

PROTEINI AID/APOBEC IN RAK

AID/APOBEC PROTEINS AND CANCER

AVTORJI / AUTHORS:

Blaž Videčnik, mag. farm.

doc. dr. Marija Nika Lovšin, univ. dipl. kem.

doc. dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ursa.pecarfonovic@ffa.uni-lj.si



1 UVOD

Proteini AID/APOBEC (aktivacijsko inducirana deaminaza/katalitičnemu polipeptidu podoben encim, ki preureja mRNA apolipoproteina B, angl. *activation-induced deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) so citidinske deaminaze; to so encimi, ki katalizirajo pretvorbo (deoksi)citidina v (deoksi)uridin (slika 1A). Spremembo lahko uvedejo v enoverižni molekuli DNA ali RNA, kar privede do točkovne mutacije (1).

Družino proteinov AID/APOBEC pri človeku zapisuje 11 genov, ki kodirajo proteine AID, APOBEC1 (A1), APOBEC2 (A2), sedem paralogov APOBEC3 (A3) ter APOBEC4 (A4) (slika 1B). Za njihovo encimsko aktivnost je ključen cinkov

POVZETEK

Proteini AID/APOBEC z deaminacijo citidina preurejajo molekule DNA in RNA ter imajo ključno vlogo v številnih fizioloških in patoloških procesih. Povzročajo mutacijo citidina v timidin ali gvanidin. Proteini APOBEC3 omogočajo obrambo pred virusnimi okužbami, protein AID pa sodeluje pri nastanku protiteles. Neustrezna regulacija njihovega izražanja in aktivnosti lahko povzroči netarčne mutacije po celotnem genomu in razvoj raka. Glavna povzročiteljica mutacij sta APOBEC3A in APOBEC3B, mutacije, ki jih povzročata pa se pojavljajo pri več kot polovici vseh tumorjev. Ob povišanem izražanju lahko proteini APOBEC3 v tumorskem mikrokoli vplivajo na imunski odziv proti raku. V zadnjih letih so odkrili, da proteini AID/APOBEC sodelujejo tudi pri demetilaciji DNA, preko katere lahko vplivajo na izražanje genov. Deaminaze AID/APOBEC bi torej lahko uporabili kot tarče pri zdravljenju raka, potencial imajo tudi kot prognostični biološki označevalci za napoved kliničnih izidov ali kot biološki označevalci za napoved uspešnosti tarčne terapije raka in odpornosti na zdravljenje.

KLJUČNE BESEDE:

APOBEC3, deaminacija citidina, mutacija, rak

ABSTRACT

AID/APOBEC proteins edit single-stranded DNA and RNA by cytidine deamination and play a key role in many physiological and pathological processes. They cause cytidine to thymidine or guanine mutations. APOBEC3 proteins provide defence against viral infections, whereas AID is responsible for antibody diversification. Dysregulation of their expression and activity can lead to off-target mutations throughout the genome and cancer development. APOBEC3A and APOBEC3B are the main cause of mutations in more than half of all tumours. Overexpression of APOBEC3 proteins in the tumour microenvironment can affect the immune response. Recently, AID/APOBEC deaminases have been shown to participate in DNA demethylation, which regulates gene expression. AID/APOBEC proteins could be utilised as targets in cancer treatment and have the potential as prognostic biomarkers for predicting clinical outcomes or as biomarkers for pre-

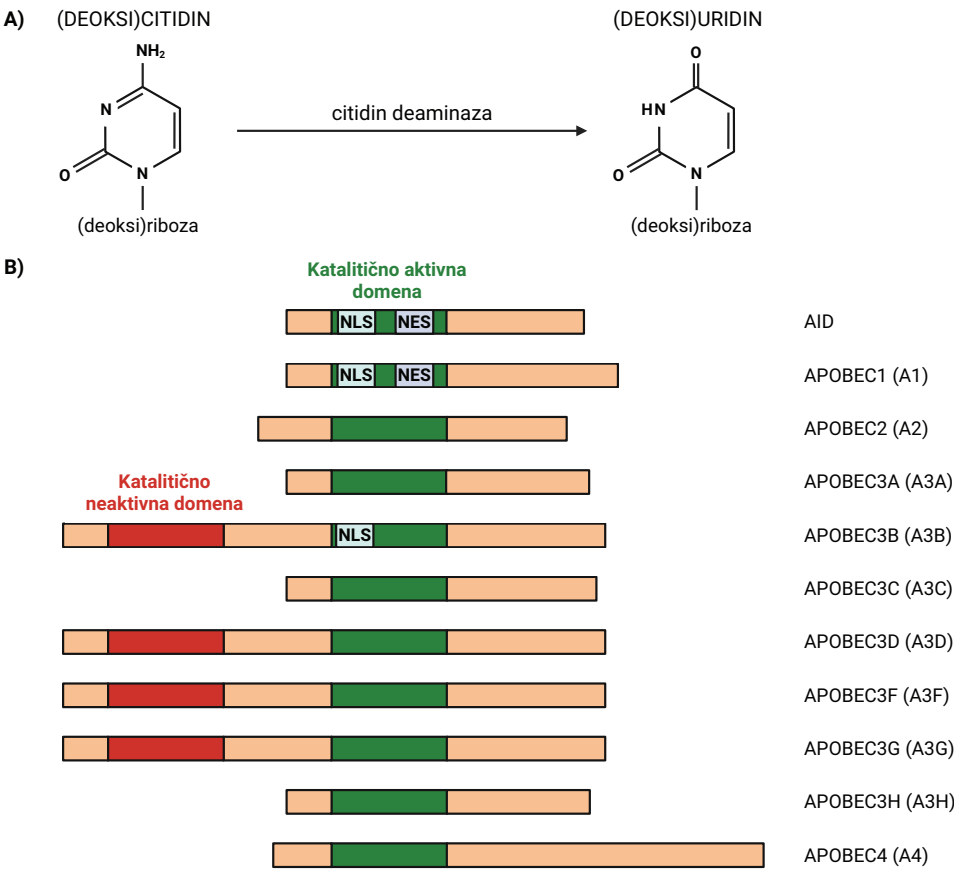


dicting targeted cancer therapies and treatment resistance.

