

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Úloha transkripčních
faktorů FOXO v biologii
normálních a maligních
B lymfocytů**

Bakalářská práce

PETRA PAVELKOVÁ

Vedoucí práce: Mgr. Laura Ondrišová

Ústav experimentální biologie
Program Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Brno 2022

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Petra Pavelková
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Úloha transkripčních faktorů FOXO v biologii normálních a maligních B lymfocytů

Studijní program: Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Vedoucí práce: Mgr. Laura Ondrišová

Konzultant: doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Rok: 2022

Počet stran: 72

Klíčová slova: B buněčné malignity, B lymfocyty, BCR inhibitory, FOXO, PI3K/Akt, rezistence, transkripční faktory, tumor supresory

Bibliographic record

Author: Petra Pavelková
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The role of FOXO transcription factors in the biology of normal and malignant B lymphocytes

Degree Programme: Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: Mgr. Laura Ondrišová

Consultant: doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 72

Keywords: B cell malignancies, B lymphocytes, BCR inhibitors, FOXO, PI3K/Akt, resistance, transcription factors, tumor suppressors

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je shrnutí významu transkripčních faktorů FOXO v procesech vývoje, funkce a také maligního zvratu B lymfocytů. Věnuje se regulaci aktivity FOXO v kontextu B lymfocytů, ve které stěžejní úlohu sehrává signální dráha PI3K/Akt. Různá míra aktivity této signalizace v určitých fázích vývoje B lymfocytů pak ovlivňuje transkripční aktivitu FOXO, a tedy i expresi jejich cílových genů. Za přežití a diferenciaci hematopoetických kmenových buněk zodpovídá FOXO3a, zatímco dalších procesy vývoje B lymfocytů pak závisejí převážně na aktivitě FOXO1. Ten ovlivňuje V(D)J rekombinaci, vymezení zralých B buněk do příslušných subpopulací a také afinitní maturaci v germinálních centrech. Výsledkem těchto složitých vývojových procesů je vznik plazmatických buněk, u kterých musí být aktivita FOXO3a, resp. FOXO1, také přísně regulována. Tato práce se dále zabývá patogenezí B buněčných malignit, k níž také přispívá deregulace aktivity FOXO1 či FOXO3a. V souladu s dřívějšími poznatky sehrávají FOXO u řady těchto onemocnění úlohu tumor supresorů. Jejich aktivita či exprese je zde různými mechanismy inhibována, a to např. zvýšenou signalizací PI3K/Akt či prostřednictvím specifických mikroRNA. FOXO1 však u určitých lymfoidních neoplazií, například u Burkittova lymfomu či chronické lymfocytární leukémie, vykazuje i onkogenní aktivitu. U těchto malignit se tak z FOXO1 samotného, či některých jeho transkripčních cílů, stávají potenciální terapeutické cíle.

Abstract

The goal of this thesis is to summarize the importance of FOXO transcription factors in development, function, and malignant transformation of B lymphocytes. It describes the regulation of FOXO activity in B lymphocytes, in which the PI3K/Akt signalling plays a major role. Different levels of activity of this signalling pathway in distinct phases of B cell development influence the transcriptional activity of FOXOs and therefore the expression of their target genes. FOXO3a is responsible for survival and differentiation of hematopoietic stem cells, whereas other processes of B cell differentiation are dependent mainly on FOXO1 activity. These include V(D)J recombination, development of distinct mature B cell subpopulations and affinity maturation in germinal centres. The result of this complex development is generation of plasma cells, which also require strict regulation of FOXO1 and FOXO3a activity. Furthermore, this thesis describes pathogenesis of B cell malignancies, to which the deregulation of FOXO1 and FOXO3a activity also contributes. In accordance with former knowledge, FOXOs act as tumor suppressors in a number of these diseases. Their activity or expression are inhibited by various mechanisms, including increased PI3K/Akt signalling or specific microRNAs. In certain lymphoid neoplasia, such as Burkitt lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia, FOXO1 exhibits also oncogenic activity. This makes FOXO1 or some of its target genes potential candidates for targeted therapy.

ZADÁNÍ
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Studentka:	Petra Pavelková
Program:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Specializace:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Úloha transkripčních faktorů FOXO v biologii normálních a maligních B lymfocytů
Název práce anglicky:	The role of FOXO transcription factors in the biology of normal and malignant B lymphocytes
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Rodina transkripčních faktorů FOXO hraje významnou roli ve vývoji a funkci B lymfocytů, bez níž nejsou B lymfocyty schopny diferenciaci a maturace. Role v nádorové biologii B lymfocytů není zatím zcela objasněna; i když původní experimenty označují FOXO transkripční faktory jako tumor supresory, v posledních letech jsou popisovány i jejich onkogenní vlastnosti. Úkolem této bakalářské práce bude shrnout poznatky o transkripčních faktorech FOXO, popsat jejich strukturu, regulaci a funkci, a to zejména v kontextu biologie B a T lymfocytů a patogeneze B buněčných malignit.

Vedoucí práce:	Mgr. Laura Ondříšová
Konzultant:	doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.
Datum zadání práce:	22. 9. 2021
V Brně dne:	14. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Petra Pavelková, 20. 10. 2021

Mgr. Laura Ondříšová, 20. 10. 2021

RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 20. 10. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pod dohledem vedoucí práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 14. května 2022



Petra Pavelková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Lauře Ondrišové a svému konzultantovi doc. MUDr. Mgr. Marku Mrázovi, Ph.D., za jejich čas, ochotu, trpělivost a cenné rady, které významně přispěly ke zdárnému dokončení této práce.

Obsah

Úvod	14
1 Struktura	15
2 Regulace	17
2.1 Regulace na úrovni transkripce, posttranskripční regulace	17
2.2 Regulace prostřednictvím posttranslačních modifikací.....	18
3 Vývoj B lymfocytů	22
4 FOXO v biologii normálních B lymfocytů	25
4.1 Hematopoetické kmenové buňky a příslušnost k B buněčné linii.....	25
4.2 V(D)J rekombinace a editace receptoru.....	26
4.3 Zralé B buňky a jejich subpopulace	28
4.4 Procesy v germinálních centrech.....	30
4.5 Plazmatické a paměťové buňky	33
5 FOXO v biologii maligních B lymfocytů	34
5.1 Chronická lymfocytární leukémie	34
5.2 Burkittův lymfom.....	37
5.3 Folikulární lymfom.....	39
5.4 Difuzní velkobuněčný B lymfom	40
5.5 Lymfom z pláštěvých buněk	42
5.6 Hodgkinův lymfom.....	42
5.7 Mnohočetný myelom a Waldenströмова makroglobulinémie.....	44
Závěr	46
Literatura	48

Seznam zkratek

AFX	– All-1 fusion partner on chromosome X, FOXO4
<i>Aicda</i>	– gen pro AID
AID	– aktivací indukovaná cytidin deamináza
Akt/PKB	– proteinkináza B
APRIL	– proliferaci indukující ligand
ATM	– <i>Ataxia Teleangiectasia</i> mutated protein
BAFF	– B buněčný aktivační faktor
BAFF-R	– receptor pro B buněčný aktivační faktor
BCAP	– B-cell PI3K adapter protein
<i>BCL-2</i>	– gen pro B-cell lymphoma 2 protein
BCL-6	– B-cell lymphoma 6 protein
BCR	– B buněčný receptor
Bim	– BCL2-like 11 protein
BL	– Burkittův lymfom
BLNK	– B-cell linker
Btk	– Bruton's tyrosine kinase
<i>CARD11</i>	– gen pro caspase recruitment domain-containing protein 11
Casp3	– kaspáza 3
Casp7	– kaspáza 7
CCL/R, CXCL/R	– označení tříd chemokinových ligandů/receptorů
CBP	– cAMP-response element binding protein (CREB)-binding protein
CD-	– cluster of differentiation, označení povrchových molekul
CIC	– cancer initiating cells
CITED2	– Cbp/p300-interacting transactivator 2
CLL	– chronická lymfocytární leukémie
CLP	– společný lymfoidní progenitor
c-MYC	– cellular myelocytomatosis oncogene
CSR	– class switch recombination, izotypový přesmyk

DAF-16	– dauer defective gene 16, ortolog FOXO u <i>C. elegans</i> ,
DBD	– DNA-vazebná doména
DEB	– vazebný element pro členy rodiny DAF-16
DLBCL	– difuzní velkobuněčný lymfom
DZ	– tmavá zóna germinálních center
EA2	– transcription factor 3
EBF	– early B cell factor
EBV	– virus Epsteina-Barrové
ELP	– časný lymfoidní progenitor
<i>Erag</i>	– enhancer genu pro RAG
ERK	– extracellular-signal-regulated kinase
FasL	– Fas ligand
FDC	– folikulární dendritické buňky
FKHR	– forkhead homolog in rhabdomyosarcoma, FOXO1
FKHRL1	– forkhead homolog in rhabdomyosarcoma-like 1, FOXO3a
FL	– folikulární lymfom
FO	– folikulární lymfocyty
FOXO	– forkhead box O
FOXP1	– forkhead box P1
GAB1	– GRB2-associated-binding protein
GADD45 α	– growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha
GIT	– gastrointestinální trakt
GSK3	– glycogen synthase kinase 3
H3K4	– histone H3 lysine 4
H3K9	– histone H3 lysine 9
HEB	– HeLa E-box binding protein
HSC	– hematopoetic stem cells, hematopoetické kmenové buňky
IGF1	– insulin-like growth factor
IGF1R	– insulin-like growth factor 1 receptor
<i>Igflr</i>	– gen pro insulin-like growth factor 1 receptor

IgH	– těžký imunoglobulinový řetězec
IgL	– lehký imunoglobulinový řetězec
IgV _H	– variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce
IL	– označení cytokinů interleukinů
IL-7R	– receptor pro interleukin 7
IRE	– inzulin-responzivní element
IRF4	– interferon regulatory factor 4
IRF8	– interferon regulatory factor 8
Ki-67	– proliferation marker protein Ki-67
LMPP	– pluripotentní lymfoidní progenitory
Lyn	– Lck/Yes novel tyrosine kinase
LZ	– světlá zóna germinálních center
m7-FLIPI	– klinické skóre FLIPI (follicular lymphoma international prognostic index) zahrnující mutační status 7 genů
MAPK	– mitogenem aktivované proteinkinázy
MCL	– lymfom z plášťových buněk
MCL1	– myeloid cell leukemia 1 protein
miRNA	– mikroRNA
MM	– mnohočetný myelom
mTORC1/C2	– mammalian target of rapamycin complex 1/2
MYD88	– myeloid differentiation primary response gene 88
MZ	– marginální zóna
NES	– nuclear export sequence, sekvence pro export z jádra
NF-κB	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHL	– nehodgkinské lymfomy
NLS	– sekvence pro jadernou lokalizaci
Notch2	– neurogenic locus notch homolog protein 2
NOXA	– phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 gene
p27 ^{kip1}	– cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	– tumorsupresorový protein p53
PAX5	– paired box 5 protein

PDK	– phosphoinositide-dependent kinase
PHLPP2	– PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2
PI3K	– fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₃	– fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PLC γ 2	– fosfolipáza C gamma 2
PMBL	– primární mediastinální velkobuněčný B lymfom
PP2A	– protein phosphatase 2
PRDM1	– PR domain zinc finger protein 1
PTEN	– phosphatase and tensin homolog
PU.1	– Spi-1 proto-oncogene protein
<i>PUMA</i>	– p53 upregulated modulator of apoptosis gene
<i>Rag</i>	– recombination activating gene
RAG1/2	– recombination activating protein 1/2, V(D)J rekombináza
Rb2/p130	– retinoblastoma-related protein 2
ROS	– reactive oxygen speicies, reaktivní formy kyslíku
RSS	– recombination signal sequences
SHM	– somatic hypermutation, somatická hypermutace
siRNA	– small interfering RNA
<i>Spred2</i>	– sprouty related EVH1 domain containing 2
STAT3	– signal transducer and aktivátor of transcription 3
Syk	– spleen tyrosine kinase
TAD	– transaktivační doména
TFH	– folikulární pomocné T lymfocyty
TLR	– Toll-like receptor
V(D)J	– variable, diversity a joining segmenty genů pro imunoglobuliny
VLA4	– very late antigen 4
WM	– Waldenströмова makroglobulinémie
ZAP-70	– zeta-chain-asspciated protein 70
Zfp318	– zinc finger protein 318

Úvod

Transkripční faktory FOXO sehrávají významnou úlohu v regulaci buněčné proliferace, odolnosti buněk vůči oxidačnímu stresu a udržování homeostázy. Jejich cílovými geny jsou zejména ty inhibující buněčný cyklus, ovlivňující odpověď buňky na poškození DNA či kódující antioxidantní enzymy. Pro správný průběh těchto procesů je klíčové, aby byla transkripční aktivita FOXO přísně regulována. Děje se tomu tak prostřednictvím řady mechanismů, z nichž nejvýznamnější postavení zauímají posttranslační modifikace, zejména pak fosforylace.

U člověka se vyskytují celkem čtyři zástupci této proteinové rodiny, z nichž jsou v B lymfocytech v nejvyšší míře exprimovány FOXO1 a FOXO3a. Jejich aktivita se napříč jednotlivými vývojovými stadii liší, přičemž nejvýznamnější postavení v regulaci aktivity FOXO1 a FOXO3a zde zaujímá signální dráha PI3K/Akt, která je u B buněk napojena na řadu povrchových receptorů. Tato skutečnost podtrhuje význam komunikace s mikroprostředím v regulaci správného průběhu diferenciaci B buněčných prekurzorů, pro který je klíčové i správné načasování aktivity transkripčních faktorů FOXO. Ta je nepostradatelná pro udržení poolu hematopoetických kmenových buněk, pro procesy vedoucí k vytvoření unikátního povrchového B buněčného receptoru a také pro afinitní maturaci v germinálních centrech, která dává vznik plazmatickým buňkám produkujícím vysoce afinní protilátky.

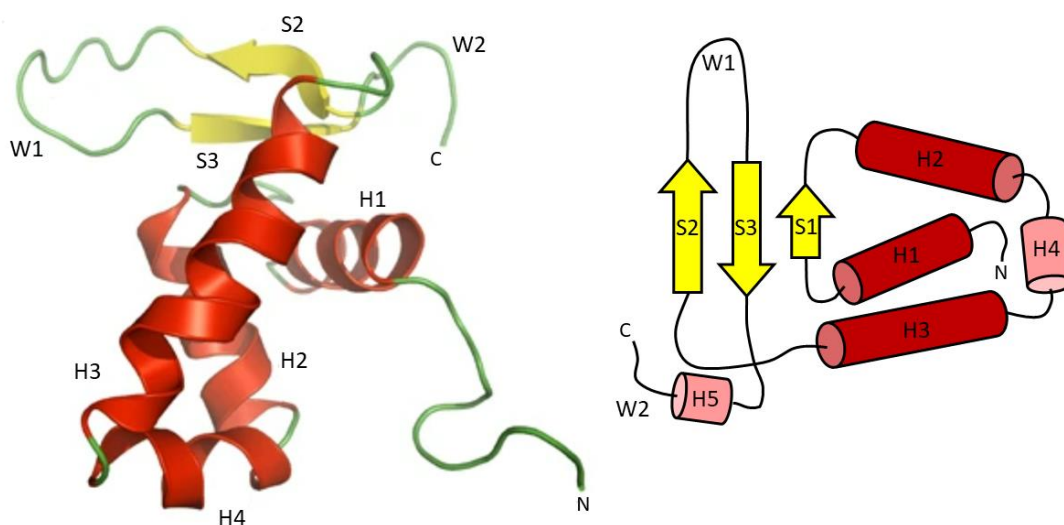
Pro svůj inhibiční účinek na proliferaci a průběh buněčného cyklu byly FOXO považovány výhradně za tumor supresory. Skutečně je inhibice jejich aktivity, převážně v důsledku zvýšené signalizace PI3K/Akt, podkladem patogeneze řady B buněčných malignit. FOXO1 však může u některých těchto onemocnění naopak podporovat jednak samotnou proliferaci maligních buněk, jednak také zpříčiňovat vznik rezistence cílenou terapii pomocí malých molekulových inhibitorů signální dráhy BCR. Míra exprese FOXO1, resp. FOXO3a, v maligních B lymfocytech může být také asociována se závažností těchto onemocnění a představuje tak potenciální prognostický marker.

Zdá se tedy, že skutečný význam transkripčních faktorů FOXO v B lymfocytech závisí na řadě faktorů a případná deregulace jejich aktivity může vést k defektnímu vývoji či malignímu zvratu B lymfocytů.

1 Struktura

Rodina transkripčních faktorů Fox, celým názvem Forkhead box, je jednou z nejzastoupenějších skupin transkripčních faktorů v lidských buňkách (Nakagawa *et al.*, 2013). Lze je rozdělit do 17 podrodin, přičemž každá je na základě aktuální nomenklatury označena určitým písmenem (Brent *et al.*, 2008). Do příslušných podrodin jsou proteiny Fox zařazeny na základě sekvence aminokyselin v jejich tzv. forkhead doméně (Hansen *et al.*, 2007).

