

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Daniela Frolíková**

Role proteinů APOBEC v karcinogenezi indukované HPV

The role of APOBEC proteins in HPV-induced carcinogenesis

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Šmahelová

Praha, 2022

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, 4.8.2022

Podpis

## Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Janě Šmahelové za trpělivost a cenné připomínky při sepisování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu při studiu.

## Abstrakt

Katalytické polypeptidy podobné enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B (APOBEC) jsou rodina evolučně konzervovaných cytidin deamináz se schopností vazby a modifikace RNA a/nebo ssDNA. APOBEC1-4 zastávají v buňkách řadu funkcí. Zástupci podrodiny APOBEC3 způsobují restrikci cizorodých nukleových kyselin, retrotranspozonů a virů, včetně lidských papilomavirů (HPV), a mohou přispět k vyčištění infekce. Určité HPV jsou označovány jako onkogenní viry, jelikož jsou schopné prostřednictvím onkoproteinů E5, E6 a E7 indukovat imortalizaci a transformaci buněk epitelu. E6 a E7 mohou také navodit transkripci či bránit degradaci některých APOBEC3. Dochází tak k navyšování jejich hladin v buňkách. APOBEC3 působí rovněž jako buněčné mutátory, jelikož mohou během replikace či transkripce katalyzovat deaminace na dočasně vzniklé ssDNA. Deregulace APOBEC3 způsobená onkoproteiny může k mutagenезi přispět. Tato bakalářská práce se zabývá proteiny APOBEC, jejich aktivací a funkcí během HPV indukované karcinogeneze a zejména rozsahem a důsledky APOBEC3 mutací.

**Klíčová slova:** APOBEC, mutagenезe, papilomavirus, onkoproteiny, karcinogeneze

## Abstract

Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide (APOBEC) are a family of evolutionarily conserved cytidine deaminases with the ability to bind and modify RNA and/or ssDNA. APOBEC1-4 have a number of functions in cells. Members of the APOBEC3 subfamily cause restriction of foreign nucleic acids, retrotransposons and viruses, including human papillomaviruses (HPV), and may contribute to the clearance of infection. Certain HPVs are referred to as oncogenic viruses because of their ability to induce immortalization and transformation of epithelial cells via E5, E6 and E7 oncoproteins. E6 and E7 can also induce transcription or inhibit degradation of some APOBEC3. This results in an increase in their levels in cells. APOBEC3 also act as cellular mutators, as they can catalyze deaminations on transiently produced ssDNA during replication or transcription. Deregulation of APOBEC3 caused by oncoproteins may contribute to mutagenesis. This bachelor thesis focuses on APOBEC proteins, their activation and function during HPV-induced carcinogenesis, and in particular the extent and consequences of APOBEC3 mutations.

**Keywords:** APOBEC, mutagenesis, papillomavirus, oncoproteins, carcinogenesis

# Obsah

Použité zkratky .....	iii
1 Úvod .....	1
2 APOBEC cytidin deaminázy .....	2
2.1 Struktura APOBEC3 a funkce cytidin deaminázové domény .....	3
2.2 Regulace exprese APOBEC3 .....	4
2.2.1 Exprese řízená interferony .....	5
2.2.2 Exprese v reakci na genotoxický stres.....	6
2.3 Interakce s RNA viry.....	7
2.4 Interakce s retrotranspozony .....	7
2.5 Interakce s DNA viry .....	8
3 Papilomaviry.....	10
3.1 HPV .....	10
3.1.1 Organizace genomu HPV.....	10
3.1.2 Virové onkoproteiny E5, E6, E7 .....	12
4 Interakce APOBEC3 a HPV.....	13
4.1 Restrikce HPV prostřednictvím APOBEC3 .....	13
4.2 Deregulace APOBEC3 řízená HPV .....	15
4.3 Vliv APOBEC3 na sekvenci HPV .....	16
5 APOBEC3 v karcinogenezi indukované HPV.....	18
5.1 APOBEC3 a progresse nádorové transformace .....	18
5.2 Prognostický význam APOBEC3.....	20
6 Závěr .....	20
7 Použitá literatura.....	22

## Použité zkratky

Zkratka	význam (anglicky)	význam (česky)
AAV	adeno-associated virus	adeno asociovaný virus
AID	activation induced deaminase	aktivací indukovaná cytidin deamináza
ApoB	apolipoprotein B	apolipoprotein B
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide	katalytické polypeptidy podobné enzymu, které upravuje mRNA pro apolipoprotein B
BER	base-excision repair	bázová excizní oprava
BORF2	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	velká podjednotka ribonukleosid-difosfát reduktázy
BS1	superagonistic tetravalent bispecific antibody	tetravalentní bispecifická protilátka
CC	cervical carcinoma	cervikální karcinom
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	cervikální intraepiteliální neoplázie
CccDNA	covalently closed circular DNA	kovalentně uzavřená kruhová DNA
CDA doména	cytidin deaminase domain	cytidin deaminázová doména
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DREAM komplex	dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulvar class B complex	dimerizační partner, RB, E2F a multivulvární třída B
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid	dvouvláknová ribonukleová kyselina
E	early	časný
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epstein-Barrové
EIAV	equine infectious anemia virus	virus infekční anémie koní
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor pro epidermální růstový faktor
HBV	hepatitis B virus	virus hepatididy B
HCMV	human cytomegalovirus	lidský cytomegalovirus
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA I	human leucocyte antigen	hlavní histokompatibilní komplex
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	spinocelulární karcinom hlavy a krku
HPV	human papillomaviruses	lidské papilomaviry
HR HPV	high risk human papillomavirus	vysoce rizikové lidské papilomaviry
HSV-1	herpes simplex virus	virus herpes simplex 1
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
HTLV-1	human T-lymphotropic virus 1	T-lymfotropní virus 1
IFN	interferon	interferon
IFNAR	interferon- $\alpha$ receptor	Interferonový $\alpha$ receptor
JAK kináza	Janus kines	Janusova kináza
L	late	pozdní

LCR	long control region	kontrolní oblast
LINE	long interspersed nuclear elements	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
LR HPV	low risk human papillomaviru	nízce rizikové lidské papilomaviry
LTR	long terminal repeat	dlouhé terminální repetice
LT $\beta$ R	lymphotoxin $\beta$ receptor	lymfotoxinový receptor $\beta$
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein	mitochondriální antivirový signální protein
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B	jaderný faktor $\kappa$ B
MLV	murine leukemia viruses	virus myši leukémie
NGF	nerve growth factor	nervový růstový faktor
OPC	oropharyngeal cancer	karcinom orofaryngu
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PAMP	pathoge-associated molecular patterns	molekulární struktury typické pro patogenní mikroorganismy
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza, katalytická podjednotka alfa
PKC $\alpha$	protein kinase C $\alpha$	protein kináza C $\alpha$
pro-IL-1R	interleukin 1 receptor antagonist	antagonista receptoru pro IL-1
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
PRR	pattern recognition receptors	specifické receptory rozpoznávající patogen
PV	Papillomaviruses	Papilomaviry
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	gen I indukovaný kyselinou retinovou
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
S-fáze	synthesis phase	syntetická fáze
SINE	short interspersed nuclear elements	krátké rozptýlené jaderné elementy
SIV	simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficience
SiV	Sendai virus	Sendai virus
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
ssRNA	single-stranded RNA	jednovláknová ribonukleová kyselina
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TLR	toll-like receptor	receptor podobný proteinu toll
TEAD	TEA domain family member	člen rodiny domén TEA
<i>TP53</i>	tumor protein 53	nádorový protein 53
Vif	viral infectivity factor	virový infekční faktor
YAP	yes-associated protein	protein asociovaný s YES
ZDD	zinc-dependent deaminase sequence motif	na zinku závislý deaminázový sekvenční motiv
ZNF384	zinc-finger 384	zinkový prst 384

# 1 Úvod

APOBEC3 (katalytické polypeptidy podobné enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3) jsou podrodina konzervovaných cytidin deamináz tvořená šesti členy. APOBEC3 katalyzují deaminace cytosinů za vzniku uracilu v RNA a ssDNA substrátech v trinukleotidových 5'-TCN-3' sekvencích (T = thymin, C = cytosin a N = libovolná báze). Pozornost si původně získaly pro svou úlohu ve vrozené imunitě a byly hojně zkoumány například v souvislosti s restrikcí infekce virem HIV-1 či umlčováním retrotranspozice. Zásadní změna v jejich výzkumu nastala se zjištěním, že určité mutace (označované jako mutační znaky 2 a 13) odpovídají mutacím indukovaným APOBEC3 (Roberts et al., 2013). Byly identifikovány v nádorech, v některých případech představovaly až 68 % mutací ve vzorcích.

V současné době má 12-20 % malignit virovou etiologii (shrnuto White et al., 2014). Viry indukující imortalizaci a transformaci jsou označovány jako onkogenní. Patří mezi ně například virus hepatitidy B (HBV), virus Epstein-Barrové (EBV) nebo vysoce rizikové lidské papilomaviry (HR HPV). Tyto viry mají schopnost manipulovat s kontrolními mechanismy buněčného cyklu a unikat imunitnímu dozoru, což společně s dlouhodobou perzistencí přispívá k procesům nádorové transformace buňky.

HPV infikují bazální buňky epitelu a prostřednictvím onkoproteinů E5, E6 a E7 zasahují do výše jmenovaných buněčných dějů. Téměř výhradně jsou HPV spojeny s cervikálními karcinomy (CC), ale také dalšími malignitami v anogenitální oblasti a spinocelulárními karcinomy hlavy a krku (HNSCC) (shrnuto Hareža et al., 2022; Riva et al., 2021). Exprese APOBEC3 je přirozenou reakcí na virovou infekci a jejich hladina je během HPV indukované karcinogeneze zvýšena. Deaminázy ovšem cílí nejen na virus, ale i na buněčný genom, jehož úseky se během replikace či transkripce dočasně vyskytují ve formě ssDNA. Za normálních okolností jsou mutace opraveny mechanismem báze excizní reparace (BER). Hladiny APOBEC3, respektive deamináz APOBEC podrodiny 3A a 3B (A3A, A3B) jsou však dále navyšovány mechanismy realizovanými onkoproteiny E6 a E7. Buněčné reparační mechanismy nemusejí všechny vzniklé mutace opravit, a právě mutace indukované A3A a A3B lze v buněčném genomu zaznamenat nejčastěji.

Tato bakalářská práce se zabývá molekulárními mechanismy aktivace a funkce APOBEC3 v HPV pozitivních karcinomech, ale i vlivem jejich mutagenní aktivity na průběh karcinogeneze či prognózu.



## 2 APOBEC cytidin deaminázy

Katalytické polypeptidy podobné enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide APOBEC) jsou skupina evolučně konzervovaných cytidin deamináz. Většina z nich má schopnost navozovat mutace v RNA a jednovláknové DNA (single strand DNA, ssDNA) deaminací cytosinu za vzniku uracilu (shrnutí Petljak and Maciejowski, 2020). Charakteristickým motivem pro působení APOBEC jsou trinukleotidové 5'-TCN-3' sekvence (T = thymin, C = cytosin a N = libovolná báze). APOBEC zde mohou způsobovat nukleotidové tranzice (substituce cytosinu na thymin) nebo transverze (substituce cytosinu na guanin nebo adenin). Tranzice se odehrávají zejména během replikace, transverze jsou pak důsledkem báze excizní reparace (base-excision repair, BER).