KEY WORDS:
APOBEC3, cancer, cytidine deamination, mutation

ion (Zn^{2+}) v aktivnem mestu, ki pri reakciji deluje kot ko-faktor (2). Proteini so si strukturno podobni, razlikujejo pa se po sestavi, dolžini in prostorski konformaciji zank med sicer ohranjenimi elementi sekundarnih struktur. Te razlike

določajo biološko funkcijo encima, njegovo substratno specifičnost, lokalizacijo znotraj celice in regulirajo katalitično deaminacijo (2). Proteini AID/APOBEC sodelujejo v številnih bioloških procesih. Kot del prirojene imunosti proteini A3 sodelujejo pri obrambi pred virusi RNA in DNA ter retroelementi (1), protein AID kot del pridobljene imunosti skrbi za zorenje in razvoj protiteles različnih razredov (3), protein A1 ima vlogo v metabolizmu in transportu lipidov (3), protein A2 pa pri razvoju srčne in skeletnih mišic (2). Protein A4 je manj poznan član družine AID/APOBEC brez znane funkcije (4).



Slika 1: Deaminacija citidina v enoverižni nukleinski kislini s citidinskimi deaminazami AID/APOBEC. A) Proteini AID/APOBEC deaminirajo (deoksi)citidin v (deoksi)uridin v enoverižni DNA in RNA. B) Shematski prikaz struktur proteinov družine citidinskih deaminaz AID/APOBEC. Proteini A3B, A3D, A3F in A3G so dvodomenski, proteini AID, A1, A2, A3A, A3C, A3H in A4 pa so enodomenski. Prirejeno po (2). Ustvarjeno s programom Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/735psig>.
NES – signal za prenos iz jedra, NLS – jedrni lokalizacijski signal
Figure 1: Cytidine deamination in a single-stranded nucleic acid by the AID/APOBEC cytidine deaminases. A) The AID/APOBEC proteins deaminate (deoxy)cytidine to (deoxy)uridine in single-stranded DNA and RNA. B) Schematic diagram showing protein structures of the AID/APOBEC family members. A3B, A3D, A3F and A3G proteins are double-domain proteins, while AID, A1, A2, A3A, A3C, A3H and A4 are single-domain proteins. Adapted from (2). Created in Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/735psig>.
NES – nuclear export signal, NLS – nuclear localisation signal

Kadar deaminacija citidina ni ustrezno regulirana, lahko proteini AID/APOBEC povzročijo mutacije v genomu, njihovo kopičenje pa lahko vodi v nastanek raka (5). Obenem dodatne mutacije v tumorskih celicah povzročijo napredovanje tumorja in potencialno razvoj rezistence na zdravljenje (6). V preglednem članku predstavljamo mehanizme delovanja proteinov AID/APOBEC, njihovo vlogo pri razvoju in napredovanju raka, razvoj odpornosti na protirakavo terapijo ter potencialno uporabo proteinov A3 kot tarč in kot bioloških označevalcev v terapiji raka.

2 MEHANIZEM DELOVANJA PROTEINOV AID/APOBEC

Deaminacija citidina v zaporedju DNA ali RNA povzroči zamenjavo ene baze, citidina (C), v drugo, uridin (U) (angl. *single base substitution*, SBS) in s tem spremeni strukturo in funkcijo nukleinske kisline (7). Govorimo o preurejanju DNA oziroma preurejanju RNA, pri čemer so posledice preurejanja RNA prehodne, saj spremenjena RNA sčasoma razpade, medtem ko so spremembe v zaporedju DNA trajne in vplivajo na genski zapis (8).

2.1 TRANZICIJA CITIDINA V TIMIDIN IN TRANSVERZIJA CITIDINA V GVANIDIN

Proteini AID/APOBEC z deaminacijo citidina preurejajo enoverižne nukleinske kisline. DNA se mora torej nahajati v obliki enojne vijačnice, kar se zgodi med celičnimi pro-

cesi, kot sta podvojevanje in prepisovanje DNA ter med delovanjem različnih popravljalnih mehanizmov. Encima A3A in A3B deaminirata zastajajočo verigo (angl. *lagging strand*) med podvojevanjem DNA. Pri tem A3A še posebej cilja lasnične zanke (angl. *hairpin loops*), medtem ko A3B med prepisovanjem DNA najpogosteje cilja zanke R (angl. *R loops*). Proteina se med sabo razlikujeta tudi v motivih, ki jih ciljata znotraj enoverižne DNA. Oba najpogosteje ciljata mesto, kjer pred C stoji timidin (T) (TpC), pri čemer A3A najpogosteje deluje na motivih TpC, ki sledijo pirimidinom (CTC, TTC), A3B pa na motivih, ki sledijo purinom (ATC, GTC). To prispeva k substratni specifičnosti obeh deaminaz. Zaradi deaminacije pride do mutacije C v T in C v gvanozin (G), ki sta v Katalogu somatskih mutacij pri raku (angl. *Catalogue of somatic mutations in cancer*; COSMIC) opisani kot mutacijska podpisa SBS2 in SBS13 in sta značilna pokazatelja mutageneze s proteini AID/APOBEC (9).