Forkhead doména, označovaná dle své funkce také jako DNA-vazebná doména (DBD), je společným znakem všech zástupců rodiny Fox. Tato obvykle přibližně 110 aminokyselin dlouhá oblast proteinového řetězce se skládá do tří α -helixů (H1-H3), krátkého β -listu tvořeného třemi antiparalelními řetězci (S1-S3) a dvou ohybů (W1 a W2) připomínajících křídla. Tyto struktury jsou uspořádány v následujícím pořadí: H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (Psenakova *et al.*, 2019). Terciární struktura tvoří variantní motiv helix-otáčka-helix, zvaný „winged helix“ (Hatta *et al.*, 2007). Prostorové uspořádání a topologické schéma DBD představuje obrázek 1.



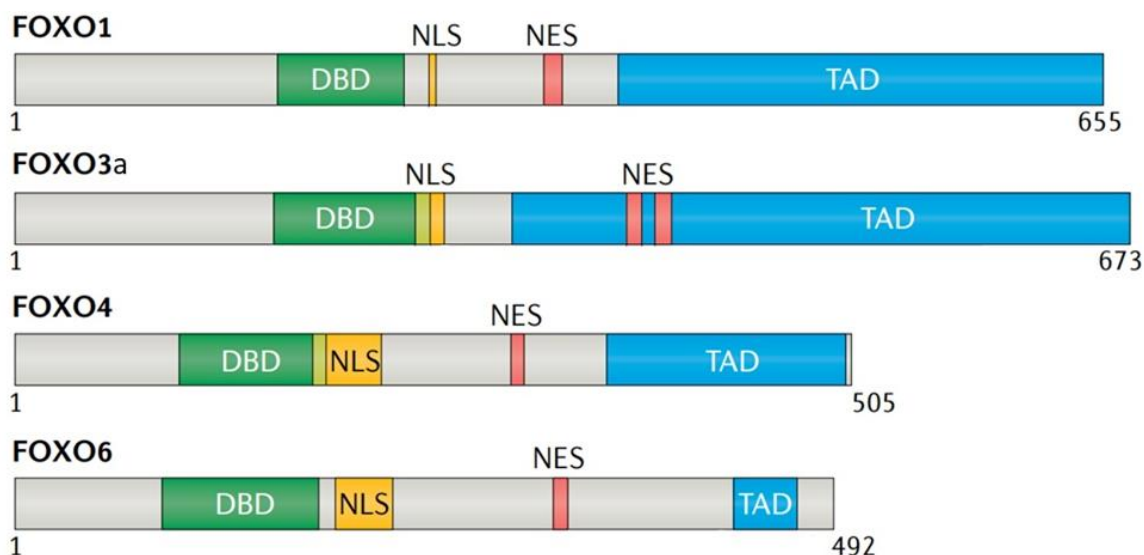
Obrázek 1: Struktura DBD domény FOXO4 (vlevo) a obecné schéma topologie DBD všech transkripčních faktorů FOXO (vpravo). Helixy (H, helix) znázorněny červeně, β -listy (S, sheet) žlutě a ohyby (W, wing) zeleně. Helixy H4 a H5 znázorněny světle, jelikož se vyskytují jen u některých DBD (Obsil *et al.*, 2008; upraveno).

Proteiny Fox třídy „O“, dále jen FOXO, mají na rozdíl od ostatních tříd 5 aminokyselin dlouhou inzerci mezi helixy H2 a H3. DBD všech proteinů FOXO rozeznávají shodné

sekvence: 5'-GTAAACAA-3', také známou jako vazebný element pro členy rodiny DAF-16 (DEB), a 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', tedy inzulin-responzivní element (IRE). Tato odpovídá sekvenci 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' rozpoznávanou všemi zástupci rodiny Fox (Psenakova *et al.*, 2019). Zmíněný protein DAF-16 je ortolog savčích transkripčních faktorů FoxO u *Caenorhabditis elegans* (Jacobs *et al.*, 2003). U savců se vyskytují čtyři zástupci této třídy, a to FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX) a FOXO6 (Wang *et al.*, 2008).

Hlavním prvkem zodpovědným za rozpoznání cílové sekvence DNA a následné navázání do velkého žlábků je helix H3 (Nakagawa *et al.*, 2013). Vazby na DNA se účastní také ohyb W1, ohyb mezi helixy H4 a H3 a N-koncový úsek řetězce před helixem H1. Všechny proteiny rodiny Fox se k dvoušroubovici DNA váží jako monomery (Psenakova *et al.*, 2019).

Mezi méně evolučně konzervované oblasti proteinů FOXO patří oblasti NLS a NES. Tyto jsou významné pro jadernou lokalizaci, resp. export z jádra. Mechanismy regulující subcelulární lokalizaci těchto TF budou popsány v následující kapitole. Na C-konci proteinového řetězce se nachází transaktivační doména (TAD), obsahující vazebná místa pro regulační proteiny. Vzájemně se od sebe jednotlivé FOXO odlišují mj. svou délkou, přičemž délka FOXO1 a FOXO3a přesahuje 650 aminokyselin, zatímco FOXO4 a FOXO6 jsou přibližně o 100 aminokyselin kratší (viz obrázek 2) (Dobson *et al.*, 2011; Obsil *et al.*, 2008).



Obrázek 2: Schéma domén FOXO proteinů. Zeleně DBD (DNA-vazebná doména), žlutě NLS (sekvence pro jadernou lokalizaci), červeně NES (sekvence pro export z jádra) a modře TAD (transaktivační doména) (Calissi *et al.*, 2021; upraveno).

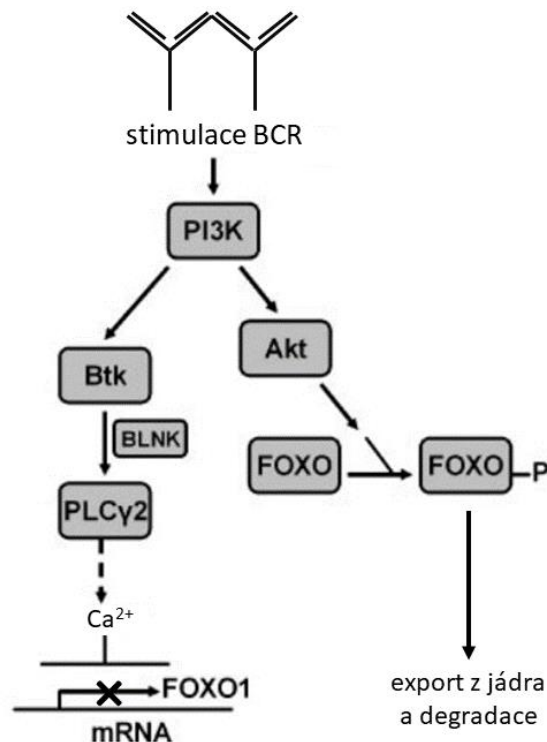
2 Regulace

2.1 Regulace na úrovni transkripce, posttranskripční regulace

Expresi FOXO1 v B buňkách indukují transkripční faktory HEB a EBF, aktivní během diferenciací lymfoidních progenitorů směrem do B buněčné linie (více viz kapitola 4) (Welinder *et al.*, 2011). Dalším transkripčním faktorem, podílejícím se na indukci exprese FOXO1 i FOXO3a, je STAT3 (Oh *et al.*, 2011). U zralých B buněk se na regulaci transkripce FOXO1 podílí i signalizace B buněčného receptoru. Signál je z BCR přenášen skrze PI3K, Btk a BLNK na PLC γ 2. Aktivita PLC γ 2 vede k mobilizaci Ca²⁺ iontů, čímž je aktivován kalcineurin, který následně způsobuje inhibici transkripce FOXO1 (Hinman *et al.*, 2007). FOXO1 je regulován BCR signalizací i na posttranslační úrovni (viz dále). Dvě úrovně regulace exprese FOXO1 prostřednictvím BCR jsou popsány na obrázku 3.

Zajímavostí je, že promotor FOXO1 obsahuje i vazebnou sekvenci specifickou pro transkripční faktory FOXO (viz kapitola 1), což naznačuje možnost regulace jeho exprese prostřednictvím dalších FOXO, včetně FOXO1 samotného (Essaghir *et al.*, 2009). Inhibice transkripce FOXO1 v důsledku aktivity FOXO3a již byla pozorována u lidských rakovinných buněk (Zhou *et al.*, 2014). V kontextu B lymfocytů by podobný regulační mechanismus mohl vysvětlovat nepřímou úměru mezi mírou exprese FOXO1 a FOXO3a, která je patrná jak u normálních B buněk, tak jejich maligních protějšků (viz dále).

Další mechanismus regulace hladin proteinů představují mikroRNA (miRNA), což jsou krátké jednořetězcové molekuly RNA schopné vazby ke komplementárním mRNA. Takové mRNA nemohou podstoupit translaci a dochází k jejich degradaci. Mezi miRNA inhibující translaci FOXO1 v B buňkách patří miR-96, miR-182 a miR-183, vyskytující se u Hodgkinova lymfomu. Expresi FOXO3a inhibuje miR-155, zaznamenaná jednak u Hodgkinova lymfomu, jednak u Waldenströmovy makroglobulinémie (Gaudette *et al.*, 2016; Osswald *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2012). Význam inhibice FOXO1, resp. FOXO3a, u těchto malignit podrobně popisuje kapitola 4.



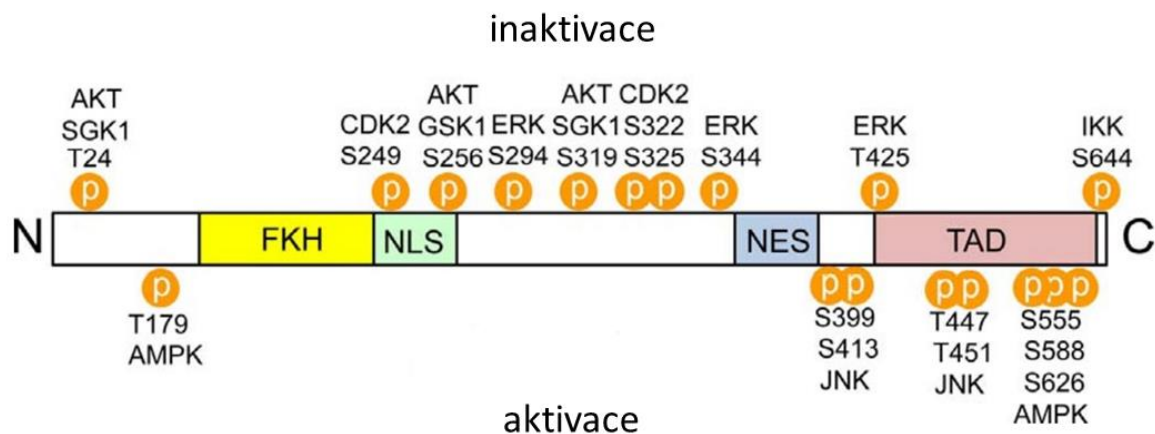
Obrázek 3: Dvě úrovně regulace FOXO1 prostřednictvím BCR. BCR signalizace inhibuje jednak transkripci FOXO1 prostřednictvím osy PI3K/Btk/BLNK/PLC γ 2, jejímž konečným efektem je kalcineurin inhibující transkripci FOXO1, jednak aktivitu již exprimovaného FOXO1, jelikož prostřednictvím PI3K/Akt indukuje jeho fosforylaci vedoucí k jeho následné degradaci v cytoplasmě (Hinman *et al.*, 2007; upraveno).

2.2 Regulace prostřednictvím posttranslačních modifikací

Stěžejní úlohu v regulaci FOXO sehrává jejich fosforylace, která může mít jak aktivační, tak inhibiční účinek. Aktivační fosforylace, zapříčiňující lokalizaci FOXO v jádře, kde může být transkripčně aktivní, způsobují kinázy související s odolností vůči oxidativnímu stresu. Naopak inhibiční transkripční aktivity a export FOXO z jádra způsobují fosforylace kinázami zapojenými do signálních kaskád růstových faktorů, z nichž nejvýznamnější postavení zaujímá kináza Akt (Dobson *et al.*, 2011). Přehled aktivujících, resp. inaktivujících, fosforylací a jejich efektorů shrnuje obrázek 4.

Akt je serin/threoninová kináza, která sehrává klíčovou úlohu v přežití řady buněčných typů. Je aktivována několika mechanismy, přičemž nejvýznamnějším je aktivace prostřednictvím kinázy PI3K. Tato je obecně napojena na signalizaci receptorů pro růstové faktory. U B buněk dochází k aktivaci PI3K díky signálům z povrchových receptorů, které jsou

klíčové pro jejich přežití, vývoj a funkci. Jedná se o BCR, TLR, CD40 a cytokinové receptory, např. IL7-R. Zde tedy probíhá druhý způsob regulace exprese FOXO1 prostřednictvím BCR, tentokrát na úrovni inhibice aktivity proteinu, a nikoliv jeho transkripce (viz výše). PI3K/Akt je aktivována díky transmembránovým proteinům CD19 a BCAP, které navazují na signální kinázy Syk a Lyn. K jejich fosforylaci dochází po aktivaci BCR navázáním antigenu (Andjelic *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2019; Limon *et al.*, 2012; Troutman *et al.*, 2012). Takto aktivovaná PI3K produkuje PIP₃, který se váže do tzv. „plecstrin homology“ domény Akt a PDK. Tato vazba se spolu s dalšími fosforylacemi, způsobenými PDK a mTORC2, podílí na aktivaci Akt (Brownawell *et al.*, 2001; Rena *et al.*, 1999; Sarbassov *et al.*, 2005).

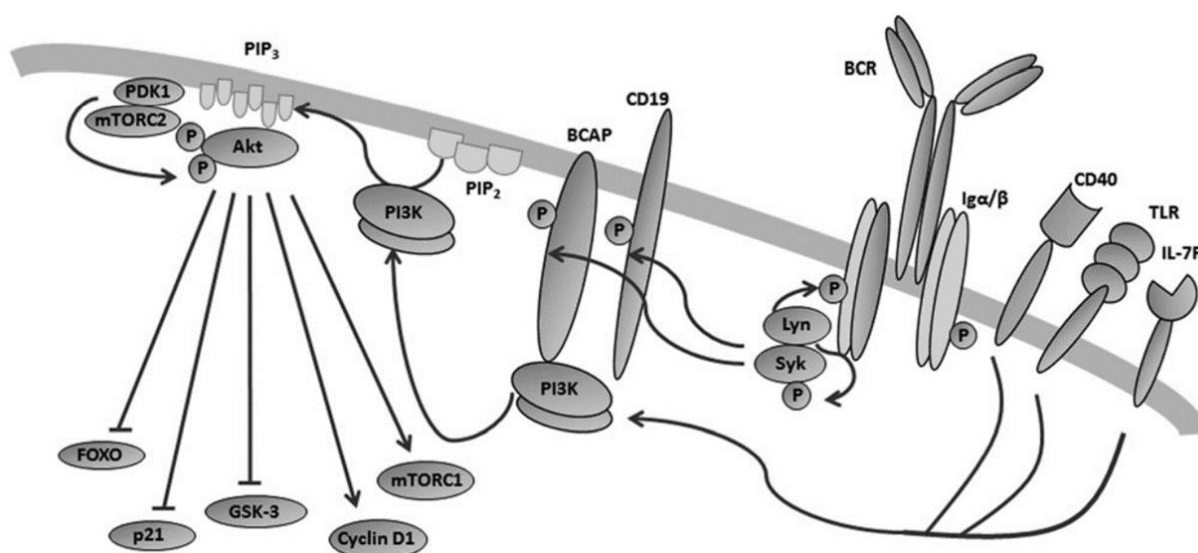


Obrázek 4: Místa fosforylace FOXO1 rozličnými kinázami vedoucí k jeho aktivaci, resp. inaktivaci (Ushmorov *et al.*, 2018; upraveno).

Fosforylace FOXO prostřednictvím aktivované Akt je umožněna přítomností tří specifických oblastí, obsahujících sekvenci RXXRXXS/T, kterou Akt rozpoznává. Jde o vysoce evolučně konzervovanou sekvenci, přítomnou jak u DAF-16, tak u všech jeho savčích protějšků (Brunet *et al.*, 1999). FOXO1 je fosforylován na Thr-24, Ser-256 a Ser-319, FOXO3 na Thr-32, Ser-253 a Ser-351 a FOXO4 na Thr-28, Ser-193 a Ser-258. U FOXO6 poslední místo fosforylace chybí a Akt jej fosforyluje na Thr-26 a Ser-184. Fosforylované FOXO jsou exportovány z jádra do cytosolu, což zapříčiňuje inhibici jejich transkripční aktivity (Brownawell *et al.*, 2001; Brunet *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 2003). Výše popsanou signální kaskádu sumarizuje obrázek 5.

Zadržení FOXO v cytosolu je zapříčiněno jejich interakcí s 14-3-3 proteiny, které se váží na fosforylované FOXO. Fosforylace vytvářejí pro 14-3-3 proteiny dvě vazebná místa, která ohraničují DBD a také stericky zakrývají NLS. Vazba 14-3-3 proteinů do příčných míst může ovlivňovat interakci DBD s DNA, zakrýt části této domény nebo změnit její konformaci. Přesný mechanismus vlivu těchto proteinů na transkripční aktivitu FOXO ale zatím zůstává neobjasněn. FOXO, nacházející se v důsledku popsaných procesů mimo jádro, mohou být následně degradovány v proteazomu (Dobson *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2008; Obsilova *et al.*, 2005; Silhan *et al.*, 2009).