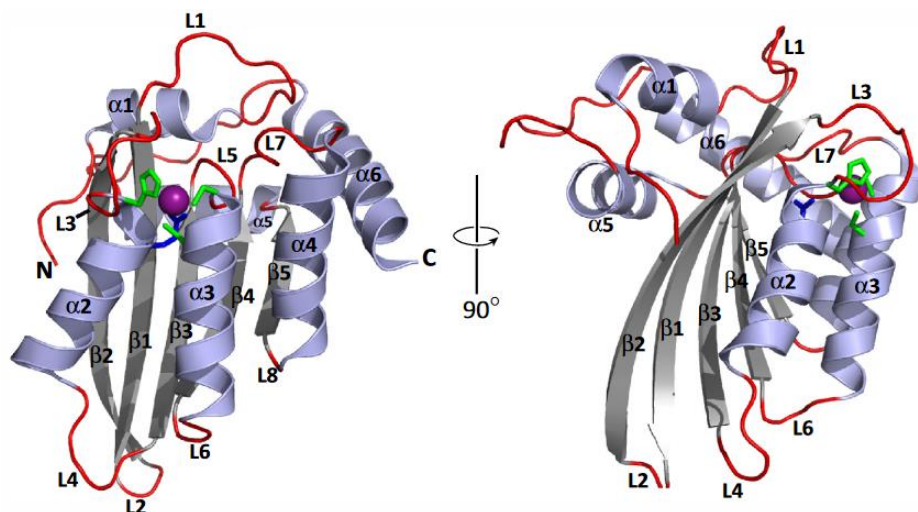
Mezi zástupce rodiny APOBEC patří APOBEC1-4 a aktivací indukovaná cytidin deamináza (activation induced deaminase, AID) (shrnutí Salter et al., 2016; Warren et al., 2017). APOBEC1 byl prvním identifikovaným enzymem a podle jeho funkce je pojmenovaná celá skupina. Edituje cytosin na uracil v mRNA apolipoproteinu B (apoB), díky čemuž vznikají dvě formy proteinu apoB. Deaminační aktivita AID umožňuje hypermutaci a izotypový přesmyk imunoglobulinových genů, díky tomu pak B-lymfocyty produkují obrovské spektrum protilátek. Tento zřejmě evolučně nejpůvodnější APOBEC je tak nepostradatelný pro adaptivní imunitu. Deaminázy APOBEC2 a APOBEC4 jsou nejméně studované vzhledem k nespecifickému fenotypovému projevu jejich exprese. Víme například, že APOBEC4 je schopen zesilovat replikaci viru lidské imunitní nedostatečnosti 1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) a APOBEC2 je zřejmě nezbytný pro vývoj svalové tkáně, nicméně ani u jednoho z nich nebyla prokázána deaminační aktivita.

APOBEC3 je podrodina, která sestává ze členů označovaných A, B, C, D, F, G (A3A, A3B, A3C, A3D, A3F a A3G) hrajících klíčovou roli ve vrozené imunitní odpovědi. Všechny deaminázy APOBEC3 mají schopnost způsobovat restrikci retrotranspozonů, retrovirů a DNA virů zejména skrz tvorbu mutací během virové reverzní transkripce a replikace (shrnutí Maiti et al., 2021). Rozsáhlá data, zejména z poslední dekády, navíc implikují jejich potenciální roli v karcinogenezi. Zdá se, že APOBEC3 mohou způsobovat hypermutace i v buněčném genomu, a to do takové míry, že by bylo možné je považovat, společně s transpozony, za jedny z nejvýznamnějších endogenních mutátorů (shrnutí Petljak and Maciejowski, 2020). Pro APOBEC3 jsou charakteristické kombinace mutací označované jako mutační znaky 2 a 13. Mutační znak 2 vzniká tranzicí a mutační znak 13 transverzí. Oba jsou rozšířené napříč nejrůznějšími druhy nádorů a byly identifikovány jako jedny z nejčastějších u nádorů děložního čípku, hlavy a krku, močového měchýře, plic a jícnu.

## 2.1 Struktura APOBEC3 a funkce cytidin deaminázové domény

Hlavním katalytickým centrem APOBEC3 je na zinku závislý deaminázový sekvenční motiv (zinc-dependent deaminase sequence motif, ZDD) nacházející se v  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  supra sekundární struktuře, jež je součástí vysoce konzervativní cytidin deaminázové domény (cytidin deaminase domain, CDA) (shrnutí Salter et al., 2016).

ZDD obsahuje jeden  $Z^{2+}$  iont koordinovaný s histidinem a cysteinem, které jsou součástí (H/C) – (A/V) – E-X<sub>24-30</sub>–P–C–X<sub>2</sub>–C konsensus sekvence (shrnutí Maiti et al., 2021). Dále je koordinován s molekulami vody, které se nachází v aktivním centru. Jak je vidět na obrázku 1, katalytické centrum obklopují smyčky. Ty jsou specifické pro jednotlivé APOBEC3 a z jejich délky, upořádání a prostorové orientace vyplývá konkrétní funkce a substrátová specifita APOBEC3.

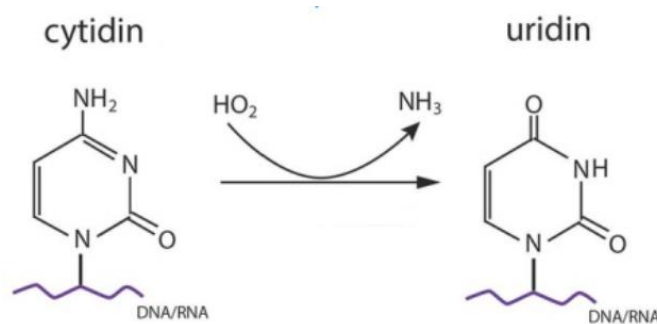


**Obrázek 1:** Model krystalové struktury katalytické cytidin deaminázové domény (cytidin deaminase domain, CDA) v C-terminální oblasti APOBEC3F (A3F, katalytický polypeptid podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3F). CDA doména je tvořena  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  supra sekundární strukturou (modře a šedě) a smyčkami (červeně) variabilními v délce, uspořádání a prostorové orientaci. Na zinku závislý deaminázový sekvenční motiv (zinc-dependent deaminase sequence motif, ZDD) koordinuje histidinem a cysteinem (oba zeleně) iont zinku (fialově). Převzato (Salter et al., 2016)

Dalším společným znakem APOBEC3 je přítomnost CDA katalytické domény na C-konci. A3B, A3D, A3F a A3G disponují ještě N-terminální CDA doménou, která je ovšem pouze pseudokatalytická a není schopná deaminace, má však zachované jednovláknové RNA (single strand RNA, ssRNA) vazebné vlastnosti a v případě A3G váže také DNA (shrnutí Maiti et al., 2021). Interakce domén s ssDNA je řízena přes úzké žlábků na povrchu proteinu, vedoucí až k ZDD. Ve žlábkách se nachází aminokyseliny

s kladně nabitými bazickými nebo aromatickými zbytky, které stabilizují interakci se záporně nabitým substrátem (shrnutí Salter et al., 2016).

Mechanismus deaminace je založen na strukturních studiích bakteriálních a kvasinkových deamináz (shrnutí Siriwardena et al., 2016). Katalytický glutamin deprotonuje molekulu vody, čímž vzniká hydroxidový iont. Ten atakuje  $\text{NH}_2$  skupinu, která je v pozici čtyři na cytosinu. Z nestabilního meziprojektu se uvolňuje  $\text{NH}_3$  molekula a vzniká uracil. Schématické znázornění tohoto procesu je na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Schématické znázornění průběhu deaminace cytosinu na uracil katalyzované APOBEC (katalytické polypeptidy podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B). Převzato a upraveno (Gao et al., 2018)

## 2.2 Regulace exprese APOBEC3

Ancestrální geny pro APOBEC3 prošly mnoha duplikacemi a fúze, v důsledku čehož je tato podskupina napříč obratlovci značně variabilní, a tak se například u hlodavců nebo prasat setkáme pouze s jedním genem, zatímco primáti disponují sedmi, včetně člověka. Geny pro lidské A3 jsou uloženy v genovém klastru na chromozomu 22 a jejich produkty jsou A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G a A3H (shrnutí Salter et al., 2016).

APOBEC3 jsou exprimovány v různých hladinách zejména imunitními buňkami jako jsou  $\text{CD4}^+$  a  $\text{CD8}^+$  T-lymfocyty, B-lymfocyty a buňky myeloidní (shrnutí Covino et al., 2018). Podle lokalizace v buněčných kompartmentech rozlišujeme APOBEC3, které mohou být lokalizovány jak v cytoplazmě, tak v jádře, mezi ty patří A3A, A3C a A3H. Dále se můžeme setkat s výhradně cytoplazmatickými APOBEC3, kterými jsou A3D, A3F a A3G. Zbývající A3B se nachází pouze v jádře. S APOBEC3 se setkáme v některých lymfatických orgánech, jako je například slezina, případně i v tkáních orgánů bez imunitní funkce, jakou jsou například plíce. V poslední řadě mohou být produkovány i neimunitními buňkami, a to například v hepatocytech či keratinocytech. Ve většině jmenovaných buněk jsou APOBEC3 exprimovány trvale, nicméně ke stimulaci exprese APOBEC3 může dojít dvěma na sobě zcela

nezávislými mechanismy, a to prostřednictvím působení interferonů (IFN) nebo v reakci na genotoxický stres (Oh et al., 2021).

### 2.2.1 Exprese řízená interferony

K produkci IFN dochází v reakci na molekulární struktury typické pro patogenní mikroorganismy (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), které jsou rozpoznávány prostřednictvím specifických patogen rozpoznávajících receptorů (pattern recognition receptors, PRR) (shrnutí Covino et al., 2018). PRR nezbytné pro detekci virové infekce jsou například TLR (toll-like receptor), RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) receptory nebo cytoplasmatické senzory virové DNA

Následné signální dráhy vedoucí k aktivaci exprese jednotlivých APOBEC3 jsou realizovány prostřednictvím IFN typu I (shrnutí Covino et al., 2018). V případě A3B se tak děje v reakci na kovalentně uzavřenou cirkulární DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) viru hepatitidy B (hepatitis B virus, HBV) prostřednictvím jaderného faktoru  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) a následné aktivace protein kinázy C  $\alpha$  (protein kinase C  $\alpha$ , PKC $\alpha$ ) (Faure-Dupuy et al., 2021). Nedávná studie demonstrovala expresi A3A indukovanou virem Sendai (SiV), jak je znázorněno na obrázku 3 (Oh et al., 2021). PRR RIG-I byly v buněčné kultuře schopny samostatně detekovat krátké dsRNA molekuly, čímž aktivovaly MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) a v konečném důsledku došlo k expresi IFN. IFN se následně vázaly na příslušné receptory a aktivovaly tak JAK kinázy (Janus kinas), jež fosforylovaly transkripční faktory a došlo k aktivaci exprese IFN stimulovaných genů včetně *APOBEC3*.