Pretvorbi C v U po deaminaciji citidina na enoverižni DNA sledi več možnih mutacijskih dogodkov (slika 2). Uracil je nato med pomnoževanjem DNA in lokalno sintezo DNA prepoznan kot T, kar v nastajajoči komplementarni verigi DNA povzroči vključitev adenozina (A), rezultat pa je tranzicija C v T (mutacijski podpis SBS2; slika 2A). Drugi način je posreden in vključuje encim uracil-DNA glikozilazo (angl. *uracil-DNA glycosylase*; UDG), ki učinkovito izreže U iz DNA in s tem ustvari mesto brez baze (angl. *site AP*, *apurinic/aprimidinic site*, *abasic site*). Večina polimeraz nasproti mesta brez baze postavi A, čemur sledi ponovna sinteza DNA. Pri tem ponovno pride do tranzicije C v T (mutacijski podpis SBS2; slika 2B). Izjema je polimeraza "Reversionless 1" (REV1), ki nasproti mesta brez baze postavi C in povzroči transverzijo C v G (mutacijski podpis SBS13; slika 2C). Vključen je lahko tudi encim apurinska/apirimidinska endonukleaza oz. endonukleaza AP (angl. *apurinic/aprimidinic endonuclease*, *AP endonuclease*), ki povzroči enojni ali dvojni prelom verige DNA (angl. *single-strand break*, SSB; *double-strand break*, DSB), kar vodi v še več možnih mutacijskih dogodkov, kot so insercije, delecije, amplifikacije, inverzije ali translokacije v DNA (10). SBS2 in SBS13 sta torej substituciji ene nukleotidne baze znotraj DNA, mutacije, ki jih povzročajo proteini AID/APOBEC, pa lahko tvorijo tudi skupke: substitucija dveh (angl. *doublet base substitutions*; DBS) ali več zaporednih nukleotidnih baz (angl. *multi base substitution*; MBS), dve ali tri substitucije v nezaporednih bazah (omikli), štiri ali več substitucij v nezaporednih bazah (kataegis). Vsi ti mutacijski dogodki skupaj oblikujejo značilen mutacijski podpis proteinov AID/APOBEC (11).

KLJUČNA SPOROČILA

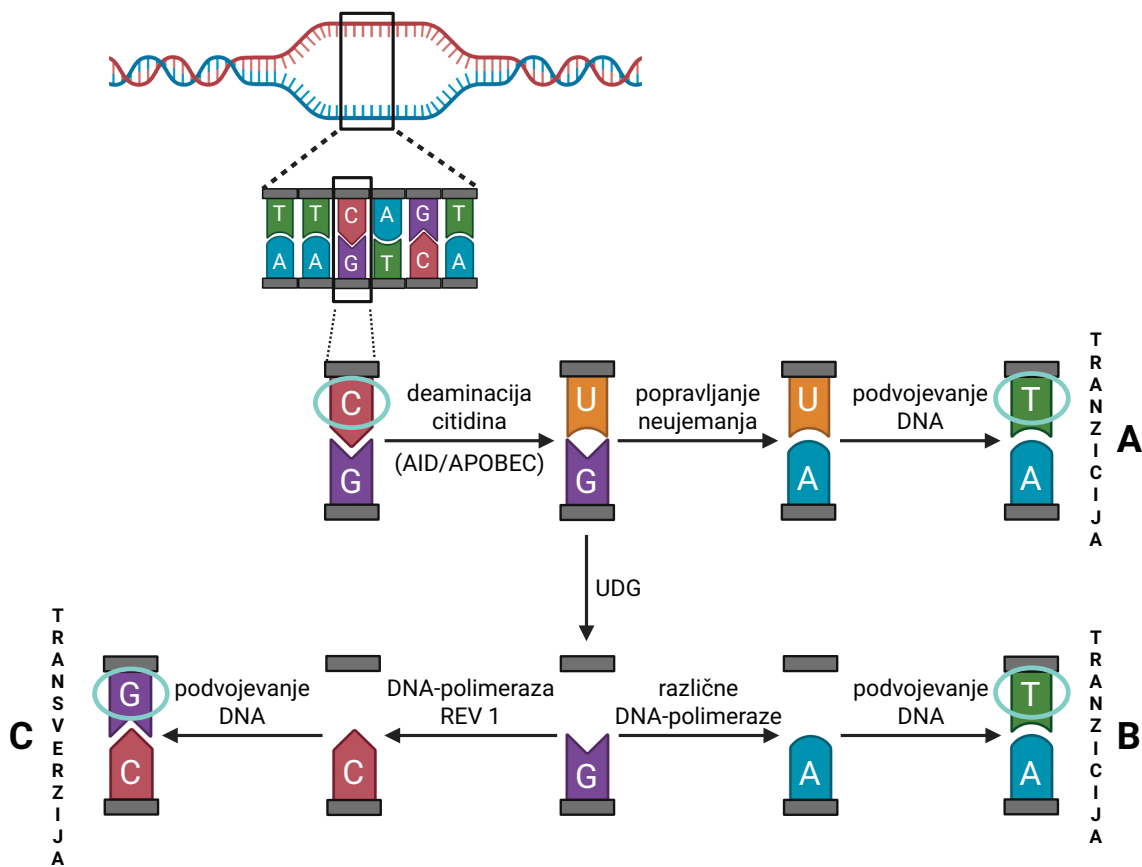
- Proteini AID/APOBEC so citidinske deaminaze, ki v enoverižni molekuli DNA ali RNA pretvorijo citidin v uridin.
- Deaminacija citidina lahko povzroči netarčne mutacije v človeškem genomu, kar vodi do nastanka raka ter njegovo napredovanje v agresivnejšo obliko.
- Pri več kot polovici tumorjev najdemo mutacijski podpis, povezan z aktivnostjo proteinov APOBEC3.
- AID/APOBEC sodelujejo pri demetilaciji DNA, kar lahko vpliva na izražanje genov.
- APOBEC3 so obetavne tarče in biološki označevalci v terapiji raka.



