71. *Kang, Z.-J. *et al.* The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer* **35**, (2016).
72. Klemm, L. *et al.* The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug-resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **16**, 232–245 (2009).
73. Huemer, M. *et al.* AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86+ chronic lymphocytic leukemia cells. *Eur J Immunol* **44**, 3747–3757 (2014).
74. Palacios, F. *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* **115**, 4488–4496 (2010).
75. Gruber, T. A., Chang, M. S., Sposto, R. & Müschen, M. Activation-induced cytidine deaminase accelerates clonal evolution in BCR-ABL1-driven B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia.

- Cancer Res.* **70**, 7411–7420 (2010).
76. Ishikawa, C., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M. & Mori, N. Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* **32**, 110–119 (2011).
 77. Sawai, Y. *et al.* Activation-Induced Cytidine Deaminase Contributes to Pancreatic Tumorigenesis by Inducing Tumor-Related Gene Mutations. *Cancer Res.* **75**, 3292–3301 (2015).
 78. Nonaka, T. *et al.* Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J Clin Invest* **126**, 1367–1382
 79. Takai, A. *et al.* A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* **28**, 469–478 (2009).
 80. Takaishi, S. & Wang, T. C. Providing AID to p53 mutagenesis. *Nat. Med.* **13**, 404–406 (2007).
 81. Matsumoto, Y. *et al.* Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature Medicine* **13**, 470–476 (2007).
 82. Matsumoto, Y. *et al.* Up-regulation of Activation-Induced Cytidine Deaminase Causes Genetic Aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in Gastric Cancer. *Gastroenterology* **139**, 1984–1994 (2010).
 83. Shimizu, T. *et al.* Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* **147**, 407-417.e3 (2014).
 84. *Jha, H. C., Banerjee, S. & Robertson, E. S. The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis. *Pathogens* **5**, (2016).
 85. Kalchschmidt, J. S. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C directly induces expression of AID and somatic mutations in B cells. *J Exp Med* **213**, 921–928 (2016).
 86. Mohri, T. *et al.* Aberrant expression of AID and AID activators of NF-κB and PAX5 is irrelevant to EBV-associated gastric cancers, but is associated with carcinogenesis in certain EBV-non-associated gastric cancers. *Oncol Lett* **13**, 4133–4140 (2017).
 87. Endo, Y., Marusawa, H. & Chiba, T. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J. Gastroenterol.* **46 Suppl 1**, 6–10 (2011).
 88. Takai, A. *et al.* Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation. *Oncogene* **31**, 1733–1742 (2012).
 89. Matsumoto, T. *et al.* Hepatic inflammation facilitates transcription-associated mutagenesis via AID activity and enhances liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* **36**, 904–913 (2015).
 90. Kou, T. *et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer* **120**, 469–476 (2007).
 91. Komori, J. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* **47**, 888–896 (2008).
 92. Morita, S. *et al.* Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett’s oesophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* **32**, 1706–1712 (2011).
 93. Miyazaki, Y., Inoue, H., Kikuchi, K., Ochiai, K. & Kusama, K. Activation-induced cytidine deaminase mRNA expression in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines is upregulated by inflammatory cytokines. *J Oral Sci* **54**, 71–75 (2012).
 94. Nakanishi, Y. *et al.* Role of Activation-Induced Cytidine Deaminase in the Development of Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* **8**, e62066 (2013).
 95. Miyazaki, Y. *et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Science* **55**, 293–299 (2013).
 96. Okura, R. *et al.* Expression of AID in malignant melanoma with BRAF(V600E) mutation. *Exp. Dermatol.* **23**, 347–348 (2014).
 97. Sanchez, M. I. & Grichnik, J. M. Melanoma’s high C>T mutation rate: is deamination playing a role? *Experimental Dermatology* **23**, 551–552 (2014).
 98. Nonaka, T. *et al.* Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J. Clin. Invest.* **126**, 1367–1382 (2016).
 99. Watabe, R. & Nakamura, M. Expression of activation-induced cytidine deaminase in Merkel cell carcinoma with lymph-node metastasis. *Eur J Dermatol* **23**, 539–540 (2013).
 100. Matsushita, M. *et al.* Higher Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase Is Significantly Associated with Merkel Cell Polyomavirus-negative Merkel Cell Carcinomas. *Yonago Acta Med* **60**, 145–153 (2017).

101. Harms, P. W. *et al.* The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **75**, 3720–3727 (2015).
102. Kitamura, J. *et al.* Chronic Lung Injury by Constitutive Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase Leads to Focal Mucous Cell Metaplasia and Cancer. *PLOS ONE* **10**, e0117986 (2015).
103. Shinmura, K. *et al.* Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 2084–2092 (2011).
104. El Kadi, N. *et al.* The EGFR T790M Mutation Is Acquired through AICDA-Mediated Deamination of 5-Methylcytosine following TKI Treatment in Lung Cancer. *Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3370
105. Qiu, X. *et al.* Human Epithelial Cancers Secrete Immunoglobulin G with Unidentified Specificity to Promote Growth and Survival of Tumor Cells. *Cancer Res* **63**, 6488–6495 (2003).
106. Jiang, C. *et al.* Immunoglobulin G expression in lung cancer and its effects on metastasis. *PLoS ONE* **9**, e97359 (2014).
107. Duan, Z. *et al.* AID expression increased by TNF- α is associated with class switch recombination of Ig α gene in cancers. *Cell Mol Immunol* **13**, 484–491 (2016).
108. Babbage, G., Ottensmeier, C. H., Blaydes, J., Stevenson, F. K. & Sahota, S. S. Immunoglobulin heavy chain locus events and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **66**, 3996–4000 (2006).
109. *Singh, M., Yelle, N., Venugopal, C. & Singh, S. K. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **182**, 80–94 (2018).
110. Muñoz, D. P. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E2977-2986 (2013).
111. Liang, P.-Y. *et al.* Overexpression of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma. *Tumour Biol* **34**, 1783–1791 (2013).
112. Li, H. *et al.* AID modulates carcinogenesis network via DNA demethylation in bladder urothelial cell carcinoma. *Cell Death Dis* **10**, (2019).
113. *Godet, I. & Gilkes, D. M. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther* **4**, (2017).
114. Bartlett, T. E. *et al.* Epigenetic reprogramming of fallopian tube fimbriae in BRCA mutation carriers defines early ovarian cancer evolution. *Nat Commun* **7**, (2016).
115. Fathalla, M. F. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* **2**, 163 (1971).
116. Ambekar, A. S. *et al.* Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics* **87**, 68–77 (2013).
117. Sapoznik, S. *et al.* Activation-Induced Cytidine Deaminase Links Ovulation-Induced Inflammation and Serous Carcinogenesis. *Neoplasia* **18**, 90–99 (2016).
118. Faili, A. *et al.* AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat. Immunol.* **3**, 815–821 (2002).