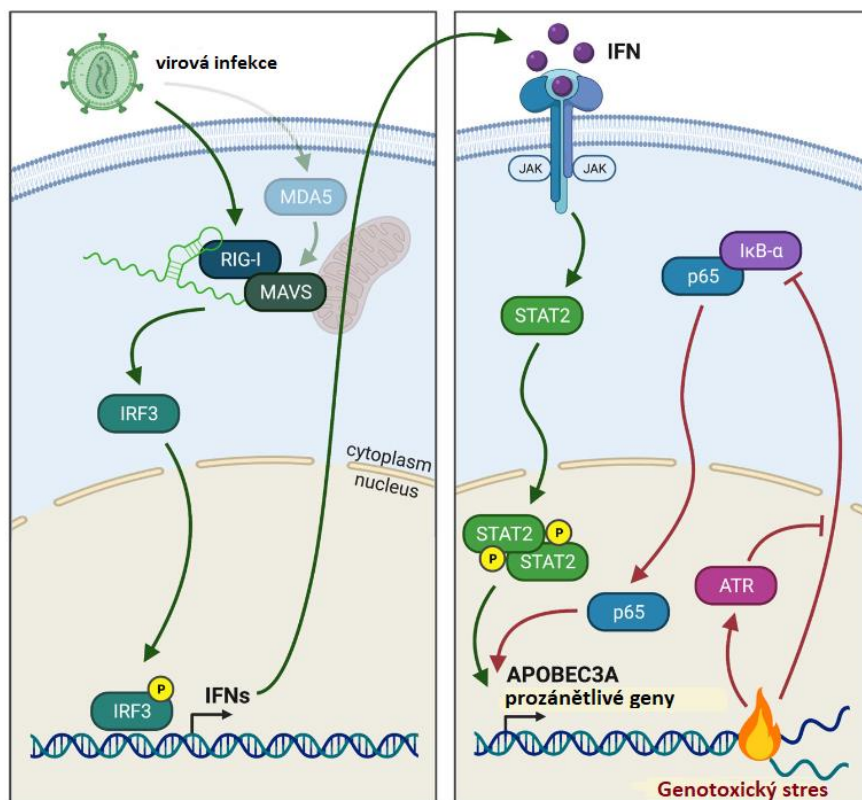
IFN řízená exprese APOBEC3 v různých buněčných typech byla studována zejména v souvislosti s infekcí virem HIV-1. Během ní dochází k IFN- $\alpha$  stimulované expresi A3A, A3F a A3G v dendritických buňkách, makrofázích a naivních CD4+ T-lymfocytech či IFN- $\gamma$  aktivované expresi A3G a A3F v endoteliálních buňkách hematoencefalické bariéry, což zabraňuje průniku infekce do mozku (shrnutí Siriwardena et al., 2016). Při studiu potenciální aktivity APOBEC3 během infekce lidským papilomavirem (human papillomavirus, HPV) bylo zjištěno, že keratinocytová buněčná linie infikovaná HPV16 v epizomální formě vykazovala po aplikaci IFN- $\beta$  zvýšené hladiny A3A, A3F a A3G a známky pro APOBEC3 charakteristické hypermutace ve virovém genomu (Wang et al., 2014). Významné navýšení produkce APOBEC3, respektive A3G, nastalo v buněčné kultuře normálních lidských hepatocytů, ke kterým byl aplikován IFN- $\alpha$ , který je jinak považován za hlavní cytokin při obraně buněk před infekcí virem HBV (Tanaka et al., 2006).

APOBEC3 nejsou pouze aktivovány. Na základě poznatku, že redukce nervového růstového faktoru (nerve growth factor, NGF) v HIV-1 infikovaných lidských makrofázích *in vitro* vede k snížení produkce nových virů buňkou, byl dále zkoumán vliv tohoto růstového faktoru (Souza et al., 2011). Bylo zjištěno, že jsou-li primární makrofágy infikované HIV-1 vystavené NGF, dochází v buněčné kultuře ke snížení množství A3G nejen na translační, ale i na transkripční úrovni.

## 2.2.2 Exprese v reakci na genotoxický stres

Genotoxický stres v buňce nastává v reakci na poškození DNA, jakým je například vznik dvouvláknových zlomů či replikační stres vznikající v důsledku kolapsu replikační vidličky. Tyto děje vedou k expresi A3A, a to zcela nezávisle na signalizaci prostřednictvím IFN (Oh et al., 2021).

Po vystavení buněčné kultury hydroxyuree – cytostatiku, které má letální vliv na replikující se buňky byly zjištěny vysoké hladiny mRNA A3A (Oh et al., 2021). Zároveň nastala rychlá redukce A3A transkriptů po přesunu buněk do prostředí bez stresoru. Signální dráha vedoucí k aktivaci produkce A3A probíhá přes jaderný transkripční faktor NF- $\kappa$ B, respektive jeho podjednotku p65, jak je ilustrováno na obrázku 3. p65 je v nestresovaných buňkách lokalizována v cytoplasmě, avšak při vystavení buňky genotoxickému stresu se relokuluje do jádra a váže se do oblasti zahájení transkripce genu A3A.



**Obrázek 3:** Schéma znázorňuje regulaci exprese APOBEC3A (A3A, katalytický polypeptid podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3A) v reakci na invazi buňky virem a genotoxický stres. Receptor RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) detekuje krátké dsRNA molekuly, čímž aktivuje MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein), což vede k expresi interferonů (IFN). IFN aktivují dráhu JAK/STAT2 (Janus kinas/signal transducer and activator of transcription 2) a je zahájena exprese A3A. Nezávisle na IFN, v reakci na buněčný stres, se může podjednotka p65 relokalizovat do jádra a navázat se na jaderný faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), což opět vede k transkripci mRNA A3A. Převzato a upraveno (Oh et al., 2021).

## 2.3 Interakce s RNA viry

Nejvíce studovaným APOBEC3 je A3G. Zejména jeho působení při infekci virem HIV-1 je stále zkoumáno pro svůj potenciál v protivirové léčbě. Bylo zjištěno, že produkuje-li virus pouze malé množství virového infekčního faktoru (viral infectivity factor, Vif), stávají se jím infikované T-lymfocyty v *in vitro* podmínkách nepermissivní a nedochází k jeho dalšímu šíření (Sheehy et al., 2002). Při nedostatečné expresi proteinu Vif je A3G enkapsidován do virionu HIV-1 a způsobuje deaminaci cytosinů minus vlákna provirové komplementární DNA (complementary DNA, cDNA) v průběhu reverzní transkripce (Mangeat et al., 2003). To následně vede k tranzici guaninu na adenin na plus vlákně, dochází k hypermutacím virového genomu a virion se stává neinfekční. (Mangeat et al., 2003). Je-li ovšem Vif produkován v dostatečném množství, aktivuje na ubikvitinu závislou degradaci A3G v proteazomech a obranný mechanismus buňky je tak nefunkční (Conticello et al., 2003).

A3F také způsobuje restrikce HIV-1 a je funkčně téměř stejný jako A3G, liší se v preferenci sekvenčních motivů, ve kterých způsobuje deaminace (Liddament et al., 2004). Ze sedmi lidských APOBEC3 deamináz působí proti HIV-1 ještě A3D a A3H. To prokázala studie z roku 2011 zabývající se restrikční aktivitou všech sedmi lidských APOBEC3 a také APOBEC3 Makaka rhesus (Hultquist et al., 2011), který je v současné době nejčastějším *in vivo* zvířecím modelem pro testování nových antivirotik proti HIV. V buněčných kulturách CD4+ T-lymfocytů infikovaných HIV-1 deficientním na Vif protein byla zaznamenána protivirová aktivita všech výše zmíněných APOBEC3 jak u člověka, tak u makaků. U makaků byly navíc všechny zmíněné APOBEC3 degradovány Vif proteinem viru SIV (Simian immunodeficiency virus), což by mohlo nasvědčovat tomu, že restrikce všech lentivirů probíhá podobným mechanismem (Hultquist et al., 2011).

Dalšími RNA viry, u nichž byla studována interakce s APOBEC3, jsou například lidský T-lymfotropní virus 1 (HTLV-1), virus infekční anémie koní (EIAV) a virus myší leukémie (MLV). U všech jmenovaných virů byla pozorována interakce s A3G, která vedla k jejich restrikci (shrnutí Siriwardena et al., 2016).

APOBEC3 obranný mechanismus nemusí nutně spočívat pouze v tvorbě hypermutací (shrnutí Siriwardena et al., 2016). Virová restrikce se též odehrává nezávisle na CDA doméně, a to prostřednictvím přímého blokování průběhu reverzní transkripce vazbou APOBEC3 na virovou RNA.

## 2.4 Interakce s retrotranspozony

Retrotranspozony jsou typem mobilních genetických elementů, tedy úseků DNA se schopností se přemísťovat po genomu mechanismem velmi podobným virové reverzní transkripci. Jejich pohyb ovšem může vést ke vzniku mutací, a tak si buňky vytvořily obranné strategie před jejich nadměrným šířením. Rozlišujeme retrotranspozony s dlouhými terminálními repetitivy (long terminal repeat, LTR)

a bez LTR, které jsou dále děleny na dlouhé rozptýlené jaderné elementy (long interspersed nuclear elements, LINE) a krátké rozptýlené jaderné elementy (short interspersed nuclear elements, SINE).

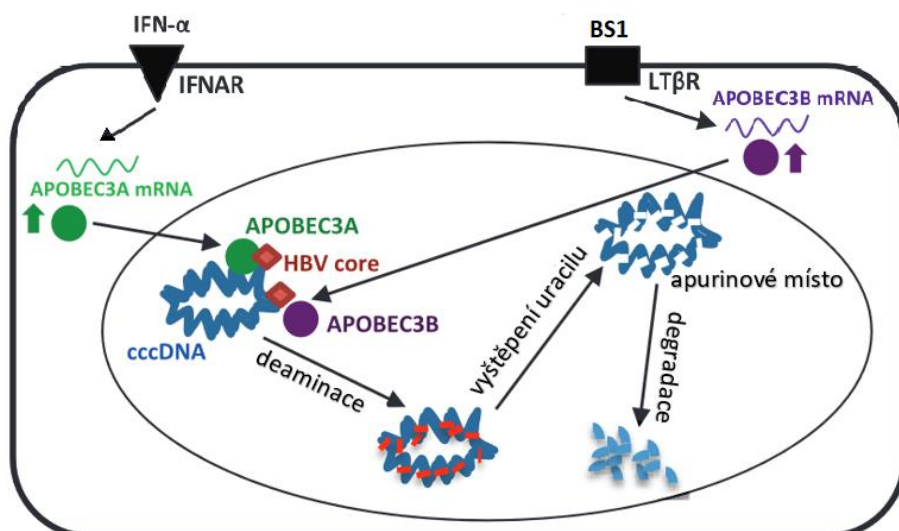
Retrotranspozice LINE-1, které patří mezi nejrozšířenější typ retrotranspozonů v lidském genomu, a Alu elementů je významným způsobem potlačena působením A3A, A3B, A3C a A3F (Muckenfuss et al., 2006). V případě A3A se tak děje prostřednictvím deaminace cytosinů v ssDNA, která přechodně vzniká během procesu integrace mobilního elementu, což bylo otestováno v *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Richardson et al., 2014). Původní domněnka, že A3H nehraje v obraně před retrotranspozicí LINE-1 žádnou roli byla vyvrácena studií, která prokázala, že A3H potlačují jejich replikaci v buněčné kultuře na deaminaci nezávislým mechanismem (Feng et al., 2017). A3D nemá významný vliv na LINE-1, nicméně A3D společně s šimpanzím A3D silně inhibují Alu elementy a myši LTR retrotranspozony MusD (Duggal et al., 2011).

Působení A3G proti LINE-1 bylo dlouhou dobu předmětem diskusí z důvodu rozporuplných výsledků. Některé studie popisovaly jeho působení mechanismem nezávislým na deaminaci, jiné jeho vliv zcela vyvracely. Evaluace působení A3A, A3H a A3G dospěla k závěru, že exprese A3G v buněčné kultuře má na retrotranspozici minimální vliv (Feng et al., 2017)

## 2.5 Interakce s DNA viry

Mezi DNA viry, jejichž restrikci APOBEC3 navozují, patří například adeno asociovaný virus (AAV), virus HBV, HPV a řady herpesvirů včetně například viru Epstein-Barrové (EBV), viru herpes simplex 1 (HSV-1) či lidského cytomegaloviru (HCMV) (shrnuto Siriwardena et al 2016). Je známo, že APOBEC jsou schopny vázat pouze ssDNA substráty, nikoli dsDNA, nicméně výskyt ssDNA není v buňkách příliš častý. Z toho důvodu převládá zatím ne zcela potvrzená domněnka, že dsDNA viry podléhají APOBEC3 zprostředkované deaminaci cytosinu v průběhu replikace nebo transkripce, kdy vznikají přechodné ssDNA intermediáty (Warren et al., 2017).

Výzkum prokázal, že lidské jaterní buňky jsou *in vitro* schopny exprimovat čtyři APOBEC proteiny (Bonvin et al., 2006). V buněčné kultuře kultivované s IFN- $\alpha$  byl zaznamenán nárůst koncentrace mRNA A3B, A3C, A3G a A3H. Později bylo zjištěno, že *in vitro* exprese A3A a A3B v lidských hepatocytech vede k deaminaci cytosinů v cccDNA HBV, vznikají apurinová místa, která jsou detekována buněčnými endonukleázami a dochází k degradaci virového genomu (obrázek 4) (Lucifora et al., 2014). Interakce mezi APOBEC3 a cccDNA je navíc nepřímá a probíhá tak, že se APOBEC3 váží na virové core proteiny, které se v buněčném jádře váží na cccDNA viru.