Výše popsaná signální dráha PI3K/Akt je regulována prostřednictvím fosfatáz, což má za následek přerušení inhibičního účinku daných kináz na aktivitu FOXO. Příkladem fosfatázy s touto funkcí je PTEN, jejíž účinkem je defosforylace PIP₃, a jde tedy o antagonistu PI3K (Park *et al.*, 2019; Christensen *et al.*, 2011). Ztráta funkce PTEN naopak vede k vyšším hladinám PIP₃ v buňce, čili k zesílení aktivity Akt (Maehama *et al.*, 1998). Defosforylované mohou být i samotné FOXO, a to např. fosfatázami z rodiny PP2A. Experimentální použití inhibitorů PP2A mělo za následek zamezení defosforylace FOXO1, a tudíž inhibici jeho funkce. Interakci mezi PP2A a FOXO1 nebylo zabráněno přítomností 14-3-3 proteinů, které mj. chrání fosforylované proteiny před účinkem fosfatáz (Yan *et al.*, 2008). PP2A působí jako pozitivní regulátory aktivity FOXO také nepřímou, jelikož prostřednictvím defosforylace inhibují i Akt (Rivard *et al.*, 2020).



Obrázek 5: Signalizace PI3K/Akt u B lymfocytů (Szydłowski *et al.*, 2014; upraveno).

Kromě fosforylace se na regulaci aktivity transkripčních faktorů FOXO podílejí i další posttranslační modifikace. Příkladem může být monoubikvitinace FOXO4, podporující jeho lokalizaci v jádře, a tím i jeho transkripční aktivitu (Brenkman *et al.*, 2008). Acetylace, resp. deacetylace, může mít na FOXO aktivační i inhibiční účinek, přičemž patrně záleží i na konkrétních cílech FOXO. Acetylace v oblasti DBD totiž může ovlivňovat vazebnou specifitu. V tomto případě, na rozdíl od fosforylace, nejde o mechanismus vedoucí k plné aktivaci či inaktivaci FOXO, ale spíše modulaci jejich aktivity. Ta je patrně způsobena ztrátou pozitivních nábojů na lysinových zbytcích (Lys-242, Lys-245 a Lys-262) v důsledku připojení acetylové skupiny prostřednictvím acetyltransferázy CBP, což narušuje vazbu DBD FOXO1 do své cílové sekvence DNA. Acetylace FOXO1 také usnadňuje jeho fosforylaci prostřednictvím Akt. (Matsuzaki *et al.*, 2005). Různé posttranslační modifikace se tedy navzájem ovlivňují, a tak např. metylace argininových zbytků Arg-248 a Arg-250 u FOXO1 narušuje jeho fosforylaci prostřednictvím Akt, a chrání tak FOXO1 před exportem z jádra a degradací v proteazomu (Yamagata *et al.*, 2008). Obecně jsou posttranslační modifikace pro funkci FOXO velmi významné, ovlivňují jejich lokalizaci v rámci buňky, transkripční aktivitu, interakci s dalšími proteiny, stabilitu a degradaci. U B buněk se na regulaci FOXO nejvýznamněji podílí fosforylace prostřednictvím PI3K/Akt, jejíž význam jak v normálních, tak v maligních B buňkách bude popsán v následujících kapitolách.

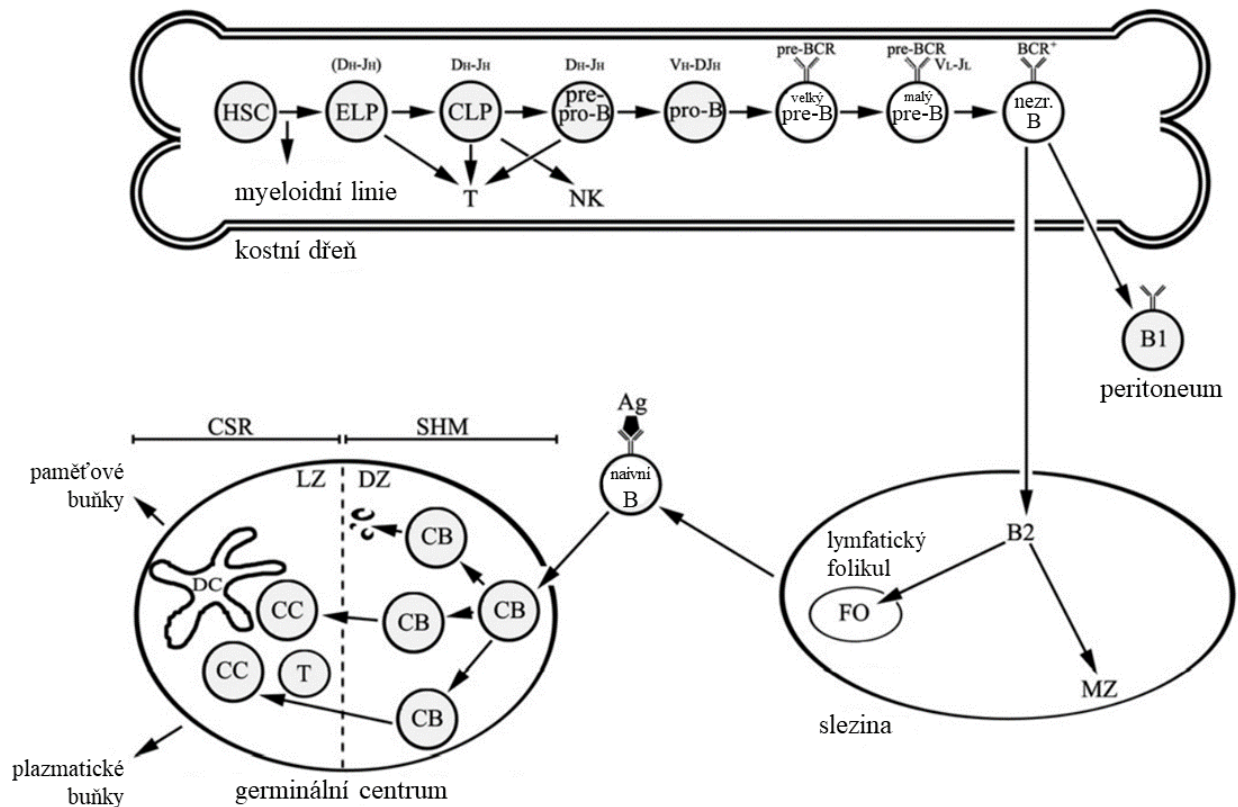
3 Vývoj B lymfocytů

Vývoj B lymfocytů je složitý proces, který značně závisí na interakcích buněčných prekurzorů s jejich okolím. Jeho správný průběh vyžaduje přesné načasování exprese specifických genů, čehož je docíleno prostřednictvím transkripčních faktorů (Akerblad *et Sigvardsson*, 1999). Níže popsáný průběh B buněčné diferenciaci shrnuje obrázek 6.

Jako všechny krevní elementy vznikají i B lymfocyty z hematopoetické kmenové buňky (HSC) v kostní dřeni. Zde jsou lymfocytární prekurzory v úzkém kontaktu se stromálními buňkami, které produkují cytokiny a růstové faktory nezbytné pro jejich přežití a diferenciaci. Mikroprostředí kostní dřene dotvářejí mezenchymální buňky, osteoblasty a endoteliální buňky spolu s extracelulární matrix. Prvními buňkami směřujícími do lymfoidní linie jsou pluripotentní lymfoidní progenitory (LMPP), ze kterých se dále diferencují společné lymfoidní progenitory (CLP). Za jejich vymezení do B buněčné linie zodpovídají transkripční faktory EA2 a EBF (O’Riordan *et Grosschedl*, 1999).

U následujících vývojových stadií dochází k přeskupování genových segmentů pro těžké imunoglobulinové řetězce (IgH). Tento proces se nazývá V(D)J rekombinace a jeho výsledkem je individuální variabilita receptorů B buněk. U pre-pro-B lymfocytu dochází nejprve k vyštěpení genového úseku mezi náhodným segmentem D a J, následně mezi tímto vzniklým DJ a segmentem V (Oettinger *et al.*, 1990). Celý proces je umožněn přítomností signálních sekvencí (RSS) v blízkosti jednotlivých segmentů. Tyto sekvence jsou rozpoznávány rekombinázami RAG1 a RAG2, které vytvářejí zlomy v DNA, čímž vyštěpují oblasti mezi vybranými segmenty (Scott *et al.*, 2010). Je-li přeskupení produktivní, vzniká expresí V(D)J produktu funkční IgH a toto vývojové stadium se označuje jako pre-B lymfocyt.

Povrchový pre-BCR následně dává buňce signál k dalšímu vývoji, a to k přeskupování V a J segmentů lehkých imunoglobulinových řetězců (IgL), které probíhá obdobně jako u IgH. Jakmile je tento proces úspěšný, je na povrchu buňky exprimován unikátní IgM. V případě, že povrchové imunoglobuliny některých buněk reagují s autoantigeny, jsou tyto nezralé B lymfocyty eliminovány nebo mohou být dané receptory znovu upraveny prostřednictvím RAG. U zralých B lymfocytů, představujících poslední stadium vývoje nezávislého na antigenu, je současně exprimován povrchový IgM i IgD, tj. BCR. Nejde ovšem o izotypový přesmyk (viz dále), nýbrž o alternativní sestřih (Hartley *et al.*, 1993; Verkoczy *et al.*, 2007).



Obrázek 6: Schéma vývoje B lymfocytů. HSC – hematopoetická kmenová buňka, ELP – časný lymfoidní progenitor, CLP – společný lymfoidní progenitor, T – T lymfocyty, NK – NK buňky, MZ – lymfocyty marginální zóny, FO – folikulární lymfocyty, Ag – antigen, DZ – tmavá zóna GC, CB – centroblasty, LZ – světlá zóna GC, CC – centrocyty, DC – dendritické buňky, SHM – somatická hypermutace, CSR – izotypový přesmyk (Szydłowski *et al.*, 2014; upraveno).

Zralé B lymfocyty opouštějí kostní dřeň a migrují do sleziny, kde plně dozrávají. Diferencují se buď do lymfocytů marginální zóny (MZ), nebo do lymfocytů folikulárních (FO). Folikuly, které se nacházejí i v dalších sekundárních lymfatických orgánech, vytvářejí potřebné mikroprostředí pro další vývoj B buněk po setkání s antigenem. Po rozpoznání antigenu prostřednictvím BCR dochází k aktivaci B buněk a jejich intenzivní proliferaci, čímž vznikají germinální centra (GC) (Victoria *et al.*, 2012). U těchto mikroanatomických struktur lze rozlišit dvě zóny – tmavou (DZ, dark zone) a světlou (LZ, light zone). Jde o velmi dynamické struktury, mezi kterými se buňky (centroblasty, resp. centrocyty) mohou přesouvat (Bannard *et al.*, 2013).

V DZ probíhá somatická hypermutace (SHM) variabilních oblastí IgH, jejíž výsledkem je zvýšení afinity protilátek proti danému antigenu. Tento proces zajišťuje aktivací indukovaná cytidin deamináza (AID), která během transkripce mění cytidin na uridin. Následně vlivem

nepřesných reparačních mechanismů dochází ke vzniku drobných mutací, a tedy ke zvýšení variability vznikajícího Ig. Těmito novými BCR vážou B buňky antigen prezentovaný folikulárními dendritickými buňkami (FDC) v LZ. Zde probíhá selekce pouze vysoce afinních B buněk, ostatní podléhají apoptóze (Bannard *et al.*, 2013). Podstatným krokem terminální diferenciací B lymfocytů je izotypový přesmyk (CSR). Samotný mechanismus CSR spočívá ve vyštěpování určitých C oblastí IgH řetězců na úrovni DNA. Výsledná třída Ig je určena první C oblastí ve směru transkripce, která zůstane nevyštěpena. Mezi jednotlivými C oblastmi se nacházejí signály přesmyku (S, switch sequence), ve kterých dochází ke dvouřetězcovým zlomům indukovaným AID. Přesmyk do konkrétní protilátkové třídy je regulován cytokiny, např. v reakci na přítomnost IL-21 dochází k produkci IgG₁ a IgG₃ (Pène *et al.*, 2004).

Buňky, které úspěšně prošly selekcí, opouštějí GC a dále se diferencují v buňky paměťové nebo plazmatické. Paměťové buňky jsou podkladem rychlosti a efektivity sekundární imunitní odpovědi. Úlohou plazmatických buněk je produkce velkého množství vysoce afinních protilátek (Casamayor-Palleja *et al.*, 1996).

4 FOXO v biologii normálních B lymfocytů

V předešlé kapitole již bylo zmíněno, že pro správný průběh vývoje B lymfocytů a následně jejich normální funkci je zásadní precizní regulace exprese řady specifických genů. Mezi transkripčními faktory, které tuto regulaci zajišťují, zaujímají zásadní postavení právě FOXO, zejména pak FOXO1 a FOXO3a, které jsou u buněk B buněčné linie exprimovány ve vyšší míře ve srovnání s FOXO4 a FOXO6. Míra exprese FOXO1, resp. FOXO3a, se napříč jednotlivými vývojovými stadii liší, což odráží rozdílnou potřebu jejich transkripční aktivity v konkrétních procesech. Obecně lze říci, že FOXO3a je klíčový především v raných fázích diferenciaci, na rozdíl od FOXO1, který se podílí jak na procesech nezávislých na přítomnosti antigenu, tak v dalších fázích vývoje po aktivaci B buněk. Podrobněji je význam obou těchto transkripčních faktorů pro vznik a řádnou funkci B lymfocytů popsán v této kapitole.

4.1 Hematopoetické kmenové buňky a příslušnost k B buněčné linii

HSC mají, stejně jako ostatní kmenové buňky, dvě základní vlastnosti, kterými jsou schopnost sebeobnovy, tj. zachování populace, a diferenciaci do příslušných buněčných typů. Zachování dynamické rovnováhy mezi těmito procesy zahrnuje přísnou regulaci buněčného cyklu, apoptózy a odpovědi na oxidační stres (Tothova *et al.*, 2007). Právě zde sehrává důležitou roli transkripční faktor FOXO3a.

V kostní dřeni setrvávají HSC v klidovém stavu, kdy není aktivována kináza Akt, a FOXO3a je tak lokalizován v jádře. Stimulace růstovými faktory vede aktivaci Akt, která fosforylací inhibuje aktivitu FOXO3a (Miyamoto *et al.*, 2007). Takové buňky, stejně jako FOXO3a-deficientní HSC, opouštějí klidová stadia a vstupují do buněčného cyklu. V případě delece genu *FOXO3a* je rovnováha vychýlena na úkor sebeobnovy kmenových buněk do takové míry, že dochází až k úplnému vyčerpání poolu HSC (Tothova *et al.*, 2007). FOXO3a je tedy negativním regulátorem buněčného cyklu. Mezi geny, jejichž expresi indukuje, patří např. *Spred2* a *p27^{kip1}*, inhibitory buněčné proliferace (Miyamoto *et al.*, 2008).

Do regulace apoptózy se FOXO3a zapojuje např. skrze indukci exprese proteinu Bim, který patří mezi proapoptické BH3-only proteiny. Tyto jsou obecně aktivní v případě nedostatku růstových faktorů. Bim je velmi významným regulátorem hematopoézy, podílí se mimo jiné na klonální deleci autoreaktivních B a T lymfocytů. Zdá se, že FOXO3a nereguluje expresi Bim

pouze přímo, tedy vazbou do oblasti jeho promotoru, ale patrně i prostřednictvím regulace miRNA, popř. dalších transkripčních faktorů ovlivňujících expresi Bim (Herold *et al.*, 2013).

FOXO3a má také klíčovou úlohu v ochraně HSC před účinky reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které poškozují jejich DNA. Činí tak jednak regulací samotného množství ROS v buňce, jednak indukcí opravných mechanismů oxidačního poškození DNA. Ztráta *FOXO3a* se projevuje zvýšenými hladinami endogenních ROS a defektní bázovou excizní opravou (Bigarella *et al.*, 2017). Bezpečné množství ROS zajišťuje FOXO3a regulací exprese tumorsupresorového proteinu ATM a dalších antioxidantních enzymů (jako jsou kataláza či superoxid dismutáza). Aktivita FOXO3a, resp. množství ROS v buňce, má přímý vliv na další osud HSC, stejně jako na udržení jejich zásobního poolu (Yalcin *et al.*, 2008).

Za další vývoj HSC do lymfocytární linie zodpovídá přísně regulovaná aktivita transkripčních faktorů a jejich cílových genů. Na diferenciaci do stadia CLP se podílejí zejména PU.1 a Ikaros. Z těchto buněk se mohou vyvinout všechny typy lymfocytů. Příslušnost k B buněčné linii je zajištěna součinností E proteinů (E2A, HEB), EBF, PAX5 a FOXO1, které dirigují diferenciaci CLP do stadia pro-B lymfocytu. Mezi jednotlivými transkripčními faktory panuje hierarchické uspořádání (Dengler *et al.*, 2008). E2A, resp. HEB, se váží do specifických regulačních oblastí lokusu *FOXO1* a modulují tak jeho expresi. FOXO1 spolu s E2A a signalizací napojenou na IL-7R spouštějí expresi EBF. Exprese PAX5 je následně indukována aktivitou EBF a IRF4, resp. IRF8. Společným cílem zmíněných transkripčních faktorů je spektrum genů asociovaných s B buněčnou linií (Welinder *et al.*, 2011).

4.2 V(D)J rekombinace a editace receptoru

V následujících procesech, nutných pro správnou funkci B lymfocytů, zaujímá významnější postavení FOXO1 v porovnání s FOXO3a. Přesto však FOXO3a není ani zde zcela postradatelný, jelikož bylo pozorováno, že v případě jeho delece dochází k snížení počtu pre-B buněk v kostní dřeni a cirkulujících zralých B buněk v periferní krvi a kostní dřeni (viz dále) (Hinman *et al.*, 2009).