2.2 DEMETILACIJA DNA

V molekuli DNA se C nahaja v nemetilirani ali metilirani obliki, in sicer kot 5-metilcitozin (5mC) ali kot 5-hidroksimetilcitozin (5hmC). Metilacijo DNA katalizirajo metiltransferaze DNA, ki kovalentno pripnejo metilno skupino na peti ogljik v C, da nastane 5mC. Do metilacije DNA pri sesalcih pride večinoma v dinukleotidih CpG, ki so značilni za promotorske regije genov, to pa vpliva na izražanje genov. 5mC utiša izražanje genov, proces demetilacije DNA, ki 5mC pretvori v C, pa obnovi prepisovanje in izražanje ge-

nov. Ustrezno razmerje med metiliranimi in nemetiliranimi C je ključno tekom embrionalnega razvoja ter razvoja in diferenciacije zarodnih celic. Obenem lahko demetilacija v onkogenu aktivira gene, ki sprožijo razvoj raka (12). Več raziskovalnih skupin je poročalo, da lahko proteini AID/APOBEC preko demetilacije DNA uravnavajo izražanje genov (13-15). Predvidevajo, da delujejo preko deaminacije 5mC, preko katere ga pretvorijo v T, le tega pa encimi TET (angl. *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases*) oksidirajo do 5hmU. Tako T kot 5hmU na mestu predhodnega 5mC povzročita neujemanje v verigi DNA, ki se



Slika 2: Mehanizem nastanka mutacije zaradi deaminacije citidina. Proteini A3 z deaminacijo citidina pretvorijo C v U v enoverižni DNA. (A) Popravljalni mehanizem prepozna U kot T in nasproti postavi A, kar povzroči tranzicijo (mutacija C v T; SBS2). (B) Encim uracil-DNA glikozilaza (UDG) na mestu, kjer je U, povzroči nastanek mesta brez baze. Nasproti mesta brez baze različne DNA-polimeraze postavijo A in povzročijo tranzicijo (mutacija C v T; SBS2). (C) DNA-polimeraza REV1 nasproti mesta brez baze postavi C in povzroči transverzijo (mutacija C v G; SBS13). Ustvarjeno s programom Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/mmzh6t7>.

Figure 2: Mechanism of mutation by cytosine deamination. A3 proteins convert C to U in single-stranded DNA by cytosine deamination. (A) The mismatch repair mechanism recognises U as T and places A opposite it, resulting in a transition (C-to-T mutation; SBS2). (B) The uracil-DNA glycosylase (UDG) creates an abasic site at the U site. Various DNA polymerases place A opposite the abasic site and cause a transition (C-to-T mutation; SBS2). (C) The DNA polymerase REV1 places C opposite the abasic site and causes a transversion (C-to-G mutation; SBS13). Created in Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/mmzh6t7>.

popravi bodisi z mehanizmom popravljanja z izrezom baze (angl. *base excision repair*, BER) bodisi z mehanizmom za popravljanje neujemanja (angl. *mismatch repair*, MMR). Oba povzročita nastanek mesta brez baze, ki se nato z delovanjem endonukleaze AP, DNA-polimeraze β in DNA-ligaze zapolni z nemetiliranim C (16). Čeprav točnega mehanizma, kako so proteini AID/APOBEC vključeni v demetilacijo DNA, še ne poznamo, sklepajo, da verjetno sočasno delujejo encimi TET in AID/APOBEC. Potrebne bodo nadaljnje raziskave, da ugotovimo, ali procesa oksidacije z encimi TET in deaminacije s proteini AID/APOBEC potekata neodvisno ali sta med seboj povezana (16).

3 VLOGA PROTEINOV AID/APOBEC

Proteini AID/APOBEC imajo pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema. Pri prirojeni imunosti proteini A3 preprečijo razmnoževanje virusov, tako da mutirajo virusno DNA (npr. virus Epstein-Barr (EBV), humani papiloma virus (HPV) in virus hepatitisa B (HBV)), s čimer jih inaktivirajo (1). Pri pridobljeni imunosti ima pomembno vlogo protein AID, ki skrbi za zorenje učinkovitih protiteles različnih razredov. Z mutiranjem DNA znotraj variabilne regije lokusa za imunoglobuline protein AID povzroči somatsko hipermutacijo, ki spremeni afiniteto protiteles do antigenov. V kombinaciji s klonsko selekcijo prevladajo protitelesa z najvišjo afiniteto. Z mutacijo DNA znotraj preklopne regije (angl. *switch region*) lokusa za imunoglobuline protein AID povzroči preklap med izdelavo razredov protiteles iz razreda IgM v razrede IgG, IgE ali IgA. S tem se spremeni efektorska funkcija protiteles (17). Poleg tega AID sodeluje tudi pri odstranjevanju avtoreaktivnih limfocitov B (18).

3.1 PROTEINI AID/APOBEC PRISPEVAJO K RAZVOJU IN NAPREDOVANJU RAKA

Neustrezna regulacija proteinov AID/APOBEC vodi v mutacije DNA izven virusnih in imunoglobulinskih genov ter povzroči kopičenje mutacij v človeškem genomu, kar lahko privede do nastanka tumorja (19, 20). Medtem ko ima deaminazno aktivnost večina predstavnikov družine AID/APOBEC, mutacije v genovski DNA pretežno povzročajo proteini AID, A1, A3A in A3B. Njihov mutageni po-

tencial je odvisen od lokalizacije v jedru, kjer imajo dostop do DNA. Deaminazi AID in A1 sta prisotni tako v jedru kot v citoplazmi, med katerima se neprestano prenašata s pomočjo jedrnega lokalizacijskega signala (angl. *nuclear localisation signal*, NLS) in signala za prenos iz jedra (angl. *nuclear export signal*, NES). Protein A3A lahko zaradi svoje majhnosti prehaja med jedrom in citoplazmo s pasivno difuzijo, protein A3B pa se zaradi prisotnosti zaporedja NLS in svoje velikosti nahaja izključno v jedru (21).