**Obrázek 4** Obrázek znázorňuje schéma mechanismu degradace kovalentně uzavřené cirkulární molekuly DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) viru hepatitidy B (HBV) realizované APOBEC3A (A3A, katalytický polypeptid podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3A) a A3B. Aktivita A3A je indukována interakcí interferonu  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) s interferonovým  $\alpha$  receptorem (IFNAR). Aktivita A3B je indukována interakcí BS1 (superagonistic tetraivalent bispecific antibody) s LT $\beta$ R receptorem (lymphotoxin  $\beta$  receptor). Díky interakci A3A a A3B s core proteinem HBV probíhá deaminace cytosinu ve virovém genomu a dochází k excizi uracilu. Po rozpoznání vzniklých apurinových míst je degradován virový genom. Převzato a upraveno (Lucifora et al., 2014).

Stejně jako některé retroviry i DNA viry jsou schopné bránit se APOBEC3 indukované hypermutaci genomu, v případě viru EBV pak mechanismem nezávislým na degradaci. V buněčné kultuře HEK293T infikované EBV byl pozorováno, že deamináza A3B je navázána na virovou ribonukleotidreduktázu BORF2 (ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit 2) a relokalizována do cytoplazmy. Obranná funkce BORF2 byla ještě ověřena v buňkách infikovaných EBV s inaktivním BORF2. Za takovýchto okolností bylo ve virovém genomu možné detektovat hypermutace, které jsou důsledkem aktivity A3B. Analogicky se odehrává interakce ribonukleotidreduktázy ORF61 a viru Kaposiho sarkomu A3B (Cheng et al., 2019). Obranným mechanismem relokalizace APOBEC disponuje také HSV-1, jež váže A3A a A3B (převzato Xu et al., 2020). V případě deaktivace ribonukleotidreduktázy nicméně nedošlo ke změně infekčnosti viru, což naznačuje, že virus disponuje ještě dalším obranným mechanismem, který umožňuje jeho zachování v buňce.

Mechanismy restrikce virů HPV budou podrobně rozebrány v kapitole 4.



## 3 Papilomaviry

Papilomaviry (PV) jsou DNA viry čeledi *Papillomaviridae*, které jsou společně s adenoviry a polyomaviry označovány jako malé nádorové viry, jelikož jejich infekce může vést ke vzniku benigního bujení a malignit. Jedná se o neobalené viry s ikosahedrání kapsidou o průměru kolem 55 nm. PV jsou vysoce druhově specifické a infikují buňky epitelu, tj. kůže a sliznice širokého spektra vyšších obratlovců včetně člověka. Jejich životní cyklus je závislý na diferenciaci těchto epitelů. Klasifikace papilomavirů je prováděna podle stupně homologie sekvence genu *L1* pro kapsidový protein (shrnutí Araldi et al., 2018).

V současné době rozlišujeme přes dvě stě typů HPV, nicméně většina jich není patogenních (shrnutí Graham, 2017). Infekce často probíhá bezpříznakově nebo se projevuje ve formě benigních kožních a slizničních papilomů a produktivních lézí, jako jsou například kožní bradavice *Veruca plana* (HPV 1, 2, 3, 4) anebo genitální bradavice *Condyloma acuminatum* (HPV 6, 11). Jmenované HPV jsou označovány jako nízké rizikové (LR HPV). Druhou skupinou jsou pak vysoce rizikové (HR) HPV s onkogenním potenciálem. Mezi HR HPV patří například HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, které se mohou podílet na rozvoji prekancerózních stádií a karcinomů cervixu, vulvy, vagíny, penisu a konečníku, ale i části malignit hlavy a krku – především oropharyngu, hrtanu a dýchacích cest (Kombe Kombe et al., 2021). HPV se šíří především sexuálním stykem a v současné době se jedná o jednu z nejčastějších sexuálně přenosných infekcí (Chesson et al., 2014). Nicméně jejich přenos je dále možný přímým kontaktem infikované pokožky, případně kontaktem s kontaminovanými povrchy.

### 3.1 HPV

#### 3.1.1 Organizace genomu HPV

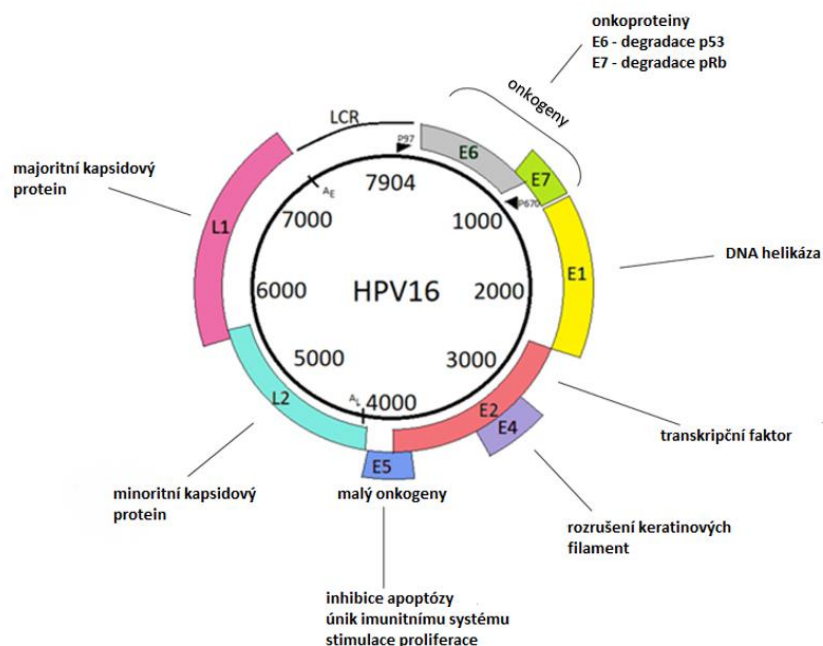
Genom HPV je tvořen dvouvláknovou, cirkulární molekulou DNA, která se váže na buněčné histony a je organizována do struktury minichromozomu (shrnutí Araldi et al., 2018). Všechny čtecí rámce se nacházejí pouze na jednom řetězci a některé se překrývají, čímž je navýšena kódující kapacita virového genomu. Má velikost přibližně 8 000 bp a lze ho rozdělit do tří oblastí: časně (E-oblast), jejíž produkty jsou exprimovány v časně fázi virové infekce, pozdní (L-oblast) s expresí proteinů kapsidy v pozdní fázi infekce a dlouhé kontrolní oblasti (long control region, LCR), která odděluje E a L oblast (shrnutí Graham, 2017) (organizace podrobněji obrázek 4).

LCR neobsahuje žádné geny. Jedná se o netranskribovanou oblast s regulačními sekvencemi, ze které je zahajována replikace a transkripce. Časná oblast sestává z genů E1, E2, E5, E6, E7 exprimovaných z časněho promotoru P<sub>97</sub> lokalizovaného v LCR. Virový protein E4 vzniká v pozdních fázích infekce translací sestřihového produktu E1-E4. E proteiny jsou nezbytné pro replikaci a

transkripci virového genomu, dále pro narušení regulace buněčného cyklu a uvolňování viru z terminálně diferenciováných keratinocytů. E1 je vysoce konzervativní virová DNA-helikáza, mezi jejíž funkce patří nejen iniciace virové replikace, ale i ustanovení replikačního komplexu a má tedy vliv na proces elongace virové DNA. E2 protein zesiluje vazbu E1 do replikačního počátku a společně formují replikační iniciační komplex. Nicméně kromě replikace se dále uplatňuje během virové transkripce, kde má funkci aktivátoru a represoru (shrnuto Haręža et al., 2022). Následně probíhá exprese onkoproteinů E5, E6 a E7, jejichž funkce budou podrobněji rozebrány v následující kapitole.

Produkty L oblasti jsou majoritní a minoritní kapsidový protein L1 a L2. Jsou exprimovány z pozdního promotoru P<sub>670</sub> a tvoří ikosahedrální kapsidu, do které je zabalen virový genom. Jejich produkce je nezbytná pro dokončení životního cyklu viru (shrnuto Doorbar et al., 2012).

Protein E4 je produkován, společně s kapsidovými proteiny, až v pozdních fázích, kdy může způsobit zastavení buněčného cyklu v G2 fázi a rozrušení keratinových filament (shrnuto Graham, 2017). Tím zřejmě napomáhá uvolňování viru z buněk a hraje roli v jeho dalším šíření.



**Obrázek 4:** Schéma genomu lidského papilomaviru 16 (HPV16) o velikosti necelých 8 000 bp. Časná oblast (E-oblast) sestává z genů pro E1, E2, E5, E6, E7 a oblast pozdní (L-oblast) z genů pro L1 a L2. Dlouhá kontrolní oblast (LCR) s promotorem P<sub>97</sub> se nachází mezi genem pro velký kapsidový protein L1 a genem pro onkoprotein E6. Ze schématu je patrné překrývání kódujících oblastí, čímž virus navyšuje svojí kódující kapacitu. Převzato a upraveno (Haręža et al., 2022).

### 3.1.2 Virové onkoproteiny E5, E6, E7

Trojice proteinů E5, E6 a E7 ze skupiny produktů časných genů je označována jako virové onkoproteiny (shrnutí Haręza et al., 2022). Proteiny získaly toto označení díky skutečnosti, že narušují regulaci buněčného cyklu, způsobují degradaci produktů nádorových supresorových genů a v případě HR HPV typů indukují konstitutivní proliferaci již diferenciovaných buněk. Jejich společné působení vede k imortalizaci epiteliálních buněk, což je jeden z klíčových kroků v nádorové transformaci.

Nejdůležitější a nejvíce zkoumanou funkcí E6 je jednoznačně jeho schopnost řídit degradaci p53 (shrnutí Graham, 2017). Protein p53 je produktem nádorového supresorového genu *TP53* (tumor protein 53) a funguje jako transkripční faktor. Za normálních okolností je p53 inaktivní. Je-li zaznamenáno poškození buňky nebo virová infekce, dochází k jeho aktivaci a následné stimulaci tvorby proteinu p21 – inhibitoru cyklin-dependentních kináz. To vede k udržování buňky v G1 fázi buněčného cyklu nebo navození apoptózy, což je ovšem pro virus nežádoucí, protože pro dokončení životního cyklu potřebuje buňky s aktivním replikačním aparátem. Virový protein E6 tak vytvoří komplex s ubikvitinovou ligázou E6AP a navozuje degradaci p53 v proteazomu.

Virový onkoprotein E7 má schopnost vázat retinoblastomový protein (pRb) a jemu funkčně příbuzné p107 a p130. pRb je nádorový supresorový protein, který je v případě zaznamenaného poškození DNA defosforylován, což umožňuje jeho vazbu na E2F transkripční faktory a zastavení transkripce (shrnutí Doorbar et al., 2012). Nejsou tak exprimovány geny nutné pro zahájení S fáze buněčného cyklu, kdy je replikována DNA. Vazbou virového onkoproteinu E7 na pRb dochází k narušení komplexu s E2F, cyklus není zastaven a pRb je ubikvitinován a degradován v proteazomu (Haręza et al., 2022). To je zaznamenáno buňkou a v rámci obranných mechanismů dochází k aktivaci p53, který je ovšem inaktivován E6, jak je již výše popsáno. Tímto způsobem E6 a E7 kooperují a brání terminální diferenciaci keratinocytů. Buňky opakovaně vstupují do buněčného cyklu, aniž by u nich byla indukována apoptóza (shrnutí Graham, 2017). Působení obou onkoproteinů také vede k aktivaci promotoru lidské telomerázové reverzní transkriptázy (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) (shrnutí Haręza et al., 2022), což je katalytická podjednotka telomerázy. Telomeráza patří mezi reverzní transkriptázy a svou aktivitou umožňuje prodlužování koncových oblastí chromozomů – telomer (shrnutí Graham, 2017). Udržování stabilní délky telomer je nezbytné pro imortalizaci buněk.