FOXO1 se podílí na průběhu V(D)J rekombinace imunoglobulinových řetězců, díky které mohou vznikat BCR s ohromnou variabilitou, což je klíčové pro následné reakce s antigeny a další vývoj B buněk. Tato rekombinace je důsledkem činnosti RAG1 a RAG2, jejichž enzymatická aktivita způsobuje přeskupování genových segmentů variabilních oblastí genů pro IgH, resp. IgL. Exprese RAG je regulována na úrovni transkripce, a to právě prostřednictvím

FOXO1 (Kuo *et* Schlissel, 2009). FOXO1 se váže jednak přímo do lokusu *Rag*, jednak do oblasti enhanceru (*Erag*), který obsahuje sekvence odpovídající vazebným místům pro FOXO proteiny. Nicméně v případě delece tohoto enhanceru nebylo pozorováno ovlivnění míry exprese RAG závislé na FOXO1. Kromě přímé regulace se FOXO1 na indukcii exprese RAG podílí také prostřednictvím svých dalších cílových genů, jako je např. GADD45 α , který je pozitivním regulátorem transkripce *Rag*. Svůj podíl na expresi RAG mají i další transkripční faktory jako Ikaros, E2A či FOXP1 (Amin *et* Schlissel, 2008; Kuo *et* Schlissel, 2009).

RAG jsou během vývoje B buněk aktivní ve dvou po sobě následujících vlnách. První začíná ve stadiu CLP a pokračuje i u pro-B lymfocytu. Přeskupují se genové segmenty těžkého imunoglobulinového řetězce a uvnitř buněk tak vzniká unikátní IgH μ . Ve stadiu pre-B lymfocytu je aktivita RAG znovu patrná. Dochází k VJ-rekombinaci, tedy přeskupení genových segmentů lehkého imunoglobulinového řetězce. Pokud jsou nově vzniklé řetězce imunoglobulinů kombinovatelné, jde o produktivní rekombinaci. Jejím výsledkem je vznik povrchového IgM označovaného jako pre-BCR (Zhu *et al.*, 2011).

Mechanismus, díky kterému je aktivita RAG rozdělena do těchto dvou fází, souvisí se závislostí těchto vývojových stadií B buněk na IL-7 a signální kaskádou, kterou tento cytokin spouští. Jeho interakce s IL-7R na povrchu pro-B buněk totiž aktivuje PI3K/Akt, což vede k exportu FOXO1 z jádra, a tedy inhibici jeho aktivity čili k zastavení exprese RAG (Amin *et* Schlissel, 2008). Obdobně je aktivita RAG ztlumena po vytvoření BCR, jelikož jeho signální dráha také vede k aktivaci PI3K/Akt a z ní vyplývající inhibici FOXO1 (Dengler *et al.*, 2008).

Pokud však nezralé B buňky exprimují autoreaktivní BCR, k zastavení exprese RAG nedochází. Takový BCR je internalizován, což vede k inhibici signalizace prostřednictvím PI3K/Akt, čímž jsou FOXO1, a tedy i RAG udržovány v aktivním stavu (Kuo *et* Schlissel, 2009). Přeskupování genových segmentů IgL tak pokračuje za účelem změny specifity receptoru. Pokud buňky i po několika editacích receptoru reagují s autoantigeny, jsou eliminovány klonální delecí. Jistou úlohu v této fázi vývoje může zastávat i FOXO3a, jelikož bylo pozorováno, že v případě jeho delece se zvyšuje počet nezralých B lymfocytů. Pravděpodobně jde o důsledek snížení míry apoptózy, ke které by normální aktivita FOXO3a vedla. Počet editací BCR se tak může zvýšit, čímž nakonec vzniká větší množství B buněk, které již autoreaktivitu nevykazují (Ottens *et al.*, 2018).

4.3 Zralé B buňky a jejich subpopulace

Přežívání zralých B buněk, které opustily kostní dřeň, je závislé na signalizaci z povrchových receptorů, a to zejména z BCR a BAFF-R. Zatímco BCR signalizace je spuštěna v reakci na přítomnost určitého antigenu, BAFF-R váže cytokin z rodiny TNF, označovaný jako BAFF, který je produkován okolními buňkami v mikroprostředí. Narušení obou těchto signalizací, ať už mutací, či delecí jejich určitých komponent, vede k apoptóze (Srinivasan *et al.*, 2009). BCR signalizace obecně podporuje proliferaci a přežívání B buněk. Tato kaskáda mimo jiné vede k aktivaci PI3K, která skrze Akt inhibuje FOXO1. Takto je zastavena exprese cílových genů FOXO1, které obecně proliferaci omezují (např. cyklin G2 nebo Rb2/p130), a může dojít k aktivaci B buněk a z ní plynoucí intenzivní proliferaci (Yusuf *et al.*, 2004).

Jak již bylo zmíněno výše, v případě ztráty BCR B buňky hynou. Z této skutečnosti vyplývá, že pro jejich přežívání je nutná nepřetržitá (tzv. „tonická“) BCR signalizace. Bylo však prokázáno, že pokud je delece BCR kompenzována aktivitou PI3K, která byla mutována, následkem čehož je aktivní nezávisle na BCR, k apoptóze B buněk nedochází. Zdá se tedy, že signalizace vyvolaná PI3K je klíčovou signální kaskádou pro přežití B buněk (Lee *et al.*, 2013). Klíčovým efektozem této kaskády je FOXO1, přičemž umělé snížení jeho množství v jádře, simulující inhibiční aktivitu PI3K/Akt, také zamezuje apoptóze B buněk postrádajících BCR. Dráha PI3K/Akt/FOXO1 tak tvoří ústřední prvek BCR signalizace zajišťující přežívání B buněk (Srinivasan *et al.*, 2009). BCR signalizace také prostřednictvím osy PI3K/Btk/BLNK/PLC γ 2 inhibuje transkripci *FOXO1*, jak již bylo zmíněno v kapitole 2 (Hinman *et al.*, 2007).

Mimo pouhé udržení populace zralých B lymfocytů ovlivňuje FOXO1 také jejich další vývoj. Zralé B lymfocyty vytvářejí ve slezině dvě rozdílné populace – folikulární B lymfocyty (FO), které následně dávají vznik germinálním centrům (viz níže), a lymfocyty marginální zóny (MZ). Tyto se od folikulárních odlišují omezenou migrací, jelikož necirkulují mezi jednotlivými lymfatickými orgány a jejich výskyt je omezen na marginální zónu (tj. oblast mezi červenou a bílou pulpou) a lymfatické folikuly sleziny. Dalším významným rozdílem je produkce nízkoafinních protilátek třídy IgM, která je nezávislá na interakci s T lymfocyty. Jde tedy o B lymfocyty participující i ve vrozené imunitě (Lechner *et al.*, 2021). Existuje ještě jeden typ B lymfocytů, které jsou součástí přirozené imunity, a to lymfocyty B1, vyskytující se zejména v pleurální a peritoneální dutině (Calamito *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2003).

Vznik populace B buněk MZ je podporován signalizací přes povrchovou molekulu CD19, která je součástí signální dráhy BCR, a přenáší signál přes PI3K (Chen *et al.*, 2010). U myši, jejichž B buňky postrádají CD19 nebo katalytickou podjednotku PI3K, nedochází ke vzniku B1 ani MZ B buněk (Calamito *et al.*, 2010). V souladu s touto rolí PI3K vede delece genu pro fosfatázu PTEN, antagonistu PI3K, naopak ke zvýšení počtu B1 lymfocytů, v rámci populace B2 lymfocytů pak převládají lymfocyty MZ na úkor folikulárních (Suzuki *et al.*, 2003). Další data pak vyzdvihují zejména Akt jako rozhodující diferenciační element. Zastoupení B1, resp. MZ B buněk, bylo významně nižší u buněčných populací s nefunkční Akt (Calamito *et al.*, 2010). Aktivita Akt, tj. inhibice FOXO1, tak usměrňuje vývoj B buněk do linie buněk MZ. V jiném experimentu, také využívajícím CD19-deficitní myši B buňky, se podařilo podpořit vznik MZ B buněk delecí *FOXO1*. Takto byla kompenzována nefunkční signální kaskáda. Je tedy zřejmé, že právě inaktivace FOXO1 je zásadním dějem rozhodujícím mezi vývojem B buněk do populací FO, resp. MZ (Chen *et al.*, 2010). Pozorovaná aktivita FOXO1 také koreluje s průběhem dalších známých signalizací indukujících vývoj MZ B buněk. Jednu z těchto signálních drah spouští Notch2, přičemž výsledkem je mimo jiné významné snížení hladin několika transkripčních faktorů, včetně FOXO1 (Lechner *et al.*, 2021).

Kromě proliferace a další diferenciace zasahuje FOXO1 i do procesu migrace zralých B lymfocytů. U buněk s delecí *FOXO1* byla pozorována snížená exprese povrchové molekuly CD62L, tedy L-selektinu (Dengler *et al.*, 2008). Jeho přítomnost je nutná pro vstup cirkulujících B buněk do lymfatických uzlin (Munro *et al.*, 1996). Absence L-selektinu vyvolaná delecí *FOXO1* měla za následek úbytek populace B buněk v lymfatických uzlinách, a to přibližně o 30 % ve srovnání s buňkami bez této delece. Tato data naznačují, že FOXO1 ovlivňuje migraci B buněk do lymfatických uzlin skrze zvýšení exprese CD62L (Dengler *et al.*, 2008).

Pro zralé folikulární B lymfocyty je, na rozdíl od MZ a B1 lymfocytů, typická zvýšená míra exprese povrchového IgD v porovnání s IgM. Vyšší zastoupení IgD BCR jednak ovlivňuje reaktivitu B buněk vzhledem k antigenům ve formě imunokomplexů, jednak má význam v imunitních reakcích závislých na interakcích s T lymfocyty. Bylo prokázáno, že exprese IgD na úkor IgM je závislá na aktivitě PTEN. Absenci PTEN, normálně vedoucí k nepřítomnosti IgD na povrchu B buněk, lze kompenzovat pomocí transdukce FOXO1-A3, PI3K/Akt nezávislé formy FOXO1. I bez inhibice PI3K tak FOXO1-A3 zůstává aktivní, což má za následek zvýšení hladin IgD. Jde o nepřímou regulaci, kdy FOXO1 interaguje s dalšími transkripčními faktory

(např. Zfp318), které ovlivňují např. splicing IgD pre-mRNA. FOXO1 zde tedy sehrává úlohu efektoru fosfatázy PTEN (Setz *et al.*, 2019).

4.4 Procesy v germinálních centrech

Folikulární B lymfocyty zprostředkovávají imunitní odpověď závislou na T lymfocytech. Po setkání s antigenem se mohou diferencovat do krátce žijících plazmatických buněk, které produkují pouze nízkoafinní protilátky, nebo podstoupit další vývoj v germinálních centrech, jehož výsledkem je vznik dlouho žijících paměťových a plazmatických buněk. Tyto již produkují protilátky s vysokou afinitou vůči danému antigenu (Inoue *et al.*, 2017). Germinální centra (GC), též označovaná jako sekundární lymfatické folikuly, jsou mikroanatomické struktury v sekundárních lymfatických orgánech. Aktivované folikulární B lymfocyty se v GC vyskytují ve dvou typech – centroblasty a centrocyty, lišících se morfologicky, ale také povrchovými markery a expresními profily. Ve tmavé zóně (DZ, dark zone), blíže oblasti výskytu T lymfocytů, se nacházejí převážně centroblasty, zatímco ve světlé zóně (LZ, light zone), blíže červené pulpě sleziny či obalu uzliny, převažují centrocyty. Tato polarizace GC odráží rozdílné procesy, které v DZ, resp. LZ, probíhají (Victoria *et al.*, 2012). V posledních letech se změnil pohled na centroblasty, resp. centrocyty, jako na nevratná stadia vývoje B buněk, jelikož byla prokázána jejich recirkulace mezi LZ a DZ, pravděpodobně za účelem zvýšení afinity BCR, resp. protilátek (viz dále) (Dominguez-Sola *et al.*, 2015).

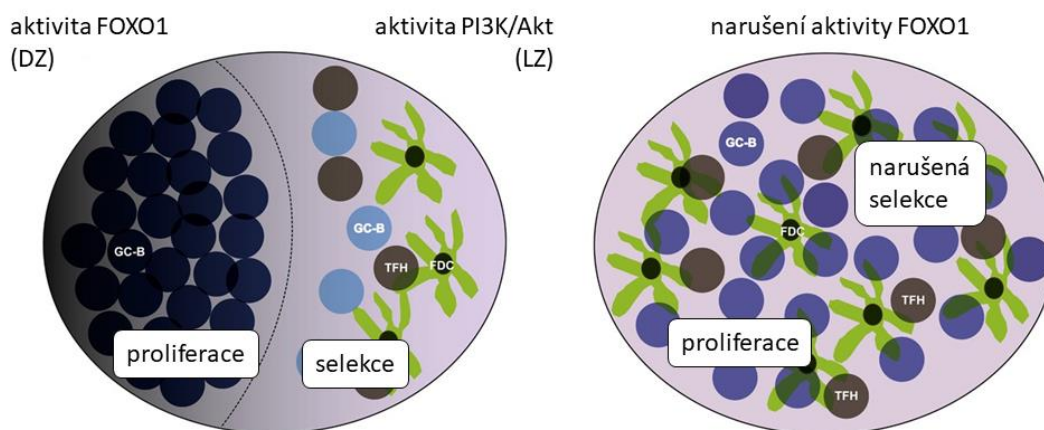
Vznik a udržení, stejně jako polarizace a procesy uvnitř GC, jsou přísně regulovány. Nezastupitelnou úlohu zde sehrává FOXO1, jehož aktivita je v obou zónách GC rozdílná. Zatímco buňky LZ vykazují zvýšenou aktivitu PI3K, inhibující FOXO1, v DZ je FOXO1 u většiny buněk lokalizován v jádrech a je aktivní (Sander *et al.*, 2015). V případě delece *FOXO1* postrádají GC buňky s typickým fenotypem buněk DZ, tj. $CXCR4^{high}$, $CD86^{low}$, $CD83^{low}$ a jsou tvořeny pouze buňkami připomínajícími buňky LZ. Zejména přítomnost chemokinového receptoru CXCR4, transkripčního cíle FOXO1, má velký význam pro správnou polarizaci GC, jelikož bez jeho exprese nejsou B buňky schopny vstoupit do DZ. Mezi další cíle FOXO1 patří protoonkogen BCL-6, jehož exprese FOXO1 indukuje a také dále moduluje jeho aktivitu, která je nezbytná pro samotný vznik GC a vede ke stimulaci buněčné proliferace (Dominguez-Sola *et al.*, 2015; Oestreich *et al.*, 2012). Podstatné je, že v tomto kontextu, prostřednictvím řady efektorových proteinů, vede aktivita FOXO1 k podpoře intenzivní proliferace buněk, natolik typické pro DZ. Tato funkce FOXO1, jakožto induktoru

proliferace, je v rozporu s jeho nejčastěji pozorovanou aktivitou, tedy inhibicí buněčného cyklu. Této skutečnosti odpovídá i pozorované zpomalení průběhu buněčného cyklu u B buněk GC s delecí *FOXO1*, které nejsou schopny proliferace ani v přítomnosti podpůrných signálů z T lymfocytů. Zdá se tedy, že význam FOXO1 v buněčné proliferaci závisí na vývojovém stadiu buněk a okolních faktorech, které jeho chování ovlivňují. Proliferaci podporující aktivita FOXO1 může navíc v tomto kontextu souviset s jeho pozorovanou onkogenní funkcí u některých lymfomů pocházejících z GC (viz dále) (Inoue *et al.*, 2017).

Kromě klonální proliferace probíhá v DZ také výše zmíněný proces somatické hypermutace variabilních oblastí IgH (SHM, somatic hypermutation) za účelem zvýšení variability BCR, resp. později produkovaných protilátek. Tento proces také souvisí s výše zmíněnou recirkulací buněk mezi LZ a DZ, jelikož se buňky, u kterých vlivem SHM nedošlo ke zvýšení afinity BCR vzhledem k danému antigenu, mohou vrátit do DZ a znovu tímto procesem projít. Proces recirkulace je ovlivněn aktivitou FOXO1, která byla pozorována zejména u buněk LZ exprimujících transkripční faktor c-MYC (Dominguez-Sola *et al.*, 2015; Sander *et al.*, 2015). Přestože je FOXO1 známým pozitivním regulátorem exprese genu *Aicda* kódujícího AID, není v případě delece *FOXO1* proces SHM zcela narušen, na rozdíl od izotypového přesmyku (viz níže). Variabilní oblasti IgH buněk s delecí *FOXO1* vykazovaly pouze menší množství mutací ve srovnání se svými protějšky bez delece (Dengler *et al.*, 2008; Sander *et al.*, 2015). Takové buňky, přestože fenotypově připomínají buňky LZ (viz výše), tedy podstupují SHM a také intenzivně proliferují, z čehož vyplývá, že tyto procesy nejsou zcela závislé na existenci DZ a aktivitě FOXO1 (Dominguez-Sola *et al.*, 2015; Sander *et al.*, 2015). FOXO1 také patrně určitým způsobem ovlivňuje proces selekce buněk v LZ, jelikož bylo zaznamenáno, že myši B buňky s mutovaným *FOXO1* jsou citlivější k signálům z pomocných T lymfocytů, které přispívají k pozitivní selekci. Tyto mutace negativně ovlivnily reakci FOXO1 na signalizaci PI3K/Akt a také jeho interakci s DNA, čímž mohlo dojít k indukci exprese jiných než jeho obvyklých cílových genů. Takto byl napodoben proces pozitivní selekce, který může být podkladem expanze maligních B buněk u lymfomů vznikajících z buněk GC (Roberto *et al.*, 2021). Porovnání GC s přítomností funkčního FOXO1, resp. s jeho delecí, poskytuje obrázek 7.