V zdravem tkivu je izražanje proteinov A3 nizko, zato mutacije, ki bi nastale zaradi njihove mutagene aktivnosti, praviloma niso prisotne. Nasprotno pa se v rakavem tkivu proteini A3 izražajo prekomerno, kar lahko povzroči pojav mutacij v primarnih tumorjih in kopičenje le-teh v metastazah (9, 22). Sprva so raziskovalci proteine A3 povezali z vrstami raka, ki se razvijejo po kronični okužbi z onkogenimi virusi (HPV, EBV, HBV), vendar so mutacijski podpis proteinov AID/APOBEC kasneje odkrili tudi pri rakah, ki se niso razvili po predhodni virusni okužbi (23). Pri nekaterih vrstah tumorjev mutacije, ki jih povzročajo proteini A3, predstavljajo do 68 % celotnega mutacijskega bremena, zaznali pa so jih v več kot polovici vseh tumorjev (5). Mutacijski podpis proteinov AID/APOBEC je pri rakah drugi najpogostejši podpis, takoj za s starostjo povezanim mutacijskim podpisom (24). Pogoste so gonilne mutacije (angl. *driver mutations*) v onkogenih in tumor-supresorskih genih, ki sprožijo razvoj tumorja (9).

Izmed proteinov A3 je pri večini rakov najvišje izražen A3B, vendar se v posameznih vrstah raka čezmerno izražajo tudi drugi proteini A3. Glavna povzročiteljica mutacij sta A3A in A3B, od katerih ima A3A višjo katalitično aktivnost in je močnejši mutageni dejavnik (25), zato naj bi bile mutacije, ki jih povzroča A3A, približno desetkrat pogostejše od tistih, ki jih povzroči A3B (1). Čeprav so mutacije, ki jih povzročajo proteini A3, pomembne za nastanek tumorja, se jih veliko pojavi tudi kasneje med evolucijo raka, predvsem kot posledica epizodičnih zagonov povišane katalitične aktivnosti proteinov A3. S tem se v tumorjih povečata mutacijsko breme in njihova heterogenost. Tumor na ta način preide v agresivnejšo obliko, obenem pa se lahko razvije tudi odpornost na zdravljenje (20). Proteini A3 vplivajo na potek raka tudi preko uravnavanja imunskega odziva v tumorskem mikrookolju, saj lahko spodbujajo ali zavirajo imunski odziv (9). V rakavih celicah so na primer pokazali, da aktivnost proteinov A3 povzroči povišano izražanje gena *CD274*, ki kodira protein programirane celične smrti (angl. *programmed death-ligand 1*, PD-L1), ki po vezavi na receptor PD-1 vodi do zaviranja limfocitov T in s tem imunskega odziva proti rakavim celicam (9).

Izražanje proteina A3B je še posebej povišano pri raku sečnega mehurja, želodca, požiralnika, dojke, glave in vratu, prostate, maternice, materničnega vratu, jajčnikov, ledvic, pljuč ter pri različnih oblikah kožnega raka (26). Protein A3A je čezmerno izražen le občasno, skupaj z A3B pa kot že omenjeno oblikuje značilen mutacijski podpis proteinov AID/APOBEC, ki je še posebej izrazit pri raku dojke, sečnega mehurja, pljuč, materničnega vratu ter pri HPV-pozitivnemu raku glave in vratu (23).

V večini tkiv raka dojke čezmerno izražanje proteina A3B prispeva h kopičenju mutacij, vendar ima pri mutagenizi v tumorju manjšo vlogo kot A3A. Pri dednem raku dojke, povezanem z mutacijami v genu *BRCA*, je protein A3B pomemben vir mutacij, njegovo izražanje pa pozitivno korelira z mutacijskim bremenom, ki ga povzročajo proteini A3 (27). Čezmerna aktivnost proteina A3B pri raku dojke spodbuja aktivacijo imunskega odziva v tumorskem mikrookolju, kar pri bolnikih poviša infiltracijo in aktivacijo limfocitov T v tumorju. Kljub temu povišano izražanje proteina A3 pri bolnikih napoveduje slabšo prognozo, še posebej pri raku dojke z aktiviranim estrogenskim receptorjem (ER), znanem po tem, da tumorju omogoči izogib protirakavemu imunskemu odzivu (28), pri čemer A3B poviša izražanje *ER*. V primeru terapije z zaviralci imunskih kontrolnih točk pa aktivacija imunskega odziva pri raku dojke izboljša učinkovitost, saj povišana aktivnost proteinov A3A in A3B povzroči nastajanje novih antigenov, ki spodbudijo še močnejši imunski odziv, kar izboljša izid zdravljenja (29).

Veliko primerov raka materničnega vratu je posledica kronične okužbe z virusom HPV, ki značilno poviša izražanje proteinov A3 (1). Protivirusni učinek teh proteinov ter mutacije v genomu predvidoma prispevajo k razvoju bolezni. Čeprav povišana aktivnost proteinov A3 sprva spodbuja kancerogenezo, so pri bolnicah z rakom materničnega vratu ugotovili, da visoka raven A3A korelira z boljšim preživetjem. Predvidevajo, da A3A povzroči apoptozo rakavih celic in tako deluje citotoksično, hkrati pa zavira aktivacijo signalnih poti, ki spodbujajo rast in napredovanje tumorja, kot sta PI3K-Akt in MAPK (30).