Virový protein E5 podporuje signalizaci receptoru pro epidermální růstové faktory (epidermal growth factor receptor, EGFR), což vede ke stimulaci buněčné proliferace (shrnutí Doorbar et al., 2012). Dále má schopnost negativně ovlivňovat indukci apoptózy, takže buňka není schopna reagovat na aberantní proliferaci (shrnutí Haręza et al., 2022). Asociací s Golgiho aparátem brání antigenní prezentaci pomocí HLA (human leukocyte antigen) I. třídy, takže napadané buňky unikají dozoru imunitního systému a může docházet k dlouhodobé perzistenci virové infekce (shrnutí Graham, 2017).

## 4 Interakce APOBEC3 a HPV

HPV pronikají do kůže či sliznice prostřednictvím drobných poranění a infikují dělicí se bazální buňky epitelu. Následně dochází k jejich rozpoznání PRR jako například TLR a pro-IL-1R a buněčná signalizace vede k produkci IFN a chemokinů (shrnutí Covino et al., 2018). Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2 „Regulace exprese APOBEC3“, právě cytokiny aktivují další sled signálních kaskád, které aktivují transkripci genů stimulovaných interferony, včetně podrodiny deamináz APOBEC3.

### 4.1 Restrikce HPV prostřednictvím APOBEC3

V souvislosti s HPV infekcí byla studována aktivita několika APOBEC3. Zdá se ovšem, že nejvýznamnějším činitelem v restrikci těchto virů, a DNA virů vůbec, je A3A. A3A deamináza váže ssDNA s vysokou afinitou a způsobuje potlačení virové infekce mechanismem závislým na deaminaci (Warren et al., 2017). Na tuto skutečnost poukázala například dříve zmíněná studie zabývající se aktivitou APOBEC3 během infekce HPV po aplikaci IFN- $\beta$  (kapitola 2.2.1 (Wang et al., 2014)). Dále byla zásadní role A3A v restrikci HPV demonstrována na buněčné kultuře nadprodukcující A3A, A3B a A3C. Po infekci buněk viriony HPV16 pouze A3A deaminoval virový genom a zamezoval tak produkci šíření dalších virionů (Warren et al., 2015).

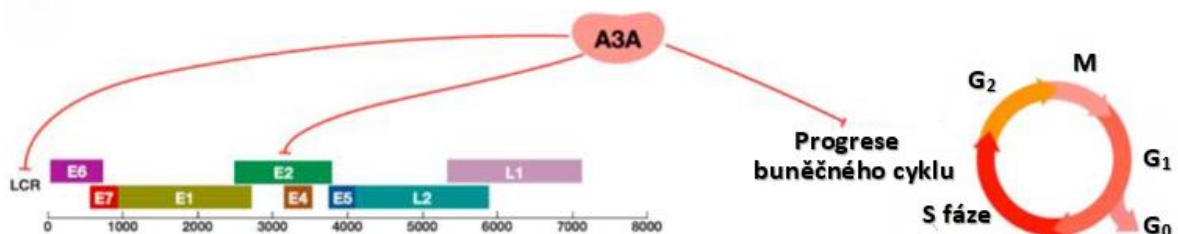
Sekvence genomů HPV1a izolovaných z kožních bradavic a HPV16 z biopsie prekancerózní cervikální léze byla prvním důkazem schopnosti APOBEC3 editovat genom HPV *in vivo* (Vartanian et al., 2008). Tato studie, provedená na základě předchozích pozorování exprese APOBEC3 v kožních buňkách a keratinocytech, také ověřila funkci APOBEC3 v *in vitro* podmínkách. Sekvence virové DNA, kterou byla infikována buněčná kultura, odhalila hypermutaci obou virových vláken.

APOBEC3 deaminázy cílí svou mutační aktivitu na celý genom HPV, nicméně určité oblasti jsou k mutagenезi náchylnější. V návaznosti na studii, která ve specifických oblastech genomu HPV16 izolovaném z cytologických vzorků cervikálních intraepiteliálních neoplázií (CIN) identifikovala APOBEC3 mutace, byla provedena sekvenační analýza DNA HPV16 z biopsií karcinomu oropharyngu (oropharyngeal cancer, OPC) (Wang et al., 2014). V obou případech byly v genu *E2* a oblasti LCR detekovány mutace typické pro APOBEC3 (obrázek 5) (Kondo et al., 2017; Wang et al., 2014). Možnou příčinou tohoto pozorování je v případě LCR skutečnost, že se v této oblasti nachází replikační počátek a časný promotor P<sub>97</sub>. Tento úsek virového genomu se tedy častěji vyskytuje ve formě ssDNA a je potenciálně více přístupný pro vazbu APOBEC3. Tuto domněnku nepřímo potvrdila sekvenační analýza virových DNA izolovaných z cytologických vzorků CIN stupně 1–3 a cervikálního karcinomu (cervical carcinoma, CC). Nejvyšší frekvence substitucí cytosinu na thymin byla zaznamenána v CIN1 lézích, ve kterých se odehrává produktivní virová replikace a transkripce (Hirose et al., 2018), během které se

virový genom častěji vyskytuje ve formě ssDNA, na kterou se APOBEC3 může vázat. V současné době není zcela jasné, zda APOBEC3 preferenčně mutují jedno z virových vláken. Obecně je za jejich hlavní cíl považováno mínus vlákno, na kterém bývají mutace nejčastěji detekovány (Wang et al., 2014). Nicméně výše zmíněná sekvenční analýza genomů HPV ani sekvence DNA HPV16 z cervikálních biopsií provedená v jiné studii nezaznamenala rozdíly v mutační frekvenci na plus a mínus vlákne (Hirose et al., 2018; Zhu et al., 2020).

Překvapivé zjištění přinesla studie zabývající se vlivem APOBEC3 na skládání pseudovirionů HPV16 *in vitro*. Podle ní by ke snížení infekčnosti HPV mohlo docházet i mechanismem nezávislým na deaminaci. Bylo zjištěno, že A3C oslabuje infekčnost pseudovirionů a také efektivně váže majoritní kapsidový protein L1 (Ahasan et al., 2015). Předpokládá se, že právě prostřednictvím L1 vstupuje vir do buněk, a to vazbou na primární buněčný receptor, kterým je heparan sulfátový proteoglykan (shrnuto Araldi et al., 2018). Autoři spekulují, že by vazba A3C na L1 mohla mít vliv na průnik HPV do buněk.

APOBEC3 nemusí bránit šíření HPV pouze přímou interakcí s nimi. Jejich aktivita může také narušovat progresi buněčného cyklu indukovanou HPV (obrázek 5). V *in vitro* dělicích se buňkách vedla exprese A3A k aktivaci odpovědi na poškození DNA a zástavě buněčného cyklu v G1/S, případně v G2/M fázi (Green et al., 2016; Landry et al., 2011). Během replikace DNA dochází k rozvolnění vláken do replikačních vidliček a dočasněmu vzniku substrátu pro APOBEC3. Odpověď na poškození byla tudíž aktivována zřejmě v reakci na APOBEC3 katalyzovanou deaminaci cytosinů v buněčném genomu.



**Obrázek 5** Restrikce lidských papilomavirů prostřednictvím působení APOBEC3A (A3A, katalytický polypeptid podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3A). A3A způsobuje tvorbu mutací ve virovém genomu, zejména v dlouhé kontrolní oblasti (LCR) a časném genu E2. Zároveň exprese A3A v infikovaných buňkách vede k zástavě buněčného cyklu. Převzato a upraveno (Riva et al., 2021)

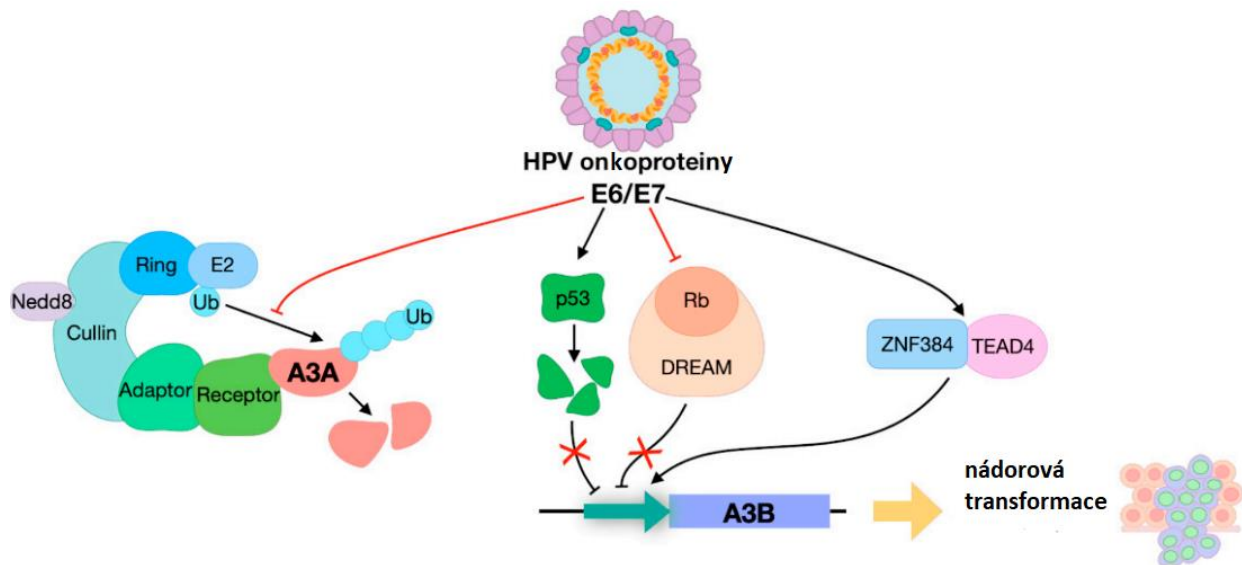
## 4.2 Deregulace APOBEC3 řízená HPV

APOBEC3 mohou v buňkách zastávat protichůdné role. Jednak zajišťují restrikcí virových infekcí, zároveň však APOBEC3 deregulované viry působí jako buněčné mutátory. HPV modulují expresi APOBEC3 prostřednictvím onkoproteinů E6 a E7 (Warren et al., 2015). V imortalizovaných keratinocytech infikovaných HPV16 s kompletním genomem došlo k výrazně vyšší produkci A3A a A3B než v případě infekce HPV16 bez genu *E7*. Mechanismus, kterým onkoproteiny E7 navyšují hladinu deaminázy A3A, byl popsán o několik let později. E7 brání polyubikvitinaci A3A prostřednictvím cullin-RING E3 ubikvitin ligázy (Westrich et al., 2018). Deamináza tak nemůže být degradována v proteazomech a navíc zůstala i nadále katalyticky aktivní, což představuje potenciální nebezpečí pro buněčný genom.

Přesto, že deamináza A3B byla detekována v HPV pozitivních neopláziích cervixu myši či spinocelulárním karcinomu hlavy a krku lidí (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC), v současné době nebylo prokázáno, že by významně působila v restrikcí viru (Henderson et al., 2014; Warren et al., 2015). Její zvýšená hladina by mohla být důsledkem modulace její transkripce virovými onkoproteiny E6 a E7 (Mori et al., 2015; Mori et al., 2017). V promotoru deaminázy A3B lze rozlišit distální (-200/-50) a proximální (+1/+45) funkční oblast (Mori et al., 2015). Distální oblast se podílí na bazální transkripci, proximální na inhibici. Obě obsahují sekvenci, do které se může vázat virový protein E6 a aktivovat tak transkripci. Proximální oblast obsahuje sekvenci pro vazbu buněčného transkripčního faktoru ZNF384 (zinc-finger384). Studie prokázala, že E6 je v buněčné kultuře imortalizovaných lidských keratinocytů schopen aktivace transkripce mRNA A3B v proximálním promotoru pouze tehdy, je-li současně navázán také ZNF384. Dále bylo zjištěno, že transkripce deaminázy A3B je řízená prostřednictvím transkripčních faktorů rodiny TEAD (TEA domain family member), které jsou nepřímo aktivovány onkoproteinem E6 (Mori et al., 2017). Nejdříve byly v proximální a distální části promotoru A3B identifikovány tři oblast obsahující vazebné místo pro TEAD. Dále byla *in vivo* potvrzena schopnost TEAD4 vázat se do promotoru A3B. Nakonec byl v buněčné kultuře s nadprodukcí YAP (yes-associated protein) transkripčního koaktivátoru zaznamenán nárůst hladin TEAD4. Na základě těchto pozorování a předchozích studií popisujících expresi YAP indukovanou E6, autoři dospěli k závěru, že E6 prostřednictvím YAP řídí expresi TEAD, které aktivují transkripci A3B.