LZ je tedy místem selekce B buněk, jednak zpět do DZ, jednak pro další vývoj do plazmatických a paměťových buněk. B buňky, které prošly pozitivní selekcí (viz výše), zde absolvují izotypový přesmyk. Jde o proces vedoucí k tvorbě protilátek i jiných tříd než IgM a IgD, přičemž ústřední úlohu sehrává opět AID, tentokrát však závislá na aktivitě FOXO1

(Sander *et al.*, 2015). Rozdílná míra závislosti exprese AID na FOXO1 patrně souvisí se zapojením více faktorů do regulace aktivity AID a také s rozdílnými doménami AID podílejícími se na procesu SHM, resp. CSR (class switch recombination, tj. izotypový přesmyk) (Omori *et al.*, 2006).



Obrázek 7: Polarizované GC (vlevo) a defektní GC v případě delece FOXO1 (vpravo).

GC-B – B lymfocyty germinálních center, TFH – folikulární pomocné T lymfocyty, FDC – folikulární dendritické buňky (Sander *et al.*, 2015; upraveno).

Význam FOXO1 v procesu CSR vyplývá ze skutečnosti, že inhibice PI3K (ať už prostřednictvím fosfatázy PTEN, či inhibitoru katalytické podjednotky PI3K), vede ke zvýšení četnosti CSR v kultivovaných B buňkách. Naopak u buněk s delecí PTEN nebyly žádné jiné třídy protilátek pozorovány. PI3K signalizace ovlivňuje řadu efektorových molekul, jednou z nich je transkripční faktor PRDM1, jehož delece vedla k částečné obnově průběhu CSR. Hlavním cílem PI3K je však Akt (viz regulace). V případě přítomnosti nepřetržitě aktivní formy Akt (myrAkt) byl pozorován blok CSR (Omori *et al.*, 2006). V souladu s recipročním vztahem mezi aktivitou Akt a FOXO1 je defektní CSR pozorována i u B buněk s delecí *FOXO1*. Příčinou defektu CSR je chybějící nárůst exprese AID po imunizaci těchto buněk. Právě FOXO1 byl, jak již bylo zmíněno výše, prokázán jako pozitivní regulátor transkripce genu *Aicda*, kódujícího AID, což podtrhuje jeho klíčovou úlohu v tomto významném procesu (Dengler *et al.*, 2008).

4.5 Plazmatické a paměťové buňky

Z B buněk, které úspěšně prošly afinitní maturací, selekcí a CSR, se stávají dlouho žijící paměťové a plazmatické buňky. Pro paměťové B buňky je typická recirkulace, zatímco plazmatické se vyskytují převážně v kostní dřeni. Pro jejich správné funkce je zásadní přítomnost povrchových receptorů, které zajišťují nezbytnou komunikaci s mikroprostředím (Blink *et al.*, 2005).

Pro udržení populace plazmatických buněk jsou podstatné zejména signalizace prostřednictvím APRIL a PI3K, přičemž oba signály nakonec vedou k inhibici aktivity určitých kaspáz, a tedy přežití buněk. PI3K je zde aktivována na základě kontaktu povrchových integrinů plazmatických buněk se stromálními buňkami kostní dřeni. PI3K signalizace inhibuje FOXO1, resp. FOXO3. Význam této signalizace pro přežití plazmatických buněk je patrný při inhibici PI3K, která měla za následek signifikantní úbytek jejich počtu. Role FOXO1/3 jako efektorů této signalizace byla potvrzena využitím siRNA, inhibující FOXO1/3, což plazmatické buňky před apoptózou ochránilo. Inhibice FOXO1 a FOXO3 je tak dostačující náhrada kontaktu plazmatických a stromálních buněk. Prokázanými kaspázami, které v důsledku inhibice FOXO1/3 nejsou aktivovány, jsou Casp3 a Casp7, které souvisejí s mitochondriálním stresem (Cornelis *et al.*, 2020). Negativní účinek transkripčních faktorů FOXO na vznik a přežití plazmatických buněk také souvisí se skutečností, že jde o přímé pozitivní regulátory exprese FOXP1, jehož aktivita narušuje diferenciaci plazmatických buněk (van Boxtel *et al.*, 2013; van Keimpema *et al.*, 2015).

Nicméně aktivita FOXO není pro plazmatické buňky zcela postradatelná. Ve fázi diferenciaci nezralých plazmatických buněk, plazmablastů, do zralých plazmocyty, dochází k nárůstu exprese určitých genů, včetně *PRDMI* a *FOXO3a*. V této fázi vývoje plazmatických buněk je typická přítomnost transkripčního kofaktoru CITED2, což je známý transkripční cíl FOXO3a (Affer *et al.*, 2014; Bakker *et al.*, 2007). Aktivita FOXO3a je patrně též významná pro klidové dlouho žijící plazmatické buňky, jelikož díky ní mohou opustit buněčný cyklus (Tooze, 2013).

5 FOXO v biologii maligních B lymfocytů

Transkripční faktory FOXO se u řady neoplazií chovají jako tumor supresory, přičemž ani B buněčné malignity nejsou v tomto aspektu výjimkou. V posledních letech však byla zaznamenána i jejich aktivita jakožto induktorů tumorigeneze. Obě tyto role FOXO jsou podstatné pro patogenezi leukémií a lymfomů vznikajících z B lymfocytů a budou podrobně popsány v této kapitole. Obecně lze říci, že FOXO3a vykazuje převážně tumor supresorovou aktivitu, zatímco FOXO1 se více uplatňuje i v onkogenezi. Aktivita obou těchto transkripčních faktorů také ovlivňuje účinek některých terapeutik, ať už jej přímo zprostředkovává, či naopak zodpovídá za vznik rezistence.

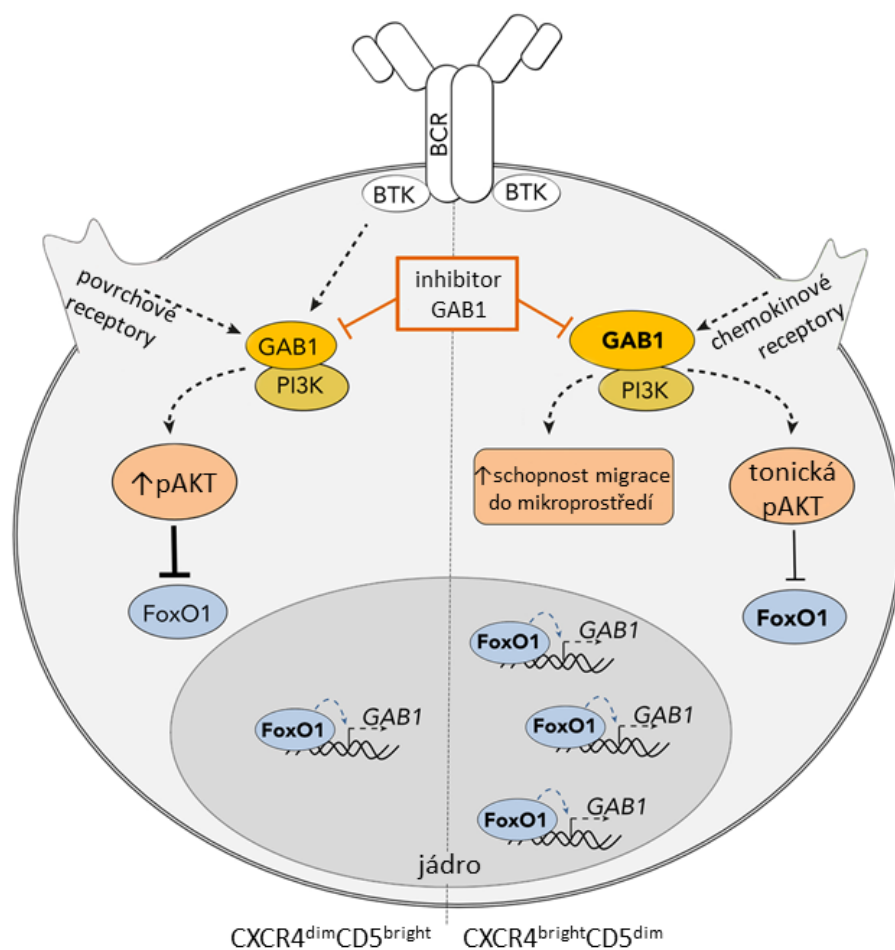
5.1 Chronická lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je jednou z nejčastějších forem leukémie v západních zemích. Typicky postihuje jedince starší 65 let, častěji muže než ženy. Toto onemocnění vzniká v důsledku klonální proliferace zralých B lymfocytů, které jsou pak přítomny v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách, játrech, slezině i jiných orgánech. Počet lymfocytů v krvi převyšuje $5 \times 10^9/l$, u některých pacientů dokonce $500 \times 10^9/l$. Mezi typické symptomy patří hepatosplenomegalie, úbytek hmotnosti, únava až vyčerpání a noční pocení (tzv. B symptomy). Projevy, stejně jako průběh onemocnění, jsou však velmi heterogenní. Zatímco u některých pacientů může jít o indolentní onemocnění bez větších komplikací, u jiných může mít CLL velmi agresivní průběh vyžadující okamžitou léčbu (Messmer *et al.*, 2005).

Typickými povrchovými markery buněk CLL jsou molekuly CD5, CD19 a CD23. Míra exprese určitých dalších molekul pak může korelovat se závažností onemocnění. Mezi významné prognostické markery pak patří transmembránový glykoprotein CD38, CD49d a kináza z rodiny Syk, ZAP-70. Aktivita ZAP-70 značící horší prognózu je asociována se zvýšenou signalizací skrze povrchový BCR (Bulian *et al.*, 2014; Damle *et al.*, 1999; Rassenti *et al.*, 2004; Schroers *et al.*, 2005). Na základě exprese mutovaného, resp. nemutovaného IgV_H , se rozlišují dva podtypy CLL, lišící se svým klinickým průběhem. Nemutovaný stav IgV_H značí, že CLL buňky pocházejí z B buněk, které ještě neprošly vývojem v GC. Tento typ CLL má agresivnější průběh ve srovnání s druhým typem, pro který je typická přítomnost mutovaného IgV_H , a tedy fenotyp podobný B buňkám, které již prošly diferenciací v GC (Damle *et al.*, 1999). Jako další prognostické markery mohou sloužit typické mutace.

S nepříznivou prognózou se pojí např. del(17p) vedoucí ke ztrátě genu *TP53* či del(11q) ovlivňující *ATM*. Naopak s lepší prognózou je asociována del(13q) či trizomie chromozomu 12 (Döhner *et al.*, 2000).

Patofyziologie CLL je velmi složitá a podílí se na ní řada faktorů, ať už uvnitř maligních buněk, či v okolním mikroprostředí. Velmi podstatnou úlohu má BCR signalizace, jejíž deregulace vede k podpoře proliferace prostřednictvím aktivace řady efektorových molekul. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, BCR signalizace vede k aktivaci PI3K/Akt (Stevenson *et al.*, 2011). Důsledkem této signalizace je nepřetržitá aktivita Akt, která byla u buněk CLL pozorována. Akt pak sehrává důležitou roli v přežití leukemických buněk, jelikož bylo pozorováno, že využití inhibitorů Akt vede k jejich apoptóze (Zhuang *et al.*, 2010). V tomto kontextu reguluje Akt geny *NOXA*, *PUMA*, jejichž exprese se v přítomnosti inhibitoru Akt zvýšila. Naopak hladiny proteinu MCL1 se po využití těchto inhibitorů snižují (de Frias *et al.*, 2009). Možná souvislost s významem FOXO3a zde vyplývá ze skutečnosti, že právě FOXO3a je regulátorem exprese genu *PUMA*. Za nepřítomnosti inhibiční aktivity Akt je tak FOXO3a aktivní a může indukovat expresi *PUMA*, což je mediátor apoptózy (You *et al.*, 2006). Zabránění exportu FOXO3a z jádra, a tedy zachování jeho transkripční aktivity, je jedním z mechanismů indukce apoptózy CLL buněk během terapie využívající ibrutinib, inhibitor BTK. Právě udržení FOXO3a v jádře a jeho proapoptická aktivita představují jednu z možností překonání získané rezistence na tento způsob terapie (Kapoor *et al.*, 2019). Význam FOXO3a jako potenciálního tumorsupresoru u CLL je také podpořen korelací mezi výskytem delecí zahrnujících oblast 6q21, kde se nachází mimo jiné lokus *FOXO3a*, a horší prognózou pacientů. Ztráta proapoptické aktivity FOXO3a tak může významně přispívat k agresivitě onemocnění (Jarosova *et al.*, 2017). Na rozdíl od FOXO3a může být aktivita FOXO1 přítomného v jádře CLL buněk při terapii pomocí idelalisibu, inhibitoru δ -podjednotky PI3K, v některých případech příčinou vzniku rezistence na tuto formu terapie. FOXO1 zde, za stimulace prostřednictvím GSK3, indukuje expresi *Igf1r*. Právě zvýšené hladiny IGF1R jsou klíčové pro přežití CLL buněk i v případě inhibice signalizace PI3K, jelikož vedou ke zvýšené signalizaci prostřednictvím MAPK (Scheffold *et al.*, 2019).



Obrázek 8: Porovnání aktivity FOXO1/GAB1/Akt u $CXCR4^{dim}CD5^{bright}$ (vlevo) a $CXCR4^{bright}CD5^{dim}$ (vpravo) buněk CLL. Během tranzice proliferující části populace ($CXCR4^{dim}CD5^{bright}$ buňky) buněk CLL do klidové ($CXCR4^{bright}CD5^{dim}$ buňky) dochází ke zvýšení hladin GAB1. Toto vede k nárůstu migrace a podpoře přežití CLL buněk v periférii díky „tonické“ Akt signalizaci. Interakce s mikroprostředím prostřednictvím povrchových receptorů pak vede ke snížení hladin GAB1, a to v důsledku aktivity Akt, která inhibuje FOXO1. Inhibice GAB1 má za následek snížení migrace, narušení „tonické“ aktivity Akt a zablokování kompenzační aktivity Akt při terapii využívající ibrutinib (Seda *et al.*, 2021; upraveno).

PI3K je také aktivována prostřednictvím chemokinových receptorů, čímž zajišťuje komunikaci buněk CLL s mikroprostředím nezbytnou pro jejich přežití. Přítomnost homeostatických chemokinů, jako jsou CXCL12, CXCL13, CCL21 a CCL19, vede nakonec přes PI3K/Akt k inhibici FOXO3a, a tedy k útlumu jeho proapoptické aktivity (Ticchioni *et al.*, 2007). Chemokinové receptory na povrchu buněk CLL jsou také mediátory recirkulace mezi

periferní krvi a lymfatickými tkáněmi. Na migraci buněk CLL se podílí zejména receptor CXCR4, selektin CD62L a integrin VLA4. Míra exprese těchto povrchových molekul (zejména pak CXCR4 a CD5) se může u buněk CLL lišit v závislosti na jejich vztahu k mikroprostředí. CXCR4^{dim}CD5^{bright} buňky představují proliferující část populace, která recentně opustila lymfatické orgány. Naproti tomu se CXCR4^{bright}CD5^{dim} buňky nacházejí v klidovém stavu a jsou připraveny k návratu do mikroprostředí. U této populace byly zaznamenány zvýšené hladiny proteinu GAB1, což je adaptorový protein představující spojovací článek mezi signalizací BCR a PI3K/Akt v maligních B buňkách (Nishida *et al.*, 1999; Seda *et al.*, 2021). Příмым pozitivním regulátorem exprese GAB1 je právě FOXO1. Aktivita GAB1 vede jednak ke zvýšené migraci buněk směrem k chemokinům v mikroprostředí, jednak stimuluje „tonickou“ Akt signalizaci, díky které CLL buňky přežívají v periferní krvi. Tato však zcela nepotlačuje transkripční aktivitu FOXO1. Osa FOXO1/GAB1/Akt může také tvořit adaptační mechanismus CLL buněk na terapii pomocí inhibitorů BCR signalizace, např. výše zmíněného ibrutinibu. Absence signálů z mikroprostředí, způsobená aktivitou BCR inhibitorů, může být plně kompenzována aktivitou Akt vyvolanou zvýšenými hladinami FOXO1/GAB1, díky čemuž buňky CLL tuto terapii přežívají. Efektivním způsobem inhibice migrace a indukce apoptózy těchto buněk je využití ibrutinibu v kombinaci s inhibitorem GAB1 (Seda *et al.*, 2021). Porovnání výše zmíněných subpopulací buněk CLL a jejich rozdílů v aktivitě FOXO1/GAB1/Akt představuje obrázek 8.