3.2 PROTEINI APOBEC3 PRIPOMOREJO K RAZVOJU ODPORNOSTI NA PROTIRAKAVO TERAPIJO

Proteini A3 imajo vlogo pri evoluciji tumorjev, saj sčasoma povečujejo mutacijsko breme. V zadnjih letih so raziskave pokazale tudi, da imajo pomembno vlogo pri razvoju od-

pornosti na protirakavo terapijo (6). Odpornost na tarčno terapijo raka je posledica visokega mutacijskega bremena in heterogenosti tumorskih celic (31). Še posebej pa odpornost na terapijo povzročijo mutacije v genih specifičnih proteinov. Mutacija MEK2 L46F povzroči odpornost na zaviralce serinske/treoninske protein kinaze BRAF (homolog B virusnega onkogene v-Raf iz mišjega sarkoma, angl. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) pri melanomu (slika 3A), mutacija EGFR T790M pa odpornost na zaviralce receptorja za epidermalni rastni dejavnik (angl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) pri raku pljuč (slika 3B) (32, 33). Povišano izražanje proteina A3B je neposredno povezano z odpornostjo na zaviralce EGFR (34). Prav tako protein A3A prispeva h kopičenju mutacij v rakavih celicah, kar vodi v razvoj in evolucijo klonov, odpornih na zaviralce tirozinskih kinaz. Takšne celice preživijo zdravljenje in omogočijo nadaljnjo rast tumorja (6). Pri raku prostate protein A3B povzroča mutacije ključnih genov v tumorskih celicah, pri čemer izstopa gen *FOXA1*, katerega mutacije vodijo v odpornost na zdravljenje z zaviralci androgenskih receptorjev (slika 3C) (31). A3B pri ER+ raku dojke povzroči odpornost na zdravljenje s tamoksifenom, selektivnim modulatorjem ER, ki v tkivu dojke deluje kot antagonist ER (35). Proteina A3A in A3B pri ER+ raku dojke pripomoreta tudi k odpornosti na zdravljenje z zaviralci ER (npr. fulvestrant) ali na njihovo kombinacijo z zaviralci od ciklina odvisnih kinaz 4 in 6 (CDK4/6; angl. *cyclin-dependent kinases 4 and 6*; npr. abemaciclib in palbociclib). To lahko storita preko kopičenja mutacij v več različnih genih, povezanih z razvojem odpornosti pri raku dojke, npr. *RB1*, *ESR1* (mutacija E380Q), *ARID1A* ter *PIK3CA* (mutaciji E542K in E545K) (slika 3D) (36). Možna strategija preprečevanja razvoja odpornosti pri teh raki bi bila sočasna uporaba protirakave učinkovine in zaviralca proteinov A3A ali A3B (31).

4 PROTEINI APOBEC3 KOT TARČE IN BIOLOŠKI OZNAČEVALCI V TERAPIJI RAKA

Proteini A3 so pomemben dejavnik pri razvoju in napredovanju raka ter pri razvoju odpornosti na protirakavo terapijo, zato imajo te deaminaze velik potencial kot tarče in biološki označevalci v terapiji raka (9).

Izražanje proteinov A3 in njihov mutacijski podpis sta pri številnih raki povezana s kliničnimi izidi bolnikov, vključno

	A: melanom	B: pljučni rak	C: rak prostate	D: ER+ rak dojke
mutirani gen (mutacija v proteinu)	<i>MEK2</i> (L46F)	<i>EGFR</i> (T790M)	<i>FOXA1</i>	<i>RB1</i> <i>ESR1</i> (E380Q) <i>PIK3CA</i> (E542K in E545K) <i>ARID1A</i>
odpornost na zaviralce	zaviralci BRAF	zaviralci EGFR	zaviralci androgenskih receptorjev	zaviralci ER; kombinacija zaviralcev ER in CDK4/6
primer zdravila	vemurafenib dabrafenib	gefitinib erlotinib	enzalutamib	tamoksifen fulvestrant abemaciclib palbociclib

Slika 3: Proteini APOBEC3 s povzročanjem mutacij pripomorejo k odpornosti na protirakavo terapijo pri različnih vrstah tumorjev. Ustvarjeno s programom Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/r9ez89s>.

ARID1A – protein 1A, ki vsebuje z AT bogato interaktivno domeno, *BRAF* – homolog B virusnega onkogene v-Raf iz mišjega sarkoma, *CDK4/6* – od ciklina odvisni kinazi 4 in 6, *EGFR* – receptor za epidermalni rastni dejavnik, *ER* – estrogenski receptor (protein) oziroma *ESR1* – estrogenski receptor alfa (gen), *FOXA1* – protein A1 iz družine »Forkhead box«, *MEK2* – dvojno specifična kinaza 2, aktivirana z mitogenom, *PIK3CA* – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaza, katalitična podenota alfa, *RB1* – protein retinoblastoma.

Figure 3: Mutations caused by APOBEC3 proteins contribute to resistance to cancer treatment in various types of tumours. Created in Biorender. Videčnik, B. (2026) <https://BioRender.com/r9ez89s>.

ARID1A – AT-rich interactive domain-containing protein 1A, *BRAF* – v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, *CDK4/6* – cyclin-dependent kinases 4 and 6, *EGFR* – epidermal growth factor receptor, *ER* – estrogen receptor (protein) or *ESR1* – estrogen receptor alpha (gene), *FOXA1* – Forkhead box protein A1, *MEK2* – Dual specificity mitogen-activated protein kinase 2, *PIK3CA* – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, *RB1* – retinoblastoma protein.

z odzivi na zdravljenje. Zaradi tega so proteini A3 potencialni prognostični biološki označevalci. Lahko bi se uporabljali kot biološki označevalci pri klasični kemoterapiji, na primer s cisplatinom ali karboplatinom, ter pri imunoterapiji z zaviralci imunskih kontrolnih točk pri raku dojke, pljuč in sečnega mehurja. V vseh teh primerih obstajajo povezave med povišanim izražanjem proteinov A3 in boljšim odzivom na terapijo ter boljšo prognozo bolnikov (9).

Poleg tega bi lahko proteine A3 uporabili tudi kot biološke označevalce za napoved uspešnosti tarčne terapije raka ali za napoved razvoja odpornosti na zdravljenje. Povišano izražanje proteina A3B je povezano s slabšim odzivom na zaviralce družine proteinov RAF pri gliomih, določene mutacije, ki jih povzročajo proteini A3, pa napovedujejo odpornost na zdravljenje z zaviralci RAF pri multiplem mielomu, ter odpornost na zdravljenje z zaviralci EGFR pri raku pljuč (33, 37). Pri ER-pozitivnem raku dojke visoko izražanje A3B napoveduje odpornost na zdravljenje s tamoksifenom (35).