Transkripci deaminázy A3B umlčuje represorový komplex DREAM (dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulvar class B), jehož aktivita je řízena inhibítoem cyklin-dependentních kináz p21 (Periyasamy et al., 2017). Jak bylo popsáno v kapitole 3.1.2, aktivita p21 závisí na p53 (shrnuto Graham, 2017). Pokud není p21 aktivován, nedochází následně k hyperfosforylaci p107/p130 retinoblastomových proteinů a jejich vazbě do DREAM komplexu společně s E2F4. DREAM komplex

zůstává inaktivní. Degradace a inaktivace p53 nebo p21 způsobená onkoproteiny E6 a E7 vede k deregulaci tohoto komplexu a konstitutivní transkripci A3B.



**Obrázek 6** Obrázek shrnuje vliv E6 a E7 onkoproteinů na APOBEC3A (A3A, katalytický polypeptid podobný enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3A) a A3B. E6 brání polyubikvitinaci A3A prostřednictvím cullin-RING ubikvitin ligázy a následné proteazomální degradaci. Společná vazba zinc finger 384 (zinc finger, ZNF384) a E6 do proximálního promotoru A3B vede k aktivaci transkripce. Stejně tak vazba TEAD transkripčního faktoru. Expres TEAD (TEA domain family member) je nepřímě řízena onkoproteinem E6. Dále degradace p53 a inaktivace p130/p107 brání formování represorového komplexu DREAM (dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulvar class B). Převzato (Riva et al., 2021)

### 4.3 Vliv APOBEC3 na sekvenci HPV

Jak již bylo uvedeno, viry si vytvořily nejrůznější strategie, kterými se deaminační aktivitě APOBEC3 brání (Conticello et al., 2003). U HPV však v současné době nebyl identifikován žádný podobný mechanismus. HPV naopak aktivitu deamináz indukují (shrnuto Wallace and Münger, 2018). Studie prokázaly, že pRb, jež je cílem onkoproteinu E7, je důležitý pro regulaci retrotranspozice LINE1. Virem řízená degradace pRb by mohla přispívat ke zvýšené retrotranspozici, což ohrožuje nejen buňky, ale i samotné HPV. Pohyby retroelementů například způsobují poškození genomu, které může potenciálně aktivovat apoptózu nebo expresi neoantigenů, jež v buňce aktivují zánětlivou odpověď.

Absence obranných mechanismů HPV před APOBEC3 restrikcí má pochopitelně své důsledky. Byl popsán vysoký stupeň variability jednonukleotidových polymorfismů indukovaných aktivitou APOBEC3 napříč subtypy HPV16 izolovaných z cervikálních biopsií žen (Zhu et al., 2020). V jiné studii prováděné na menším vzorku HPV16 z cervikálních biopsií bylo popsáno, že více než 80 % HPV16 mělo

unikátní sekvenci. (Mirabello et al., 2017). Autoři obou studií vyvozují závěr, že vzniklé jednonukleotidové polymorfismy jsou pravděpodobně důsledkem aktivity APOBEC3 a lze tedy předpokládat, že tyto deaminázy přispívají k evoluci HPV16.

V některých oblastech genomu ovšem vedl konstantní mutační tlak k eliminaci cílových sekvencí pro APOBEC3 (Mirabello et al., 2017). ORF genů *E1*, *L1*, a především *E7* obsahovaly statisticky významně nižší počet nesynonymních a nonsense mutací než kontroly. Zároveň většina nových nonsense a nesynonymních mutací odpovídala APOBEC3 mutačnímu podpisu. Vysoká konzervovanost oblasti genu *E7* by podle autorů mohla znamenat, že právě tento gen je příčinou vysokého onkogenního potenciálu HPV16.



## 5 APOBEC3 v karcinogenezi indukované HPV

Na základě sekvenční analýzy genomů čtrnácti různých typů karcinomů byla potvrzena schopnost APOBEC3 mutovat buněčný genom v nádorech. Mutační podpisy 2 a 13, které jsou charakteristické pro APOBEC3, představovaly až 68 % všech mutací v exomech šesti z nich, včetně CC a HNSCC (Roberts et al., 2013). Důležitým krokem ve výzkumu APOBEC3 bylo potvrzení, že tyto deaminázy aktivně přispívají k nádorovému bujení *in vivo*, což se v nedávné době podařilo. U transgenických myší způsoboval lidský A3A hypermutace a přispíval tak k rozvoji kolorektálního a hepatocelulárního karcinomu (Law et al., 2020).

### 5.1 APOBEC3 a progresse nádorové transformace

Replikace HPV probíhá v buněčném jádře a genomy virů jsou přímo vázány na genom buněk prostřednictvím transkripčního a epigenetického regulátoru BRD4 (shrnutí Smith and Fenton, 2019). Virová restrikce řízená APOBEC3 se tedy odehrává právě tam, což představuje zásadní riziko pro buněčný genom.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1, v HPV pozitivních tkáních je nejčastěji detekován A3A a A3B. Analýza bází v okolí 5'-TCN-3 trinukleotidové sekvence zjistila, že obě deaminázy cílí na mírně odlišné motivy (Chan et al., 2015). V *in vitro* kvasinkových modelech A3A katalyzoval deaminaci cytosinu v YTCA motivu, A3B v RTCA motivu (Y = pyrimidinová báze, R = purinová báze). Zacilení deamináz u kvasinek bylo ověřeno v lidských tkáňových kulturách a aplikováno na data získaná z celogenomové sekvenace 17 typů karcinomů, včetně HNSCC a CC. Bylo zjištěno, že počet A3A mutací byl až 11x vyšší než A3B.

Před identifikací specifických cílových motivů A3A a A3B byla za hlavní deaminázu buněčného genomu považována A3B, jelikož její exprese nejvíce korelovala se vznikem mutací v 5'-TCN-3 trinukleotidových sekvencích (Roberts et al., 2013). Díky jejich identifikaci se výzkum mohl zaměřit na poměry mezi mutagenézí a expresí A3A a A3B. Bylo zjištěno, že spolu ne vždy korelují (Henderson et al., 2014). Možné vysvětlení přinesla studie zabývající se mechanismy vzniku mutací v genomech nádorových buněk v dlouhodobém horizontu. Autoři zjistili, že APOBEC3 mutageneze neprobíhá kontinuálně či v delších intervalech, jako je tomu například v případě mutací způsobených chybami reparačních mechanismů (Petljak et al., 2019). Odehrává se v krátkých opakovaných epizodách s následným obdobím klidu a nekoreluje s expresí APOBEC3. Tento jev byl pozorován při kultivaci a klonování buněčných linií odvozených z různých typů nádorů a byl nazván „epizodická mutageneze“. Jeho příčina není známa, byla však zaznamenána významná korelace mezi retrotranspozicí LINE1 elementů a vznikem mutačního podpisu 13.

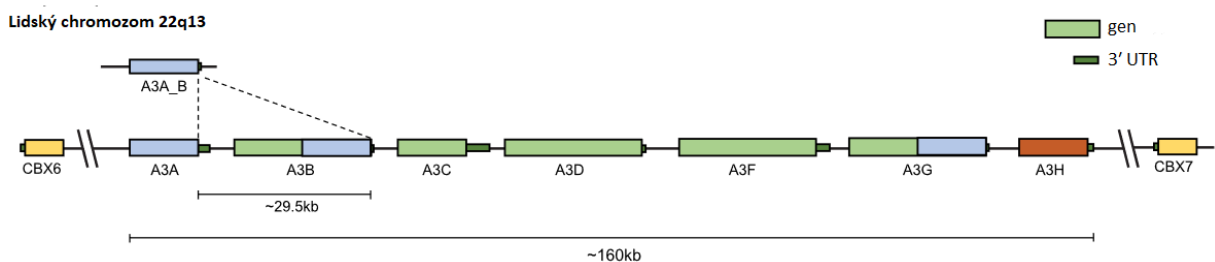
Přímé propojení mezi zacílením APOBEC3 aktivity na virový i buněčný genom v souvislosti s infekcí HPV bylo popsáno ve studii HPV pozitivních HNSCC (Faden et al., 2021). Studie navázala na data ze sekvenční analýzy HPV16 izolovaných z cervikálních lézí (podkapitola 4.3), která srovnávala mutace v genomu HPV16 z nálezů rozsahu CIN1-3 a CC s kontrolami (léze, které do následující kontroly neprogredovaly do stádia CIN2) (Zhu et al., 2020). Až 95 % mutací indukovaných APOBEC3 bylo nesynonymních, což naznačuje, že nedocházelo k jejich negativní selekci. Viry s těmito mutacemi zatím nebyly eliminovány z populace. Poměr nesynonymních a synonymních mutací v HPV16 v kontrolách byl oproti CIN1-3 a CC vyšší, což opět poukazuje na jejich nedávný vznik. Tyto výsledky nasvědčují, že APOBEC3 skutečně cílí na virus v průběhu infekce. Ke stejným poznatkům dospěli ve výše zmíněné studii HPV16 ze vzorků HNSCC (Faden et al., 2021). Dále analyzovali mutagenезi virových a buněčných genomů. Zjistili, že ve vzorcích s vyšší expresí APOBEC3 byly virové genomy více mutovány a mutagenезe viru pozitivně korelovala s indukcí mutací v buněčném genomu. Na základě těchto zjištění lze předpokládat, že APOBEC3 katalyzují deaminaci cytosinů ve virovém i buněčném genomu současně.

Dalším ze zásadních zjištění ve výzkumu role APOBEC3 v karcinogenezi indukované HPV byla identifikace APOBEC3 mutací v proto-onkogenu *PIK3CA* (Henderson et al., 2014). V HPV pozitivních HNSCC a CC se v genu *PIK3CA*, v sekvenci kódující helikální doménu, vyskytovaly mutace E542K a E545K s mutačním podpisem APOBEC3. Výskyt E542K a E545K v HPV negativních HNSCC byl výrazně nižší. Příčinná souvislost mezi jejich vznikem a aktivitou APOBEC3 byl potvrzena *in vitro* (Cannataro et al., 2019). Rekombinantně přípravný APOBEC3B způsoboval v oligomerech napodobujících obvyklé cílové sekvence v genu pro helikální doménu mutace E542K a E545K.