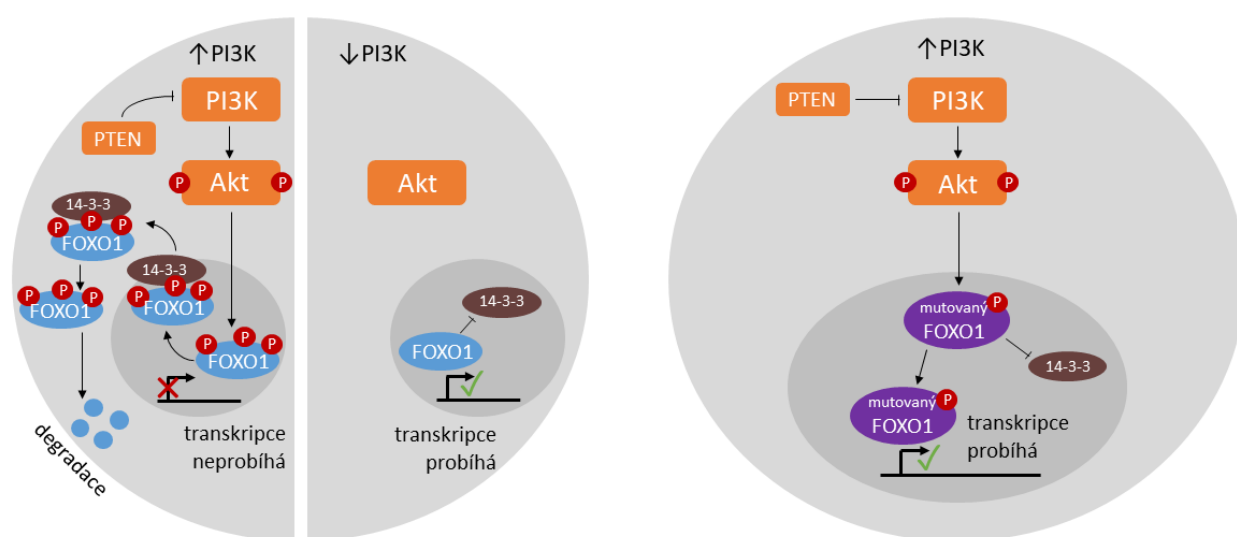
5.2 Burkittův lymfom

Burkittův lymfom (BL) je velmi agresivní B buněčná malignita typická vysokou mitotickou aktivitou a průběhem mnohdy připomínajícím akutní leukémii. BL buňky mají původ v buňkách germinálních center. Endemická varianta související s infekcí EBV je typická pro oblast rovníkové Afriky a Nové Guinei. Projevuje se zejména postižením čelisti či jiné obličejové kosti, a to nejčastěji u chlapců mezi 4. a 7. rokem života. Forma sporadická rovněž postihuje častěji chlapce, nicméně se projevuje nejen v dětství, ale i u mladých dospělých. Většinou se manifestuje v břišní dutině, u děvčat v pubertě může postihnout i prsa. Výskyt v lymfatických uzlinách, kostní dřeni a periferní krvi též není výjimkou, zejména u formy spojené s imunodeficitem (Pickleman *et al.*, 1972).

Pro buňky BL je typická silná exprese CD10, CD38, BCL-6 a Ki-67 odrážející vysokou mitotickou aktivitu. Patofyziologie BL je spojena s postižením genu *c-MYC*. Často dochází

k jeho translokaci do blízkosti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, tj. t(8;14)(q24;q32), případně t(2;8) či t(8;22), čímž je tento protoonkogen aktivován (Zani *et al.*, 1996). Zvýšená aktivita c-MYC je sice pro maligní buňky výhodná, jelikož zabraňuje další diferenciaci a podporuje intenzivní proliferaci, nicméně také zvyšuje jejich náchylnost k apoptóze. Před touto jsou BL buňky chráněny intenzivní signalizací prostřednictvím PI3K/Akt. PI3K jednak přímo podporuje aktivitu c-MYC, např. brání jeho degradaci či inhibuje aktivitu jeho antagonisty, jednak zajišťuje nezbytnou signalizaci pro přežití BL buněk. U BL byla totiž prokázána absence signalizace aktivující NF-κB, která bývá typicky deregulována u jiných lymfoproliferací (Sander *et al.*, 2012).

Přestože je u buněk BL signalizace PI3K/Akt aktivní, je u nich pozorována akumulace FOXO1 v jádře, a má tady spíše onkogenní vlastnosti. Inhibiční účinek Akt je narušen v důsledku výskytu mutací FOXO1, typicky v místech, které Akt fosforyluje. Jako nejvíce frekventovaná se jeví mutace v místě T24, pozorovaná zejména u vzorků sporadických BL. Tato se u vzorků endemické formy BL vyskytovala pouze zřídka, na rozdíl od mutace v místě S22. V tomto případě sice nejde o mutaci přímo v místě fosforylace, nicméně se S22 nachází v oblasti rozpoznávané Akt a případná mutace tak fosforylaci může narušovat (Zhou *et al.*, 2019).



Obrázek 9: Vliv signalizace PI3K/Akt na aktivitu FOXO1 v normálních B buňkách (vlevo) a v buňkách BL s mutací FOXO1 (vpravo). V případě vysokých hladin PI3K dochází k fosforylaci FOXO1 prostřednictvím Akt. Tato vede k exportu FOXO1 z jádra, interakci s 14-3-3 proteiny a jeho následné degradaci. FOXO1 je přítomen v jádře, a tedy transkripčně aktivní, v případě snížení hladin PI3K. Přítomnost mutací v místě T24 vede k rezistenci FOXO1 vůči

fosforylační aktivitě Akt a také narušuje interakci s 14-3-3 proteiny. FOXO1 a PI3K jsou tak aktivní současně (Kabrani *et al.*, 2018; upraveno).

Mutace v T24 také narušuje interakci FOXO1 s 14-3-3 proteiny, a tedy jeho následnou degradaci (viz obrázek 9). Pro podporu tumorigeneze však není rozhodující mutační status FOXO1. Ukazuje se, že zásadní je zejména samotná přítomnost aktivního FOXO1 v jádře, které nutně nemusí být dosaženo zmiňovanými mutacemi. Molekulární mechanismus retence nemutovaného FOXO1 v jádře však zatím zůstává neobjasněn. FOXO1 zde patrně spouští transkripční program podobný tomu v DZ (viz kapitola 4), přičemž část exprimovaných genů je společná pro normální B buňky a jejich maligní protějšky. Výsledkem této deregulované aktivity FOXO1 je pak intenzivní proliferace a inhibice proapoptických signálů (Kabrani *et al.*, 2018). Využití inhibitorů FOXO1 se ukázalo jako efektivní způsob vyvolání buněčné smrti a zabránění další expanze maligních buněk, čímž se FOXO1 stává atraktivním farmakologickým cílem v terapii BL (Gehring *et al.*, 2019).

5.3 Folikulární lymfom

Buňky folikulárního lymfomu (FL) též pocházejí z buněk GC, nicméně si tento typ lymfomu alespoň částečně zachovává folikulární strukturu, na rozdíl např. od BL. Ve většině případů postihuje uzliny, ale napadá také slezinu a lymfatickou tkáň Waldeyerova okruhu. Relativně časté je postižení kostní dřeně, k leukemizaci však ve většině případů nedochází. V porovnání s BL má FL výrazně méně progredující průběh. Komplikací však může být jeho transformace do více agresivního difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL; viz dále) (Lo Coco *et al.*, 1993).

Diagnostika se opírá zejména o histologii, jelikož buňky FL vykazují typickou morfologii, s jádry tvaru „kávového zrna“. Kromě antigenů typických pro B buňky exprimují buňky FL ještě CD10, naopak CD5 přítomen není. Cytogenetický nález v 80 % případů představuje t(14;18)(q32;q21). Takto se gen *BCL-2* dostává do blízkosti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, což vede k nárůstu jeho exprese, a tedy zvýšené odolnosti maligních buněk k apoptóze (Matolcsy *et al.*, 1996).

Signalizace PI3K/Akt a také mTOR sehrávají podstatnou úlohu v patogenezi FL, jelikož jejich inhibice vede ke snížení počtu maligních buněk. K úplné regresi tumoru však nedostačuje (García-Martínez *et al.*, 2011). Jedním z mechanismů vedoucích k potlačení expanze maligních

buněk po inhibici PI3K/Akt je indukce exprese negativního regulátoru buněčného cyklu, p27^{kip1}. Funkce transkripčních faktorů FOXO jako přímých regulátorů exprese p27^{kip1} byla již dříve popsána. V kontextu ne Hodgkinových lymfomů (NHL) tuto úlohu vykonává FOXO3a. Nárůst jeho množství v buňkách po inhibici PI3K/Akt koreluje se vzestupem hladin p27^{kip1}. Naopak množství Ki-67 se významně snížilo, což odráží pokles proliferativní aktivity těchto buněk. Zvýšená signalizace PI3K/Akt tak vede v maligních B lymfocytech k potlačení aktivity FOXO3a, a tedy deregulaci průběhu buněčného cyklu vedoucímu k intenzivní proliferaci (Zhao *et al.*, 2008).

FOXO1 patří u FL mezi 7 nejčastěji mutovaných genů, které jsou součástí klinického skórovacího systému mZ-FLIPI, přičemž bylo prokázáno, že se přítomnost mutovaného *FOXO1* pojí s horší prognózou. Incidence mutací *FOXO1* se u FL pohybuje okolo 5 %. (Pastore *et al.*, 2015). Naproti tomu u transformovaného FL byly mutace *FOXO1* zaznamenány u 15 % případů. Jedná se o bodové missense mutace vedoucí ke zvýšení jeho aktivity (Pasqualucci *et al.*, 2014). *FOXO1* i zde patří mezi rekurentně mutované geny, stejně jako např. *MYD88* či *CARD11*, spolu s kterými se tak pravděpodobně podílí na progresi onemocnění, a to např. prostřednictvím indukce exprese proliferaci podporujícího proteinu BCL-6 (viz kapitola 4), který následně potlačuje expresi p53 (Bouska *et al.*, 2017; Phan *et al.*, 2004). Právě narušení aktivity p53 bylo již dříve popsáno jako jeden z klíčových mechanismů histologické transformace FL (Lo Coco *et al.*, 1993; Sander *et al.*, 1993).

5.4 Difuzní velkobuněčný B lymfom

Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) je lymfoproliferativní onemocnění nejasné etiologie, pro které je typická přítomnost velkých neoplastických buněk z B buněčné linie. Může vznikat *de novo*, přičemž se pak označuje jako primární DLBCL nebo jako progresse jiných B buněčných malignit (např. CLL či FL). Uzliny i extranodální tkáň (zejména GIT, kosti, slezina, slinné žlázy, štítná žláza, játra, ledviny a nadledviny, případně i kůže) postihuje difuzní infiltrací. Kostní dřeň zasahuje relativně vzácně (Rao *et al.*, 1998).

Buňky DLBCL exprimují typické markery B buněk, v 50–75 % případů také povrchový imunoglobulin (IgM, IgG, IgA). Z cytogenetických abnormalit je nejčastější postižení oblasti 3q27, které je popisováno u 30 % pacientů. Mutovány jsou zde regulační oblasti genu *BCL-6*, jejichž poškození se následně podílí na patogenezi. DLBCL lze dle původu maligních buněk rozdělit do dvou podtypů lišících se cytogenetickými abnormalitami a prognózou. Buňky

ABC-DLBCL vznikají z aktivovaných B buněk a jejich expresní profil má charakteristiku plazmocytů a aktivovaných B buněk. V buňkách GC mají původ buňky podtypu GC-DLBCL, které si zachovávají určité charakteristiky normálních buněk GC (Tagawa *et al.*, 2005).

V patogenezi, stejně jako u jiných NHL, sehrává důležitou úlohu signalizace PI3K/Akt. Jednak inhibuje proapoptickou aktivitu FOXO3a (způsobenou indukci exprese p27^{kip1}), jednak také fosforyluje FOXO1 (Uddin *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008). Inhibice FOXO1 je důležitým faktorem odolnosti maligních buněk k apoptóze. K její indukci prostřednictvím FOXO1 dochází např. při využití inhibitorů Akt a Syk, což souvisí se závislostí buněk DLBCL na tonické BCR signalizaci (Szydłowski *et al.*, 2016). Nárůst intenzity signalizace PI3K/Akt může být podpořen také ztrátou *PTEN* (častěji u GC-DLBCL) či prostřednictvím miRNA. Konkrétně miR-21 inhibuje expresi jak *PTEN*, tak samotného *FOXO1* (Go *et al.*, 2015; Pfeifer *et al.*, 2013). FOXO1 se v tomto kontextu chová jako tumor supresor a jeho úplná ztráta, prokázána u 20 % zkoumaných případů DLBCL, je asociována s kratší celkovou dobou přežití pacientů (Szydłowski *et al.*, 2016).

U pacientů s DLBCL, u kterých byl prokázán mutovaný *FOXO1*, byla také zaznamenána kratší celková doba přežití, ve srovnání s pacienty bez mutací v tomto genu. Z jeho mutačního statusu se tak stává potenciální prognostický marker. Prevalence mutací *FOXO1* u zkoumaných případů představovala 8,6 %. Nejčastěji byly lokalizovány na N-konci řetězce, včetně místa T24, narušujícího export z FOXO1 z jádra. Zaznamenána byla i mutace v DBD narušující interakci tohoto transkripčního faktoru s DNA, a tedy naopak inhibující jeho aktivitu (Trinh *et al.*, 2013). Výskyt mutací *FOXO1*, doprovázený mutacemi určitých dalších genů, byl zaznamenán zejména u relapsovaného/refrakterního GC-DLBCL, kde se patrně spolupodílí na rezistenci vůči terapii (Morin *et al.*, 2016). FOXO1 tak v patogenezi DLBCL může sehrávat dvojí úlohu, a to v závislosti na přítomnosti, resp. nepřítomnosti mutací. Významné je tedy udržení aktivity FOXO1 v určité rovnováze, přičemž její vychýlení, ať už ve smyslu zvýšení, či snížení, může mít vliv na progresi onemocnění.

Za další z podtypů DLBCL lze považovat i primární mediastinální velkobuněčný B lymfom (PMBL). Představuje asi 2 % NHL a jeho výskyt je nejčastější u mladých žen. Řadou svých morfologických i patofyziologických charakteristik připomíná klasický Hodgkinův lymfom (Tsang *et al.*, 1996). Stejně jako u Hodgkinova lymfomu je i u PMBL klíčovým onkogenním mechanismem snížení hladin, až úplná inhibice FOXO1 (viz dále) (Xie *et al.*, 2014).

5.5 Lymfom z plášťových buněk

Lymfom z plášťových buněk (MCL) vzniká v důsledku maligního zvratu B buněk plášťové zóny lymfatických folikulů. Postihuje především uzliny, v pozdějších stádiích i játra, slezinu a kostní dřeň. K leukemizaci dochází u 25–75 % případů. Diagnostikován bývá typicky u pacientů středního a vyššího věku, poměrně často až v pokročilé fázi choroby. Z povrchových markerů je typická přítomnost CD5, čímž se odlišuje od FL. Exprese CD23 je jen velmi slabá či zcela chybí. Charakteristická je deregulovaná exprese cyklinu D1, a to v důsledku t(11;14). Jeho zvýšená exprese zapřičiňuje progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze a z toho vyplývající podporu proliferace. Skutečnost, že exprese cyklinu D1 je negativně regulována transkripčními faktory FOXO, naznačuje možný význam jejich inhibice v patofyziologii MCL (Schmidt *et al.*, 2002).

Děje se tomu tak opět prostřednictvím signalizace PI3K/Akt, jejíž narušení vede u buněk MCL k apoptóze. Zvýšené množství aktivovaného Akt bylo detekováno zejména u agresivnější, tzv. blastoidní formy MCL. Příčinou by mohla být úplná absence či snížení exprese *PTEN* či výskyt aktivační mutace přímo u PI3K. Svůj podíl má také miRNA, konkrétně cluster miR-17~92 podporuje aktivitu PI3K inhibicí fosfatázy PHLPP2, která je negativním regulátorem PI3K, stejně jako *PTEN*. Výsledná zvýšená aktivita Akt následně vede k fosforylaci řady efektorových molekul, včetně FOXO3a (Rao *et al.*, 2012; Rudelius *et al.*, 2006). Jak u buněčných linií MCL, tak u patientských vzorků byl prokázán výskyt cytoplazmatického, a tedy inaktivovaného FOXO3a. Z výsledku experimentů, aktivujících FOXO3a v těchto vzorcích, vyplývá ústřední úloha FOXO3a jako induktoru apoptózy buněk MCL. Právě inhibice jeho proapoptické aktivity je tedy klíčovým faktorem patogeneze MCL. Role FOXO1 se v tomto kontextu nezdá natolik významná, přestože je u buněk MCL také přítomen, avšak ve srovnání s FOXO3a v daleko menším množství (Obrador-Hevia *et al.*, 2012).

5.6 Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom (HL) se od ostatních lymfoproliferativních onemocnění (označovaných také jako NHL, viz výše) odlišuje zejména přítomností specifických buněčných populací, které mohou být značně odlišné od typického fenotypu B buněk. Jsou to jednak mononukleární buňky Hodgkinovy, vícejaderné buňky Reedové-Sternberga a také různorodé nenádorové buňky,

zánětlivé či podpůrné. Na základě poměru zastoupení těchto buněk, ale i dalších histologických kritérií, se pak HL rozdělují do několika typů. HL obecně představují přibližně 30 % všech lymfomů. Typicky se manifestují u mladých dospělých, u kterých postihují uzliny zejména v krční oblasti. V nátěru periferní krve ani v aspirační biopsii kostní dřeně nebývají maligní buňky detekovatelné, diagnóza se opírá o histologii napadené uzliny. Téměř polovina pacientů vykazuje symptomy typické pro lymfoproliferativní onemocnění, tedy úbytek hmotnosti, noční pocení a subfebrilie. Fenotyp buněk HL je typicky CD30+, CD15+, Ki67+ a často CD45- (Kanzler *et al.*, 1996).