Ti primeri kažejo, da bi testiranje tumorjev na izražanje proteinov A3 ali na mutacijsko breme zaradi proteinov A3 lahko pomagalo pri odločitvah o zdravljenju raka. Kljub temu še vedno ostaja velik razkorak med uporabo proteinov A3 kot bioloških označevalcev v laboratoriju in njihove uvedbe v klinično prakso (9).

Pri terapiji raka bi bilo zaviranje proteinov A3 smiselno, saj proteini A3 spodbujajo kancerogenezo preko mutacij in drugih mehanizmov. Zaviralci proteinov A3 bi potencialno lahko preprečili ali vsaj upočasnili napredovanje raka v agresivnejšo obliko. Še posebej bi bili koristni pri raki, kjer je povišano izražanje proteinov A3 povezano s slabšo prognozo. Uporaba zaviralcev bi omejila evolucijo tumorja, zmanjšala heterogenost tumorskih celic in preprečila razvoj odpornosti na terapijo (20). Zaviralci proteinov A3 trenutno še niso na voljo za klinično uporabo, zato je potreben razvoj učinkovitih zdravilnih učinkovin. Raziskovalci so že odkrili male molekule, ki ciljajo aktivno mesto proteinov

AID, A3A in A3B, kar bi lahko služilo kot osnova za razvoj specifičnih zaviralcev (38). Drugi način zaviranja temelji na zaviranju citidinskih deaminaz z analogi 2'-deoksizetabularina, ki se vgradijo v enoverižno DNA in delujejo kot kompetitivni zaviralci encimske aktivnosti (39). Poleg tega obstaja možnost uporabe selektivnih alosteričnih modulatorjev encimov, ki so jih identificirali z virtualnim rešanjem (40).

Kot že omenjeno, dosedanje raziskave namigujejo, da proteini A3 vplivajo na učinkovitost imunoterapije raka. Povečano mutacijsko breme spodbuja nastanek novih antigenov in aktivacijo imunskega odziva, hkrati pa mutacije povečajo izražanje PD-L1, kar še dodatno poveča občutljivost in odzivnost tumorjev. Potencialno ciljano spodbujanje izražanja proteinov A3 bi lahko izboljšalo učinkovitost imunoterapije. Prav tako bi tak pristop lahko povzročil poškodbe DNA samo v rakavih celicah, kar bi sprožilo apoptozo in imelo citotoksičen učinek. Obenem bi s spodbujanjem izražanja A3 lahko izboljšali učinkovitost drugih genotoksičnih zdravil, povečano izražanje A3 namreč izboljša občutljivost rakavih celic na kemoterapijo s cisplatinom ter povečuje odzivnost na zaviralce odziva na poškodbo DNA (9).

5 SKLEP

Proteini AID/APOBEC z deaminacijo citidina preurejajo enoverižno DNA in RNA ter povzročijo tranzicijo (mutacija C v T; SBS2) ali transverzijo (mutacija C v G; SBS13). Imajo ključno vlogo pri delovanju imunskega sistema, saj služijo kot obramba pred virusnimi okužbami. Ob neustreznih regulaciji povzročajo netarčne mutacije po celotnem genomu in lahko vodijo v razvoj raka. Mutacije, ki jih povzročajo proteini A3, tako lahko predstavljajo kar do 68 % celotnega mutacijskega bremena v tumorjih. Glavna povzročiteljica mutacij sta pri večini rakov proteina A3A in A3B, ki poleg nastanka rakavih celic kasneje vodita tudi evolucijo tumorja, s čimer ta preide v agresivnejšo obliko z večjo heterogenostjo rakavih celic, lahko pa se razvije tudi odpornost na zdravljenje. Intenzivne raziskave na področju razvoja zaviralcev proteinov A3A in A3B kažejo, da so izjemno obetavni za razvoj zdravil in da imajo velik terapevtski potencial in možnost prihodnje uporabe v klinični praksi. Pred uvedbo zaviralcev A3A in A3B za zdravljenje pa je ključno natančno poznavanje celotnega spektra njunega delovanja. Med slednje sodi tudi poznavanje njunega vpliva na demetilacijo DNA, preko katere vplivata na izražanje genov.

6 IZJAVA

Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa (P4-0127) in raziskovalnega projekta (J3-70148), ki ju je sofinancirala Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

7 LITERATURA

1. Lovsin N, Gangupam B, Bergant Marusic M. The Intricate Interplay between APOBEC3 Proteins and DNA Tumour Viruses. *Pathogens*. 2024;13(3).
2. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(7):578-94.
3. Siriwardena SU, Chen K, Bhagwat AS. Functions and Malfunctions of Mammalian DNA-Cytosine Deaminases. *Chem Rev*. 2016;116(20):12688-710.
4. Modestov A, Buzdin A, Suntsova M. Unveiling RNA Editing by ADAR and APOBEC Protein Gene Families. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2025;30(4):26298.
5. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet*. 2013;45(9):970-6.
6. Isozaki H, Sakhtemani R, Abbasi A, Nikpour N, Stanzione M, Oh S, et al. Therapy-induced APOBEC3A drives evolution of persistent cancer cells. *Nature*. 2023;620(7973):393-401.
7. DeWeerd RA, Nemeth E, Poti A, Petryk N, Chen CL, Hyrien O, et al. Prospectively defined patterns of APOBEC3A mutagenesis are prevalent in human cancers. *Cell Rep*. 2022;38(12):110555.
8. Dadush A, Merdler-Rabinowicz R, Gorelik D, Feiglin A, Buchumenski I, Pal LR, et al. DNA and RNA base editors can correct the majority of pathogenic single nucleotide variants. *NPJ Genom Med*. 2024;9(1):16.
9. Butler K, Banday AR. APOBEC3-mediated mutagenesis in cancer: causes, clinical significance and therapeutic potential. *J Hematol Oncol*. 2023;16(1):31.
10. Harris RS. Molecular mechanism and clinical impact of APOBEC3B-catalyzed mutagenesis in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):8.
11. Bergstrom EN, Luebeck J, Petljak M, Khandekar A, Barnes M, Zhang T, et al. Mapping clustered mutations in cancer reveals APOBEC3 mutagenesis of ecDNA. *Nature*. 2022;602(7897):510-7.
12. Teperek-Tkacz M, Pasque V, Gentsch G, Ferguson-Smith AC. Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction*. 2011;142(5):621-32.
13. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52353-60.