APOBEC3 nemusí ke karcinogenezi přispívat pouze přímou indukcí velkého množství mutací v buňce. Výsledky studie naznačují, že by zacílení APOBEC3 mutagenезe do virového genu *E2* mohlo napomoci procesu integrace virového genomu (Kondo et al., 2017). Autoři této studie ověřili, že v genomech HPV16 izolovaných z klinických vzorků OPC je se zvýšenou prevalencí mutován gen *E2*. A dále, že ve srovnání s HPV negativními OPC vzorky byla v HPV pozitivních vyšší exprese *A3A*. Bylo zjištěno, že vzorky s integrovaným virovým genomem vykazují až 15x vyšší expresi *A3A* mRNA oproti vzorkům s genomem HPV16 v epizomálním formě. V důsledku integrace viru do buněčného genomu může docházet k deregulaci *E6* a *E7*, což dále přispívá k procesu onkogeneze (Haręza et al., 2022)

Důležitým faktorem, který bude třeba zvážit v kontextu APOBEC3 aktivity a onkogeneze, jsou genetické predispozice. Jak znázorňuje obrázek 7, geny *A3A* a *A3B* jsou na chromozomu 22 uloženy za sebou (shrnutí Smith and Fenton, 2019). Zejména v oblastech východní a jihovýchodní Asie má vysokou prevalenci *A3A\_B* deleční polymorfismus těchto genů (Kidd et al., 2007). Vzniká v důsledku delece 3'-koncové oblasti *A3A* nebo ORF *A3B*, kdy dochází k fúzi ORF *A3A* a 3'-koncové oblasti *A3B* (obrázek 7) (Caval et al., 2014). Následným sestřihem primárního transkriptu dochází ke ztrátě *A3B*

sekvence a vzniká deamináza A3A s vyšší stabilitou a 10x až 20x vyšší expresí *in vitro*. Vysoká koncentrace chimerické A3A vedla v buněčné linii k tvorbě dvojlákových zlomů v DNA. Taiwanská studie zaznamenala výrazně zvýšenou expresi chimerické A3A u pacientů s HNSCC a současně také dlouhodobě lepší prognózu A3A\_B heterozygotních a homozygotních jedinců (Chen et al., 2017). Nicméně HPV status nebyl v této studii stanovován. Vliv delečního polymorfismu na HPV onkogenezi je v současné době nejasný.



**Obrázek 7** Obrázek znázorňuje strukturu lokusu genů pro APOBEC3 (katalytických polypeptidů podobných enzymu, který upravuje mRNA pro apolipoprotein B – podrodina 3) nacházející se na dlouhém raménku chromozomu 22. Zároveň je zde ilustrován A3A\_B deleční polymorfismus vznikající fúzí A3A ORF a A3B 3' koncové oblasti. Převzato a upraveno (Smith and Fenton, 2019)

## 5.2 Prognostický význam APOBEC3

Mutační podpisy APOBEC3 byly identifikovány v 98 % HPV pozitivních HNSCC a 78 % HPV negativních HNSCC (Cannataro et al., 2019). Přes vyšší mutační frekvenci a častější výskyt u HPV pozitivních HNSCC jsou APOBEC3 somatické mutace selektovány s nižší intenzitou než například mutace způsobené kouřením. Jejich příspěvek do karcinogeneze by tedy nemusel být tak závažný.

Ve studii pacientů s HPV pozitivním HNSCC byla aktivita některých APOBEC3, zejména A3G, spojována s lepší dlouhodobou prognózou (Conner et al., 2020). Ve stejné studii byla zkoumána souvislost mezi expresí APOBEC3 a odpovědí na chemoterapeutika v buněčných kulturách. Umlčení aktivity A3A vedlo k rezistenci na léčbu, což podporuje hypotézu, že exprese APOBEC3 indukovaná HPV aktivuje mechanismus BER, čímž zlepšuje odpověď na chemoterapeutika.

Sekvenační analýza DNA HPV16 zmiňovaná v podkapitolách 4.3 a 5.2 zjistila, že restriční aktivita APOBEC3 zvyšuje pravděpodobnost stagnace nálezu na cervixu nebo vyčištění infekce (Zhu et al., 2020). U žen, u kterých mezi kontrolami došlo k progresi do stádia CIN2 nebo CIN3, bylo zaznamenáno menší množství APOBEC3 mutací v genomu HPV ve srovnání s nálezy bez změny nebo s regresí. APOBEC3 restriční aktivita cílená na HPV tak potenciálně může bránit vzniku perzistentní infekce, která je nutná pro onkogenezi.

## 6 Závěr

Role proteinů APOBEC, respektive APOBEC3 v HPV indukované karcinogenezi je v zásadě dvojího charakteru. APOBEC3, jako součást přirozené imunity, brání buňky před virovou infekcí, která může mít v ojedinělých případech za následek onkogenezi. Zároveň však způsobují vznik mutací v buněčném genomu a tím k onkogenezi potenciálně přispívají. Zdá se, že tyto role jsou velmi úzce propojeny.

Expresí APOBEC3 je zahájena po rozpoznání viru imunitním dozorem buňky. Na základě sekvenčních dat genomů HPV se zdá, že mutagenese není kontinuální a závisí na dočasném vzniku ssDNA během virové replikace. V *in vitro* podmínkách se APOBEC3 mutagenese odehrávala v krátkých epizodách proložených obdobími neaktivity. Tento typ indukce mutací byl nazván „epizodická mutagenese“ a odehrával se i zcela nezávisle na virové infekci. Není jasné, jaké faktory epizodickou mutagenezi podněcují, byla však zaznamenána její korelace s průběhem retrotranspozice.

Deamináza A3A je považována za hlavní restriční faktor HPV. Indukuje deaminace cytosinů virového genomu, zejména oblasti LCR a genu *E2*. Přesto, že byla pozorována korelace mezi zvýšenou mutagenézí v genu *E2* a integrací virového genomu, zacílení aktivity A3A do této oblasti nebylo zatím vysvětleno. Funkce A3A je společně s A3B přímo ovlivněna onkoproteiny. Působením E6 a E7 dochází ke zvyšování stability A3A a transkripce A3B. Možným vysvětlením je, že podporou vlastní restrikce se HPV brání úplné eliminaci z organismu. Aktivita APOBEC3 cílená na virus zároveň zvyšuje pravděpodobnost regrese či stagnace HPV pozitivních cervikálních neoplázií.

U pacientů s HPV pozitivním HNSCC byla zaznamenána korelace exprese deamináz s lepší prognózou a *in vitro* studie dokonce naznačují, že by aktivita APOBEC3 mohla souviset s lepší odpovědí na léčbu. Nicméně s nárůstem hladin deamináz roste zároveň pravděpodobnost vzniku mutací v buněčném genomu. Tyto mutace, včetně mutací v proto-onkogenu *PIK3CA* vyskytujících se u HPV pozitivních nádorů se zvýšenou frekvencí, představují nezanedbatelný příspěvek do procesu HPV indukované karcinogeneze. Některé studie naznačují, že by jejich vliv na progresi neoplázií (ve srovnání s mutacemi způsobenými například kouřením) mohl být méně závažný. Posledním faktorem zmiňovaným v této bakalářské práci, který by potenciálně mohl hrát roli v HPV onkogenezi, je *A3A\_B* delační polymorfismu mezi geny *A3A* a *A3B*. Jeho výskyt má zvýšenou prevalenci v některých populacích, nicméně zatím jeho důsledky nebyly studovány v souvislosti s infekcí HPV.

Vliv proteinů APOBEC3 na rozvoj nejen HPV indukované karcinogeneze je v současné době intenzivně studován. Zmapování jeho důsledků a souvisejících dějů nám může pomoci o něco lépe pochopit procesy vedoucí k nádorové transformaci a zefektivnit léčbu.

## 7 Použitá literatura

Sekundární zdroje jsou označeny symbolem \*

Ahasan, M.M., Wakae, K., Wang, Z., Kitamura, K., Liu, G., Koura, M., Imayasu, M., Sakamoto, N., Hanaoka, K., Nakamura, M., Kyo, S., Kondo, S., Fujiwara, H., Yoshizaki, T., Mori, S., Kukimoto, I., Muramatsu, M., 2015. APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457, 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.103>

\*Araldi, R.P., Sant'Ana, T.A., Módolo, D.G., de Melo, T.C., Spadacci-Morena, D.D., de Cassia Stocco, R., Cerutti, J.M., de Souza, E.B., 2018. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 1537–1556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>

Bonvin, M., Achermann, F., Greeve, I., Stroka, D., Keogh, A., Inderbitzin, D., Candinas, D., Sommer, P., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.-P., Greeve, J., 2006. Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 43, 1364–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21187>

Cannataro, V.L., Gaffney, S.G., Sasaki, T., Issaeva, N., Grewal, N.K.S., Grandis, J.R., Yarbrough, W.G., Burtness, B., Anderson, K.S., Townsend, J.P., 2019. APOBEC-induced mutations and their cancer effect size in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 38, 3475–3487. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0657-6>

Caval, V., Suspène, R., Shapira, M., Vartanian, J.-P., Wain-Hobson, S., 2014. A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. *Nat Commun* 5, 5129. <https://doi.org/10.1038/ncomms6129>

Chan, K., Roberts, S.A., Klimczak, L.J., Sterling, J.F., Saini, N., Malc, E.P., Kim, J., Kwiatkowski, D.J., Fargo, D.C., Mieczkowski, P.A., Getz, G., Gordenin, D.A., 2015. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. *Nat Genet* 47, 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/ng.3378>

Chen, T.-W., Lee, C.-C., Liu, H., Wu, C.-S., Pickering, C.R., Huang, P.-J., Wang, J., Chang, I.Y.-F., Yeh, Y.-M., Chen, C.-D., Li, H.-P., Luo, J.-D., Tan, B.C.-M., Chan, T.E.H., Hsueh, C., Chu, L.J., Chen, Y.-T., Zhang, B., Yang, C.-Y., Wu, C.-C., Hsu, C.-W., See, L.-C., Tang, P., Yu, J.-S., Liao, W.-C., Chiang, W.-F., Rodriguez, H., Myers, J.N., Chang, K.-P., Chang, Y.-S., 2017. APOBEC3A is an oral cancer prognostic biomarker in Taiwanese carriers of an APOBEC deletion polymorphism. *Nat Commun* 8, 465. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00493-9>

Cheng, A.Z., Yockteng-Melgar, J., Jarvis, M.C., Malik-Soni, N., Borozan, I., Carpenter, M.A., McCann, J.L., Ebrahimi, D., Shaban, N.M., Marcon, E., Greenblatt, J., Brown, W.L., Frappier, L., Harris, R.S., 2019. Epstein–Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nat Microbiol* 4, 78–88. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0284-6>

Chesson, H.W., Dunne, E.F., Hariri, S., Markowitz, L.E., 2014. The Estimated Lifetime Probability of Acquiring Human Papillomavirus in the United States. *Sexually Transmitted Diseases* 41, 660–664. <https://doi.org/10.1097/OLQ.000000000000193>

Conner, K.L., Shaik, A.N., Ekinci, E., Kim, S., Ruterbusch, J.J., Cote, M.L., Patrick, S.M., 2020. HPV induction of APOBEC3 enzymes mediate overall survival and response to cisplatin in head and neck cancer. *DNA Repair* 87, 102802. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102802>

Conticello, S.G., Harris, R.S., Neuberger, M.S., 2003. The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G. *Current Biology* 13, 2009–2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.034>

\*Covino, D.A., Gauzzi, M.C., Fantuzzi, L., 2018. Understanding the regulation of APOBEC3 expression: Current evidence and much to learn. *J Leukoc Biol* 103, 433–444 <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0717-310R>

\*Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., 2012. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30, F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>

Duggal, N.K., Malik, H.S., Emerman, M., 2011. The Breadth of Antiviral Activity of Apobec3DE in Chimpanzees Has Been Driven by Positive Selection. *J Virol* 85, 11361–11371. <https://doi.org/10.1128/JVI.05046-11>

Faden, D.L., Kuhs, K.A.L., Lin, M., Langenbucher, A., Pinheiro, M., Yeager, M., Cullen, M., Boland, J.F., Steinberg, M., Bass, S., Lewis, J.S., Lawrence, M.S., Ferris, R.L., Mirabello, L., 2021. APOBEC Mutagenesis Is Concordant between Tumor and Viral Genomes in HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Viruses* 13, 1666. <https://doi.org/10.3390/v13081666>

Faure-Dupuy, S., Riedl, T., Rolland, M., Hizir, Z., Reisinger, F., Neuhaus, K., Schuehle, S., Remouchamps, C., Gillet, N., Schönung, M., Stadler, M., Wettengel, J., Barnault, R., Parent, R., Schuster, L.C., Farhat, R., Prokosch, S., Leuchtenberger, C., Öllinger, R., Engleitner, T., Rippe, K., Rad, R., Unger, K., Tscharahganeh, D., Lipka, D.B., Protzer, U., Durantel, D., Lucifora, J., Dejardin, E., Heikenwälder, M., 2021. Control of APOBEC3B induction and cccDNA decay by NF- $\kappa$ B and miR-138-5p. *JHEP Reports* 3, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100354>