Odlišnost HL od jiných lymfoproliferací je patrná i co se exprese *FOXO1* týče. Zatímco u NHL jsou jeho hladiny udržovány na určité úrovni, mnohdy i stejné jako u normálních B buněk, je u HL jeho exprese zcela potlačena. Kromě fosforylace prostřednictvím PI3K/Akt, jejíž vysoká aktivita je pro buňky HL typická, se zde uplatňují i jiné mechanismy inhibující FOXO1. K inhibici pomocí fosforylace zde vede také dráha MAPK/ERK, jejíž nepřetržitá aktivita je pro HL taktéž charakteristická. Dále je exprese *FOXO1* potlačována i na úrovni transkripce, a to díky přítomnosti zvýšeného množství specifických miRNA, konkrétně miR-96, miR-182 a miR-183. Kombinace těchto faktorů vede k efektivnímu zastavení veškeré aktivity FOXO1. Jeho nepřítomnost však nemusí být způsobena pouze aktivní represí. Mezi rekurentní cytogenetické abnormality totiž patří delece v oblasti 13q14, detekována u 11,3 % zkoumaných případů HL. V této oblasti se nachází lokus *FOXO1*, jehož exprese tak v důsledku delece není vůbec umožněna (Xie *et al.*, 2012).

Ukazuje se, že inhibice FOXO1 není pro buňky HL významná pouze pro potlačení jeho proapoptické aktivity. Nepřítomnost FOXO1 totiž zabraňuje expresi genu pro PRDM1, což je významný induktor diferenciaci plazmatických buněk. Tento vývoj je však u buněk HL potlačen, v čemž FOXO1 pravděpodobně sehrává podstatnou úlohu. Vzhledem k reciprokému vztahu mezi expresí PRDM1 a BCL-6, jehož induktorem je právě FOXO1, se pravděpodobně u FOXO1 jedná o aktivitu přítomnou výhradně u HL. Tato hypotéza je podpořena i skutečností, že u normálních B buněk nebyla pozorována role FOXO1 v diferenciaci do stadia buněk plazmatických (Vogel *et al.*, 2014). Naopak zvýšení hladin FOXO3a v procesu diferenciaci plazmocyty již bylo dříve popsáno. U HL, vzhledem k nutnosti potlačení další diferenciaci, je aktivita FOXO3a částečně tlumena. Stejně jako u FOXO1 i narušení inhibice FOXO3a vede ke zvýšení hladin PRDM1 a podpoře diferenciaci plazmatických buněk. Kromě výše zmíněných regulací prostřednictvím fosforylace, společných pro FOXO1 a FOXO3a, se na inhibici exprese

FOXO3a u HL podílí také miR-155 (Osswald *et al.*, 2018). Exprese *FOXO3a* však, jak již bylo zmíněno výše, není u buněk HL inhibována úplně. Její míra se pak v rámci jednotlivých buněčných populací HL liší, přičemž nejvyšší byla zaznamenána u klidových Hodgkinových buněk, potenciálně představujících rakovinné iniciační buňky, tj. CIC (cancer-initiating cells) (Ikeda *et al.*, 2013).

5.7 Mnohočetný myelom a Waldenströмова makroglobulinémie

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění postihující kostní dřeň, ve které dochází ke klonální proliferaci terminálně diferencovaných B buněk, tedy plazmocytů. Tyto navíc produkují monoklonální imunoglobulin, označovaný jako paraprotein, jehož akumulace v krevním řečišti může vést k poškození ledvin. Mezi další projevy MM patří zvýšení hladin Ca^{2+} v séru a z toho vyplývající polyurie, také dochází k rozvoji anémie. Postiženy jsou i kosti, přičemž přítomnost osteolytických ložisek je provázána chronickými bolestmi. Jde o relativně časté onemocnění představující 1 % ze všech malignit. Vznik tohoto onemocnění je spojován s chronickými infekcemi, případně s expozicí toxickým látkám či radiaci (Moreaux *et al.*, 2011).

Maligní plazmocyty exprimují silně CD38 a CD138, zatímco CD19 bývá při imunofenotypizaci negativní, na rozdíl od normálních plazmatických buněk. Až u 90 % nemocných bývá detekována nějaká cytogenetická abnormalita. Poměrně časté jsou translokace vedoucí k aktivaci protoonkogenu *c-MYC* v důsledku jeho přemístění do okolí silného enhanceru. Mezi rekurentně se vyskytující translokační oblasti patří i 6q21, kde se nachází lokus *FOXO3a*. V důsledku této translokace pak *c-MYC* využívá enhancer *FOXO3a* ke zvýšení míry své exprese (Affer *et al.*, 2014).

Patofyziologie buněk MM je silně závislá na signálech z mikroprostředí kostní dřeně. V reakci na přítomnost cytokinů či růstových faktorů (zejména IL-6 a IGF1) jsou pak potlačovány proapoptické a naopak stimulovány proliferální signální dráhy, zejména MAPK/ERK či PI3K/Akt (De Bruyne *et al.*, 2010). Akt pak dále fosforyluje GSK3 a FOXO3a podílející se na negativní regulaci antiapoptického proteinu MCL1 charakteristického pro plazmatické buňky. Jeho exprese, stejně jako dalších cílových genů FOXO3a (tj. FasL, Bim, p27^{kip}), je tak efektivně tlumena, což má za následek vysokou odolnost buněk MM k apoptóze i léčbě. Právě osa Akt/FOXO3a představuje atraktivní terapeutický cíl pro využití specifických inhibitorů. Množství Akt, resp. FOXO3a, v buňkách je také prognostickým markerem, přičemž s nepříznivou prognózou se pojí vysoká aktivita Akt a nepřítomnost FOXO3a (Bloedjes *et al.*,

2020; Y. Zhou *et al.*, 2008). Kromě regulace prostřednictvím fosforylace však signalizace PI3K/Akt a MAPK/ERK ovlivňují u MM *FOXO3a* i na epigenetické úrovni, jelikož v oblasti jeho promotoru zvyšují metylaci H3K9, zatímco metylaci H3K4 redukují (De Bruyne *et al.*, 2010).

Inhibice FOXO3a sehrává podstatnou úlohu i u Waldenströmovy makroglobulinémie (WM), což je lymfoproliferativní onemocnění typické přítomností plazmocytoidních lymfocytů secernujících ve velké míře IgM. Od MM se odlišuje méně diferenciovanými neoplastickými buňkami, které infiltrují převážně kostní dřeň, slezinu a lymfatické uzliny. Symptomy jsou způsobeny, podobně jako u MM, zejména v důsledku velkého množství monoklonálního proteinu v krvi (vedoucího až k tzv. hyperviskóznímu syndromu). Pro WM je typický výskyt aktivačních mutací *MYD88* či *CXCR4*, které následně stimulují expresi antiapoptických proteinů z rodiny BCL-2. Naopak exprese proteinu Bim, aktivátoru apoptózy, je zde inhibována, a to prostřednictvím miR-155. Jejím cílem je FOXO3a, pozitivní regulátor exprese Bim, jehož aktivita je takto zcela zastavena (Gaudette *et al.*, 2016).

Závěr

Transkripční faktory z rodiny FOXO se podílejí na regulaci metabolismu, diferenciaci a funkcí mnoha typů buněk. Jejich aktivita je nezbytná i pro správný vývoj a funkci B buněk, přičemž konkrétní mechanismy, kterými se na těchto procesech podílejí, byly v posledních letech předmětem řady studií. V tomto kontextu byly jako nejvýznamnější identifikovány FOXO1 a FOXO3a, které představují hlavní efekторы signální dráhy PI3K/Akt. Tato signalizace inhibuje jejich transkripční aktivitu, což je v souladu se známým významem PI3K/Akt jako signalizace podporující proliferaci, a transkripčních faktorů FOXO naopak jako inhibitorů buněčného cyklu a induktorů apoptózy. Mezi jejich transkripční cíle se zmíněnými funkcemi patří v kontextu B lymfocytů např. p27^{kip1} či proapoptické proteiny z rodiny BCL.

Nicméně byl prokázán i opačný efekt jejich aktivity, a to konkrétně klonální expanze v germinálních centrech, kterou vyvolává FOXO1. K té dochází fyziologicky ve tmavé zóně, za jejíž vznik FOXO1 také zodpovídá, a to po procesech vedoucích k vytvoření více afinního BCR vzhledem k danému antigenu. Tato proliferaci podporující úloha FOXO1 může být podkladem patogeneze B buněčných malignit, vznikajících právě z buněk germinálních center, tedy např. Burkittova lymfomu. U tohoto onemocnění byla skutečně potvrzena přítomnost transkripčně aktivního FOXO1 v jádře, která patrně zodpovídá za klonální proliferaci maligních B lymfocytů. FOXO1 je zde rezistentní k inhibičnímu účinku PI3K/Akt, a to jednak v důsledku mutací v oblastech normálně fosforylovaných prostřednictvím Akt, jednak z příčin dosud zcela neobjasněných,

U ostatních B buněčných malignit zmíněných v této práci obvykle dochází ke zvýšení intenzity signalizace PI3K/Akt, která obecně vede k podpoře buněčné proliferace, ke které přispívá také inhibice aktivity FOXO1 a FOXO3a. Vzhledem k tomu, že tato signalizace je provázána i se signální dráhou BCR, ovlivňují moderní cílená terapeutika inhibující BCR dráhu také aktivitu FOXO. Zabránění exportu FOXO1 a FOXO3a z jádra je jedním z mechanismů účinku ibrutinibu, inhibitoru Btk, či idelalisibu, inhibitoru PI3K. Nicméně ani zde nesehrávají FOXO zcela jednoznačnou úlohu, jelikož bylo prokázáno, že se FOXO1 může v určitém kontextu spolupodílet na vzniku rezistence k těmto terapeutikům. Konkrétně byla tato aktivita pozorována u buněk chronické lymfocytární leukémie, přičemž rezistence k oběma těmto léčivům byla zapříčiněna zvýšenou expresí rozdílných genů, jejichž společným regulátorem je FOXO1.

Z uvedených informací vyplývá, že přestože je o významu FOXO1 a FOXO3a, resp. jejich hlavní regulační signální dráhy PI3K/Akt, pro funkci normálních i maligních lymfocytů již známo mnoho, stále nejsou zcela objasněny všechny mechanismy jejich aktivity. Zdá se, že efekt transkripční aktivity FOXO1 a FOXO3a na procesy v B buňkách závisí na mnoha okolních faktorech, jelikož PI3K/Akt není jejich zdaleka jediným regulačním mechanismem. Právě pochopení složitých vztahů mezi různými dalšími signalizacemi, ale i např. mikroRNA či regulátory jejich transkripce, je klíčové pro budoucí výzkum a případný vývoj cílených terapeutik zaměřených proti FOXO samotným či jejich transkripční cílům, nebo naopak regulátorům. Míra exprese FOXO1, resp. FOXO3a či jejich mutační status může u některých B buněčných malignit představovat i potenciální prognostický marker, což nabízí další formu využití znalostí o těchto transkripčních faktorech v klinické praxi.

Literatura

- Affer, M., Chesi, M., Chen, W.-D. G., Keats, J. J., Demchenko, Y. N., Roschke, A. V., Van Wier, S., Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M.,** 2014. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*, 28(8), 1725–1735. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.70>
- Akerblad, P., & Sigvardsson, M.,** 1999. Early B cell factor is an activator of the B lymphoid kinase promoter in early B cell development. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(10), 5453–5461.
- Amin, R. H., Schlissel, M. S.,** 2008. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nature Immunology*, 9(6), 613–622. <https://doi.org/10.1038/ni.1612>
- Andjelic, S., Hsia, C., Suzuki, H., Kadowaki, T., Koyasu, S., Liou, H. C.,** 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(7), 3860–3867. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3860>
- Bakker, W. J., Harris, I. S., Mak, T. W.,** 2007. FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Molecular Cell*, 28(6), 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.035>
- Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D. C., An, J., Nagasawa, T., Cyster, J. G.,** 2013. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity*, 39(5), 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.038>

- Bigarella, C. L., Li, J., Rimmelé, P., Liang, R., Sobol, R. W., Ghaffari, S.,** 2017. FOXO3 Transcription Factor Is Essential for Protecting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Oxidative DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(7), 3005–3015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.769455>
- Blink, E. J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M.,** 2005. Early appearance of germinal center–derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(4), 545–554. <https://doi.org/10.1084/jem.20042060>
- Bloedjes, T. A., de Wilde, G., Maas, C., Eldering, E., Bende, R. J., van Noesel, C. J. M., Pals, S. T., Spaargaren, M., Guikema, J. E. J.,** 2020. AKT signaling restrains tumor suppressive functions of FOXO transcription factors and GSK3 kinase in multiple myeloma. *Blood Advances*, 4(17), 4151–4164. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001393>
- Bouska, A., Zhang, W., Gong, Q., Iqbal, J., Scuto, A., Vose, J., Ludvigsen, M., Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Rosenwald, A., Ott, G., Campo, E., Rimsza, L. M., Delabie, J., Jaffe, E. S., Braziel, R. M., Connors, J. M., ... Chan, W. C.,** 2017. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia*, 31(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.175>
- Brenkman, A. B., de Keizer, P. L. J., van den Broek, N. J. F., Jochemsen, A. G., & Burgering, B. M. T.,** 2008. Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PloS One*, 3(7), e2819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002819>
- Brent, M. M., Anand, R., Marmorstein, R.,** 2008. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure (London, England: 1993)*, 16(9), 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.013>

- Brownawell, A. M., Kops, G. J., Macara, I. G., Burgering, B. M.**, 2001. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), 3534–3546. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3534-3546.2001>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E.**, 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4)
- Bulian, P., Shanafelt, T. D., Fegan, C., Zucchetto, A., Cro, L., Nüchel, H., Baldini, L., Kurtova, A. V., Ferrajoli, A., Burger, J. A., Gaidano, G., Del Poeta, G., Pepper, C., Rossi, D., Gattei, V.**, 2014. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(9), 897–904. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8515>
- Calamito, M., Juntilla, M. M., Thomas, M., Northrup, D. L., Rathmell, J., Birnbaum, M. J., Koretzky, G., Allman, D.**, 2010. Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood*, 115(20), 4043–4050. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241638>
- Calissi, G., Lam, E. W.-F., Link, W.**, 2021. Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(1), 21–38. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0088-2>
- Casamayor-Palleja, M., Feuillard, J., Ball, J., Drew, M., MacLennan, I. C.**, 1996. Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. *International Immunology*, 8(5), 737–744. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.737>

- Cornelis, R., Hahne, S., Taddeo, A., Petkau, G., Malko, D., Durek, P., Thiem, M., Heiberger, L., Peter, L., Mohr, E., Klaeden, C., Tokoyoda, K., Siracusa, F., Hoyer, B. F., Hiepe, F., Mashreghi, M.-F., Melchers, F., Chang, H.-D., Radbruch, A., 2020.** Stromal Cell-Contact Dependent PI3K and APRIL Induced NF- κ B Signaling Prevent Mitochondrial- and ER Stress Induced Death of Memory Plasma Cells. *Cell Reports*, 32(5), 107982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107982>
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N., 1999.** Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1840–1847.
- De Bruyne, E., Bos, T. J., Schuit, F., Van Valckenborgh, E., Menu, E., Thorrez, L., Atadja, P., Jernberg-Wiklund, H., Vanderkerken, K., 2010.** IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood*, 115(12), 2430–2440. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-232801>
- de Frias, M., Iglesias-Serret, D., Cosiàlls, A. M., Coll-Mulet, L., Santidrián, A. F., González-Gironès, D. M., de la Banda, E., Pons, G., Gil, J., 2009.** Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 94(12), 1698–1707. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.004028>
- Dengler, H. S., Baracho, G. V., Omori, S. A., Bruckner, S., Arden, K., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., Rickert, R. C., 2008.** Distinct roles for Foxo1 at multiple stages of B cell differentiation. *Nature immunology*, 9(12), 1388–1398. <https://doi.org/10.1038/ni.1667>

- Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., Tzivion, G.,** 2011. Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(8), 1453–1464. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.001>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., Lichter, P.,** 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343(26), 1910–1916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>
- Dominguez-Sola, D., Kung, J., Holmes, A. B., Wells, V. A., Mo, T., Basso, K., Dalla-Favera, R.,** 2015. The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program. *Immunity*, 43(6), 1064–1074. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.015>
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J., & Demoulin, J.-B.,** 2009. The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10334–10342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808848200>
- García-Martínez, J. M., Wullschleger, S., Preston, G., Guichard, S., Fleming, S., Alessi, D. R., Duce, S. L.,** 2011. Effect of PI3K- and mTOR-specific inhibitors on spontaneous B-cell follicular lymphomas in PTEN/LKB1-deficient mice. *British Journal of Cancer*, 104(7), 1116–1125. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.83>
- Gaudette, B. T., Dwivedi, B., Chitta, K. S., Poulain, S., Powell, D., Vertino, P., Leleu, X., Lonial, S., Chanan-Khan, A. A., Kowalski, J., Boise, L. H.,** 2016. Low expression of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins sets the apoptotic threshold in Waldenström macroglobulinemia. *Oncogene*, 35(4), 479–490. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.103>