14. Suspene R, Aynaud MM, Vartanian JP, Wain-Hobson S. Efficient deamination of 5-methylcytidine and 5-substituted cytidine residues in DNA by human APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS One*. 2013;8(6):e63461.
15. Budzko L, Jackowiak P, Kamel K, Sarzynska J, Bujnicki JM, Figlerowicz M. Mutations in human AID differentially affect its ability to deaminate cytidine and 5-methylcytidine in ssDNA substrates *in vitro*. *Sci Rep*. 2017;7(1):3873.
16. Prasad R, Yen TJ, Bellacosa A. Active DNA demethylation-The epigenetic gatekeeper of development, immunity, and cancer. *Adv Genet (Hoboken)*. 2021;2(1):e10033.
17. Franchini DM P-MS. AID and APOBEC deaminases: balancing DNA damage in epigenetics and immunity. *Epigenomics*. 2014;6(4):427-43.
18. Cakan E, Gunaydin G. Activation induced cytidine deaminase: An old friend with new faces. *Front Immunol*. 2022;13:965312.
19. Kriszbacher BA, Gerber D, Levanon EY. DNA Editing by APOBECs: A Genomic Preserver and Transformer. *Trends Genet*. 2016;32(1):16-28.
20. Swanton C, McGranahan N, Starrett GJ, Harris RS. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discov*. 2015;5(7):704-12.
21. Pecori R, Di Giorgio S, Paulo Lorenzo J, Nina Papavasiliou F. Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. *Nat Rev Genet*. 2022;23(8):505-18.
22. Carpenter MA, Temiz NA, Ibrahim MA, Jarvis MC, Brown MR, Argyris PP, et al. Mutational impact of APOBEC3A and APOBEC3B in a human cell line and comparisons to breast cancer. *PLoS Genet*. 2023;19(11):e1011043.
23. Law EK, Levin-Klein R, Jarvis MC, Kim H, Argyris PP, Carpenter MA, et al. APOBEC3A catalyzes mutation and drives carcinogenesis *in vivo*. *J Exp Med*. 2020;217(12).
24. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
25. Petljak M, Dananberg A, Chu K, Bergstrom EN, Striepen J, von Morgen P, et al. Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells. *Nature*. 2022;607(7920):799-807.
26. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet*. 2013;45(9):977-83.
27. Cortez LM, Brown AL, Dennis MA, Collins CD, Brown AJ, Mitchell D, et al. APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer. *PLoS Genet*. 2019;15(12):e1008545.
28. Nicolini A, Rossi G, Ferrari P. Experimental and clinical evidence in favour of an effective immune stimulation in ER-positive, endocrine-dependent metastatic breast cancer. *Front Immunol*. 2024;14:1225175.
29. Sammons S, Raskina K, Danziger N, Alder L, Schrock AB, Venstrom JM, et al. APOBEC Mutational Signatures in Hormone Receptor-Positive Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Cancers Are Associated With Poor Outcomes on CDK4/6 Inhibitors and Endocrine Therapy. *JCO Precis Oncol*. 2022;6:e2200149.
30. Li Z, He H, Ren X, Chen Y, Liu W, Pu R, et al. APOBEC3A suppresses cervical cancer via apoptosis. *J Cancer*. 2023;14(18):3429-43.
31. Li X, Wang Y, Deng S, Zhu G, Wang C, Johnson NA, et al. Loss of SYNCRIP unleashes APOBEC-driven mutagenesis, tumor heterogeneity, and AR-targeted therapy resistance in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2023;41(8):1427-49 e12.
32. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov*. 2014;4(1):94-109.
33. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014;11(8):473-81.
34. Caswell DR, Gui P, Mayekar MK, Law EK, Pich O, Bailey C, et al. The role of APOBEC3B in lung tumor evolution and targeted cancer therapy resistance. *Nat Genet*. 2024;56(1):60-73.
35. Law EK, Sieuwerts AM, LaPara K, Leonard B, Starrett GJ, M. MA, et al. The DNA cytosine deaminase APOBEC3B promotes tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. *Sci Adv*. 2016;2(10).
36. Gupta A, Gazzo A, Selenica P, Safonov A, Pareja F, da Silva EM, et al. APOBEC3 mutagenesis drives therapy resistance in breast cancer. *NatGenet*. 2025;57(6):1452-1462.
37. Vo JN, Wu YM, Mishler J, Hall S, Mannan R, Wang L, et al. The genetic heterogeneity and drug resistance mechanisms of relapsed refractory multiple myeloma. *Nat Commun*. 2022;13(1):3750.
38. King JJ, Borzooee F, Im J, Asgharpour M, Ghorbani A, Diamond CP, et al. Structure-Based Design of First-Generation Small Molecule Inhibitors Targeting the Catalytic Pockets of AID, APOBEC3A, and APOBEC3B. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(4):1390-407.
39. Kvach MV, Barzak FM, Harjes S, Schares HAM, Jameson GB, Ayoub AM, et al. Inhibiting APOBEC3 Activity with Single-Stranded DNA Containing 2'-Deoxyzebularine Analogues. *Biochemistry*. 2019;58(5):391-400.
40. Jones KFM, Demir O, Wyllie MK, Grillo MJ, Morris C, Hirakis SP, et al. Development of Allosteric Small Molecule APOBEC3B Inhibitors from In Silico Screening. *bioRxiv*. 2024;2024.04.25.591187.