Feng, Y., Goubran, M.H., Follack, T.B., Chelico, L., 2017. Deamination-independent restriction of LINE-1 retrotransposition by APOBEC3H. *Sci Rep* 7, 10881. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11344-4>

\*Gao, J., Choudhry, H., Cao, W., 2018. Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like family genes activation and regulation during tumorigenesis. *Cancer Sci* 109, 2375–2382. <https://doi.org/10.1111/cas.13658>

\*Graham, S.V., 2017. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science* 131, 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>

\*Haręza, D.A., Wilczyński, J.R., Paradowska, E., 2022. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. *Oncogenic Properties of Viral Proteins*. *IJMS* 23, 1818. <https://doi.org/10.3390/ijms23031818>

Henderson, S., Chakravarthy, A., Su, X., Boshoff, C., Fenton, T.R., 2014. APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development. *Cell Reports* 7, 1833–1841. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.012>

Hirose, Y., Onuki, M., Tenjimbayashi, Y., Mori, S., Ishii, Y., Takeuchi, T., Tasaka, N., Satoh, T., Morisada, T., Iwata, T., Miyamoto, S., Matsumoto, K., Sekizawa, A., Kukimoto, I., 2018. Within-Host Variations of Human Papillomavirus Reveal APOBEC Signature Mutagenesis in the Viral Genome. *J Virol* 92, e00017-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00017-18>

Hultquist, J.F., Lengyel, J.A., Refsland, E.W., LaRue, R.S., Lackey, L., Brown, W.L., Harris, R.S., 2011. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J Virol* 85, 11220–11234. <https://doi.org/10.1128/JVI.05238-11>

Kidd, J.M., Newman, T.L., Tuzun, E., Kaul, R., Eichler, E.E., 2007. Population Stratification of a Common APOBEC Gene Deletion Polymorphism. *PLoS Genet* 3, e63. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030063>

\*Kombe Kombe, A.J., Li, B., Zahid, A., Mengist, H.M., Bounda, G.-A., Zhou, Y., Jin, T., 2021. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front. Public Health* 8, 552028. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.552028>

Kondo, S., Wakae, K., Wakisaka, N., Nakanishi, Y., Ishikawa, K., Komori, T., Moriyama-Kita, M., Endo, K., Muroto, S., Wang, Z., Kitamura, K., Nishiyama, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Muramatsu, M., Yoshizaki, T., 2017. APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. *Oncogene* 36, 1687–1697. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.335>

Landry, S., Narvaiza, I., Linfesty, D.C., Weitzman, M.D., 2011. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep* 12, 444–450. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.46>

Law, E.K., Levin-Klein, R., Jarvis, M.C., Kim, H., Argyris, P.P., Carpenter, M.A., Starrett, G.J., Temiz, N.A., Larson, L.K., Durfee, C., Burns, M.B., Vogel, R.I., Stavrou, S., Aguilera, A.N., Wagner, S., Largaespada, D.A., Starr, T.K., Ross, S.R., Harris, R.S., 2020. APOBEC3A catalyzes mutation and drives carcinogenesis in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 217, e20200261. <https://doi.org/10.1084/jem.20200261>

Liddament, M.T., Brown, W.L., Schumacher, A.J., Harris, R.S., 2004. APOBEC3F Properties and Hypermutation Preferences Indicate Activity against HIV-1 In Vivo. *Current Biology* 14, 1385–1391. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.050>

Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M.F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., Remouchamps, C., Chou, W.-M., Thasler, W.E., Hüser, N., Durantel, D., Liang, T.J., Münk, C., Heim, M.H., Browning, J.L., Dejardin, E., Dandri, M., Schindler, M., Heikenwalder, M., Protzer, U., 2014. Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science* 343, 1221–1228. <https://doi.org/10.1126/science.1243462>

\*Maiti, A., Hou, S., Schiffer, C.A., Matsuo, H., 2021. Interactions of APOBEC3s with DNA and RNA. *Current Opinion in Structural Biology* 67, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.12.004>

Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., Trono, D., 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature01709>

Mirabello, L., Yeager, M., Yu, K., Clifford, G.M., Xiao, Y., Zhu, B., Cullen, M., Boland, J.F., Wentzensen, N., Nelson, C.W., Raine-Bennett, T., Chen, Z., Bass, S., Song, L., Yang, Q., Steinberg, M., Burdett, L., Dean, M., Roberson, D., Mitchell, J., Lorey, T., Franceschi, S., Castle, P.E., Walker, J., Zuna, R., Kreimer, A.R., Beachler, D.C., Hildesheim, A., Gonzalez, P., Porras, C., Burk, R.D., Schiffman, M., 2017. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell* 170, 1164–1174.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.001>

Mori, S., Takeuchi, T., Ishii, Y., Kukimoto, I., 2015. Identification of APOBEC3B promoter elements responsible for activation by human papillomavirus type 16 E6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460, 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.068>

Mori, S., Takeuchi, T., Ishii, Y., Yugawa, T., Kiyono, T., Nishina, H., Kukimoto, I., 2017. Human Papillomavirus 16 E6 Upregulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J Virol* 91, e02413-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02413-16>

Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perković, M., Löwer, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G.G., Münk, C., 2006. APOBEC3 Proteins Inhibit Human LINE-1 Retrotransposition. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22161–22172. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601716200>

Oh, S., Bournique, E., Bowen, D., Jalili, P., Sanchez, A., Ward, I., Dananberg, A., Manjunath, L., Tran, G.P., Semler, B.L., Maciejowski, J., Seldin, M., Buisson, R., 2021. Genotoxic stress and viral infection induce transient expression of APOBEC3A and pro-inflammatory genes through two distinct pathways. *Nat Commun* 12, 4917. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25203-4>

Periyasamy, M., Singh, A.K., Gemma, C., Kranjec, C., Farzan, R., Leach, D.A., Navaratnam, N., Pálinkás, H.L., Vértessy, B.G., Fenton, T.R., Doorbar, J., Fuller-Pace, F., Meek, D.W., Coombes, R.C., Buluwela, L., Ali, S., 2017. p53 controls expression of the DNA deaminase APOBEC3B to limit its potential mutagenic activity in cancer cells. *Nucleic Acids Research* 45, 11056–11069. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx721>

Petljak, M., Alexandrov, L.B., Brummel, J.S., Price, S., Wedge, D.C., Grossmann, S., Dawson, K.J., Ju, Y.S., Iorio, F., Tubio, J.M.C., Koh, C.C., Georgakopoulos-Soares, I., Rodríguez-Martín, B., Otlu, B., O'Meara, S., Butler, A.P., Menzies, A., Bhosle, S.G., Raine, K., Jones, D.R., Teague, J.W., Beal, K., Latimer, C., O'Neill, L., Zamora, J., Anderson, E., Patel, N., Maddison, M., Ng, B.L., Graham, J., Garnett, M.J., McDermott, U., Nik-Zainal, S., Campbell, P.J., Stratton, M.R., 2019. Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell* 176, 1282-1294.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.012>

\*Petljak, M., Maciejowski, J., 2020. Molecular origins of APOBEC-associated mutations in cancer. *DNA Repair* 94, 102905. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102905>

Richardson, S.R., Narvaiza, I., Planegger, R.A., Weitzman, M.D., Moran, J.V., 2014. APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *eLife* 3, e02008. <https://doi.org/10.7554/eLife.02008>

\*Riva, G., Albano, C., Gugliesi, F., Pasquero, S., Pacheco, S.F.C., Pecorari, G., Landolfo, S., Biolatti, M., Dell'Oste, V., 2021. HPV Meets APOBEC: New Players in Head and Neck Cancer. *IJMS* 22, 1402. <https://doi.org/10.3390/ijms22031402>

Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., Harris, S., Shah, R.R., Resnick, M.A., Getz, G., Gordenin, D.A., 2013. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 45, 970–976. <https://doi.org/10.1038/ng.2702>

\*Salter, J.D., Bennett, R.P., Smith, H.C., 2016. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 578–594. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.001>

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650. <https://doi.org/10.1038/nature00939>

\*Siriwardena, S.U., Chen, K., Bhagwat, A.S., 2016. Functions and Malfunctions of Mammalian DNA-Cytosine Deaminases. *Chem. Rev.* 116, 12688–12710. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00296>

\*Smith, N.J., Fenton, T.R., 2019. The APOBEC3 genes and their role in cancer: insights from human papillomavirus. *Journal of Molecular Endocrinology* 62, R269–R287. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0011>

Souza, T.M.L., Rodrigues, D.Q., Passaes, C.P.B., Barreto-de-Souza, V., Aguiar, R.S., Temerozo, J.R., Morgado, M.G., Fontes, C.F.L., Araujo, E.G., Bou-Habib, D.C., 2011. The nerve growth factor reduces APOBEC3G synthesis and enhances HIV-1 transcription and replication in human primary macrophages. *Blood* 117, 2944–2952. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-287193>



- Tanaka, Y., Marusawa, H., Seno, H., Matsumoto, Y., Ueda, Y., Kodama, Y., Endo, Y., Yamauchi, J., Matsumoto, T., Takaori-Kondo, A., Ikai, I., Chiba, T., 2006. Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon- $\alpha$  stimulation in human hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.192>
- Vartanian, J.-P., Guétard, D., Henry, M., Wain-Hobson, S., 2008. Evidence for Editing of Human Papillomavirus DNA by APOBEC3 in Benign and Precancerous Lesions. *Science* 320, 230–233. <https://doi.org/10.1126/science.1153201>
- \*Wallace, N.A., Münger, K., 2018. The curious case of APOBEC3 activation by cancer-associated human papillomaviruses. *PLoS Pathog* 14, e1006717. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006717>
- Wang, Z., Wakae, K., Kitamura, K., Aoyama, S., Liu, G., Koura, M., Monjurul, A.M., Kukimoto, I., Muramatsu, M., 2014. APOBEC3 Deaminases Induce Hypermutation in Human Papillomavirus 16 DNA upon Beta Interferon Stimulation. *J Virol* 88, 1308–1317. <https://doi.org/10.1128/JVI.03091-13>
- \*Warren, C., Westrich, J., Doorslaer, K., Pyeon, D., 2017. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. *Viruses* 9, 233. <https://doi.org/10.3390/v9080233>
- Warren, C.J., Xu, T., Guo, K., Griffin, L.M., Westrich, J.A., Lee, D., Lambert, P.F., Santiago, M.L., Pyeon, D., 2015. APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus. *J Virol* 89, 688–702. <https://doi.org/10.1128/JVI.02383-14>
- Westrich, J.A., Warren, C.J., Klausner, M.J., Guo, K., Liu, C.-W., Santiago, M.L., Pyeon, D., 2018. Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. *J Virol* 92, e01318-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01318-17>
- \*White, M.K., Pagano, J.S., Khalili, K., 2014. Viruses and Human Cancers: a Long Road of Discovery of Molecular Paradigms. *Clin Microbiol Rev* 27, 463–481. <https://doi.org/10.1128/CMR.00124-13>
- \*Xu, W.K., Byun, H., Dudley, J.P., 2020. The Role of APOBECs in Viral Replication. *Microorganisms* 8, 1899. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121899>
- Zhu, B., Xiao, Y., Yeager, M., Clifford, G., Wentzensen, N., Cullen, M., Boland, J.F., Bass, S., Steinberg, M.K., Raine-Bennett, T., Lee, D., Burk, R.D., Pinheiro, M., Song, L., Dean, M., Nelson, C.W., Burdett, L., Yu, K., Roberson, D., Lorey, T., Franceschi, S., Castle, P.E., Walker, J., Zuna, R., Schiffman, M., Mirabello, L., 2020. Mutations in the HPV16 genome induced by APOBEC3 are associated with viral clearance. *Nat Commun* 11, 886. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14730-1>