- Gehring, F., Weissinger, S. E., Swier, L. J., Möller, P., Wirth, T., Ushmorov, A.,** 2019. FOXO1 Confers Maintenance of the Dark Zone Proliferation and Survival Program and Can Be Pharmacologically Targeted in Burkitt Lymphoma. *Cancers*, 11(10), E1427. <https://doi.org/10.3390/cancers11101427>
- Go, H., Jang, J.-Y., Kim, P.-J., Kim, Y.-G., Nam, S. J., Paik, J. H., Kim, T. M., Heo, D. S., Kim, C.-W., Jeon, Y. K.,** 2015. MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 6(17), 15035–15049.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P., Unterman, T.,** 1999. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17184–17192. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17184>
- Hansen, I. A., Sieglaff, D. H., Munro, J. B., Shiao, S.-H., Cruz, J., Lee, I. W., Heraty, J. M., Raikhel, A. S.,** 2007. Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(9), 985–997. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.008>
- Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A., & Goodnow, C. C.,** 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: Arrested development and cell death. *Cell*, 72(3), 325–335. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90111-3)
- Hatta, M., Cirillo, L. A.,** 2007. Chromatin opening and stable perturbation of core histone:DNA contacts by FoxO1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35583–35593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704735200>

- Herold, M. J., Rohrbeck, L., Lang, M. J., Grumont, R., Gerondakis, S., Tai, L., Bouillet, P., Kaufmann, T., Strasser, A.**, 2013. Foxo-mediated Bim transcription is dispensable for the apoptosis of hematopoietic cells that is mediated by this BH3-only protein. *EMBO Reports*, *14*(11), 992–998. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.152>
- Hinman, R. M., Bushanam, J. N., Nichols, W. A., Satterthwaite, A. B.**, 2007. B cell receptor signaling down-regulates forkhead box transcription factor class O 1 mRNA expression via phosphatidylinositol 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(2), 740–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.740>
- Hinman, R. M., Nichols, W. A., Diaz, T. M., Gallardo, T. D., Castrillon, D. H., Satterthwaite, A. B.**, 2009. Foxo3^{-/-} mice demonstrate reduced numbers of pre-B and recirculating B cells but normal splenic B cell sub-population distribution. *International Immunology*, *21*(7), 831–842. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp049>
- Chen, J., Limon, J. J., Blanc, C., Peng, S. L., Fruman, D. A.**, 2010. Foxo1 regulates marginal zone B-cell development. *European Journal of Immunology*, *40*(7), 1890–1896. <https://doi.org/10.1002/eji.200939817>
- Christensen, R., de la Torre-Ubieta, L., Bonni, A., Colón-Ramos, D. A.**, 2011. A conserved PTEN/FOXO pathway regulates neuronal morphology during *C. elegans* development. *Development*, *138*(23), 5257–5267. <https://doi.org/10.1242/dev.069062>
- Ikeda, J.-I., Tian, T., Wang, Y., Hori, Y., Honma, K., Wada, N., Morii, E.**, 2013. Expression of FoxO3a in clinical cases of malignant lymphoma. *Pathology, research and practice*, *209*. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.08.003>

- Inoue, T., Shinnakasu, R., Ise, W., Kawai, C., Egawa, T., Kurosaki, T.,** 2017. The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(4), 1181–1198. <https://doi.org/10.1084/jem.20161263>
- Jacobs, F. M. J., Heide, L. P. van der, Wijchers, P. J. E. C., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M., Smidt, M. P.,** 2003. FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35959–35967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302804200>
- Jarosova, M., Hrubá, M., Oltová, A., Plevová, K., Kruzová, L., Kriegová, E., Fillerová, R., Koritáková, E., Doubek, M., Lysak, D., Procházka, V., Mraz, M., Indrak, K., & Papajik, T.,** 2017. Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *American Journal of Hematology*, 92(10), E604–E607. <https://doi.org/10.1002/ajh.24852>
- Jian, M., Yunjia, Z., Zhiying, D., Yanduo, J., Guocheng, J.,** 2019. Interleukin 7 receptor activates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway via downregulation of Beclin-1 in lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 58(3), 358–365. <https://doi.org/10.1002/mc.22933>
- Kabrani, E., Chu, V. T., Tasouri, E., Sommermann, T., Baßler, K., Ulas, T., Zenz, T., Bullinger, L., Schultze, J. L., Rajewsky, K., Sander, S.,** 2018. Nuclear FOXO1 promotes lymphomagenesis in germinal center B cells. *Blood*, 132(25), 2670–2683. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856203>
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M. L., Rajewsky, K.,** 1996. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(4), 1495–1505. <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1495>

- Kapoor, I., Li, Y., Sharma, A., Zhu, H., Bodo, J., Xu, W., Hsi, E. D., Hill, B. T., Almasan, A.,** 2019. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death & Disease*, 10(12), 924. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2158-0>
- Kuo, T. C., Schlissel, M. S.,** 2009. Mechanisms controlling expression of the RAG locus during lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology*, 21(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.008>
- Lee, K., Heffington, L., Jellusova, J., Nam, K. T., Raybuck, A., Cho, S. H., Thomas, J. W., Rickert, R. C., Boothby, M.,** 2013. Requirement for Rictor in homeostasis and function of mature B lymphoid cells. *Blood*, 122(14), 2369–2379. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-477505>
- Lechner, M., Engleitner, T., Babushku, T., Schmidt-Supprian, M., Rad, R., Strobl, L. J., & Zimmer-Strobl, U.,** 2021. Notch2-mediated plasticity between marginal zone and follicular B cells. *Nature Communications*, 12(1), 1111. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21359-1>
- Limon, J. J., Fruman, D. A.,** 2012. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 3, 228. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00228>
- Lo Coco, F., Gaidano, G., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S., Dalla-Favera, R.,** 1993. P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood*, 82(8), 2289–2295.
- Maehama, T., Dixon, J. E.,** 1998. The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13375–13378. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13375>

- Matolcsy, A., Casali, P., Warnke, R. A., Knowles, D. M.,** 1996. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood*, 88(10), 3937–3944.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., Fukamizu, A.,** 2005. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11278–11283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502738102>
- Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., Chiorazzi, N.,** 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 755–764. <https://doi.org/10.1172/JCI200523409>
- Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A.,** 2007. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.02.001>
- Miyamoto, K., Miyamoto, T., Kato, R., Yoshimura, A., Motoyama, N., Suda, T.,** 2008. FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging. *Blood*, 112(12), 4485–4493. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-159848>

- Moreaux, J., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maïga, S., Hose, D., Goldschmidt, H., Jauch, A., Rème, T., Jourdan, M., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C.,** 2011. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*, 96(4), 574–582. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033456>
- Morin, R. D., Assouline, S., Alcaide, M., Mohajeri, A., Johnston, R. L., Chong, L., Grewal, J., Yu, S., Fornika, D., Bushell, K., Nielsen, T. H., Petrogiannis-Haliotis, T., Crump, M., Tosikyan, A., Grande, B. M., MacDonald, D., Rousseau, C., Bayat, M., Sesques, P., ... Johnson, N. A.,** 2016. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*, 22(9), 2290–2300. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2123>
- Munro, J. M., Briscoe, D. M., Tedder, T. F.,** 1996. Differential regulation of leucocyte L-selectin (CD62L) expression in normal lymphoid and inflamed extralymphoid tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 49(9), 721–727.
- Nakagawa, S., Gisselbrecht, S. S., Rogers, J. M., Hartl, D. L., Bulyk, M. L.,** 2013. DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12349–12354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310430110>
- Nielsen, M. D., Luo, X., Biteau, B., Syverson, K., Jasper, H.,** 2008. 14-3-3 ϵ antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging cell*, 7(5), 10.1111/j.1474-9726.2008.00420.x. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00420.x>

- Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Fukada, T., Ohtani, T., Shirogane, T., Atsumi, T., Takahashi-Tezuka, M., Ishihara, K., Hibi, M., Hirano, T.,** 1999. Gab-Family Adapter Proteins Act Downstream of Cytokine and Growth Factor Receptors and T- and B-Cell Antigen Receptors. *Blood*, 93(6), 1809–1816. https://doi.org/10.1182/blood.V93.6.1809.406k35_1809_1816
- Obrador-Hevia, A., Serra-Sitjar, M., Rodríguez, J., Villalonga, P., Fernández de Mattos, S.,** 2012. The tumour suppressor FOXO3 is a key regulator of mantle cell lymphoma proliferation and survival. *British Journal of Haematology*, 156(3), 334–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08951.x>
- Obsil, T., Obsilova, V.,** 2008. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27(16), 2263–2275. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.20>
- Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T.,** 2005. 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4. *Biochemistry*, 44(34), 11608–11617. <https://doi.org/10.1021/bi050618r>
- Oestreich, K. J., Mohn, S. E., Weinmann, A. S.,** 2012. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nature Immunology*, 13(4), 405–411. <https://doi.org/10.1038/ni.2242>
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., Baltimore, D.,** 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4962), 1517–1523. <https://doi.org/10.1126/science.2360047>

- Oh, H.-M., Yu, C.-R., Golestaneh, N., Amadi-Obi, A., Lee, Y. S., Eseonu, A., Mahdi, R. M., Egwuagu, C. E.**, 2011. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30888–30897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253500>
- Omori, S. A., Cato, M. H., Anzelon-Mills, A., Puri, K. D., Shapiro-Shelef, M., Calame, K., Rickert, R. C.**, 2006. Regulation of class-switch recombination and plasma cell differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Immunity*, 25(4), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.015>
- O’Riordan, M., Grosschedl, R.**, 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*, 11(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80078-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80078-3)
- Osswald, C. D., Xie, L., Guan, H., Herrmann, F., Pick, S. M., Vogel, M. J., Gehringer, F., Chan, F. C., Steidl, C., Wirth, T., Ushmorov, A.**, 2018. Fine-tuning of FOXO3A in cHL as a survival mechanism and a hallmark of abortive plasma cell differentiation. *Blood*, 131(14), 1556–1567. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-795278>
- Ottens, K., Hinman, R. M., Barrios, E., Skaug, B., Davis, L. S., Li, Q.-Z., Castrillon, D. H., Satterthwaite, A. B.**, 2018. Foxo3 promotes apoptosis of BCR-stimulated immature B cells, thus limiting the window for receptor editing. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 201(3), 940–949. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701070>
- Park, M. K., Yao, Y., Xia, W., Setijono, S. R., Kim, J. H., Vila, I. K., Chiu, H.-H., Wu, Y., Billalabeitia, E. G., Lee, M. G., Kalb, R. G., Hung, M.-C., Pandolfi, P. P., Song, S. J., Song, M. S.**, 2019. PTEN self-regulates through USP11 via the PI3K-FOXO pathway to stabilize tumor suppression. *Nature Communications*, 10, 636. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08481-x>

- Pasqualucci, L., Khiabanian, H., Fangazio, M., Vasishtha, M., Messina, M., Holmes, A. B., Ouillette, P., Trifonov, V., Rossi, D., Tabbò, F., Ponzoni, M., Chadburn, A., Murty, V. V., Bhagat, G., Gaidano, G., Inghirami, G., Malek, S. N., Rabadan, R., Dalla-Favera, R.,** 2014. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Reports*, 6(1), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.027>
- Pastore, A., Jurinovic, V., Kridel, R., Hoster, E., Staiger, A. M., Szczepanowski, M., Pott, C., Kopp, N., Murakami, M., Horn, H., Leich, E., Moccia, A. A., Mottok, A., Sunkavalli, A., Van Hummelen, P., Ducar, M., Ennishi, D., Shulha, H. P., Hother, C., ... Weigert, O.,** 2015. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: A retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet. Oncology*, 16(9), 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00169-2)
- Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., Yssel, H.,** 2004. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), 5154–5157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5154>
- Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S.-S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., Dietze, K., Nogai, H., Storek, B., Madle, H., Dörken, B., Janz, M., Dirnhofer, S., Lenz, P., Hummel, M., Tzankov, A., Lenz, G.,** 2013. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12420–12425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305656110>

- Phan, R. T., Dalla-Favera, R.**, 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432(7017), 635–639. <https://doi.org/10.1038/nature03147>
- Pickleman, J. R., Straus, F. H., Griffin, E. D., Reyes, H. M., Replogle, R. L.**, 1972. Burkitt's Lymphoma: An unusual childhood tumor. *Annals of Surgery*, 176(1), 25–29. <https://doi.org/10.1097/00000658-197207000-00006>
- Psenakova, K., Kohoutova, K., Obsilova, V., Ausserlechner, M. J., Veverka, V., Obsil, T.**, 2019. Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells*, 8(9), E966. <https://doi.org/10.3390/cells8090966>
- Rao, E., Jiang, C., Ji, M., Huang, X., Iqbal, J., Lenz, G., Wright, G., Staudt, L. M., Zhao, Y., McKeithan, T. W., Chan, W. C., Fu, K.**, 2012. The miRNA-17~92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia*, 26(5), 1064–1072. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.305>
- Rao, P. H., Houldsworth, J., Dyomina, K., Parsa, N. Z., Cigudosa, J. C., Louie, D. C., Popplewell, L., Offit, K., Jhanwar, S. C., Chaganti, R. S. K.**, 1998. Chromosomal and Gene Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*, 92(1), 234–240. https://doi.org/10.1182/blood.V92.1.234.413k22_234_240
- Rassenti, L. Z., Huynh, L., Toy, T. L., Chen, L., Keating, M. J., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Flinn, I. W., Rai, K. R., Byrd, J. C., Kay, N. E., Greaves, A., Weiss, A., Kipps, T. J.**, 2004. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351(9), 893–901. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040857>

- Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G., Cohen, P.,** 1999. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17179–17183. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17179>
- Rivard, R. S., Morris, J. M., Youngman, M. J.,** 2020. The PP2A/4/6 subfamily of phosphoprotein phosphatases regulates DAF-16 and confers resistance to environmental stress in postreproductive adult *C. elegans*. *PLoS ONE*, 15(12), e0229812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229812>
- Roberto, M. P., Varano, G., Vinas-Castells, R., Holmes, A. B., Kumar, R., Pasqualucci, L., Farinha, P., Scott, D. W., Dominguez-Sola, D.,** 2021. Mutations in the transcription factor FOXO1 mimic positive selection signals to promote germinal center B cell expansion and lymphomagenesis. *Immunity*, 54(8), 1807-1824.e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.009>
- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T. H.-T., Fend, F., Jaffe, E. S., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M.,** 2006. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, 108(5), 1668–1676. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015586>
- Sander, C. A., Yano, T., Clark, H. M., Harris, C., Longo, D. L., Jaffe, E. S., Raffeld, M.,** 1993. P53 Mutation Is Associated With Progression in Follicular Lymphomas. *Blood*, 82(7), 1994–2004. <https://doi.org/10.1182/blood.V82.7.1994.1994>
- Sander, S., Calado, D. P., Srinivasan, L., Köchert, K., Zhang, B., Rosolowski, M., Rodig, S. J., Holzmann, K., Stilgenbauer, S., Siebert, R., Bullinger, L., Rajewsky, K.,** 2012. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 22(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.012>

- Sander, S., Chu, V. T., Yasuda, T., Franklin, A., Graf, R., Calado, D. P., Li, S., Imami, K., Selbach, M., Di Virgilio, M., Bullinger, L., Rajewsky, K., 2015.** PI3 Kinase and FOXO1 Transcription Factor Activity Differentially Control B Cells in the Germinal Center Light and Dark Zones. *Immunity*, 43(6), 1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.021>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M., 2005.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Scott, G. B., de Wynter, E. A., Cook, G. P., 2010.** Detecting variable (V), diversity (D) and joining (J) gene segment recombination using a two-colour fluorescence system. *Mobile DNA*, 1(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-1-9>
- Seda, V., Vojackova, E., Ondrisova, L., Kostalova, L., Sharma, S., Loja, T., Mladonicka Pavlasova, G., Zicha, D., Kudlickova Peskova, M., Krivanek, J., Liskova, K., Kren, L., Benes, V., Musilova Litzmanova, K., Borsky, M., Oppelt, J., Verner, J., Pospisilova, S., Brychtova, Y., ... Mraz, M., 2021.** FoxO1-GAB1 axis regulates homing capacity and tonic AKT activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 138(9), 758–772. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008101>
- Setz, C. S., Khadour, A., Renna, V., Iype, J., Gentner, E., He, X., Datta, M., Young, M., Nitschke, L., Wienands, J., Maity, P. C., Reth, M., Jumaa, H., 2019.** Pten controls B-cell responsiveness and germinal center reaction by regulating the expression of IgD BCR. *The EMBO Journal*, 38(11), e100249. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100249>

- Scheffold, A., Jebaraj, B. M. C., Tausch, E., Bloehdorn, J., Ghia, P., Yahiaoui, A., Dolnik, A., Blätte, T. J., Bullinger, L., Dheenadayalan, R. P., Li, L., Schneider, C., Chen, S.-S., Chiorazzi, N., Dietrich, S., Seiffert, M., Tannheimer, S., Döhner, H., Mertens, D., Stilgenbauer, S.**, 2019. IGF1R as druggable target mediating PI3K- δ inhibitor resistance in a murine model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *134*(6), 534–547. <https://doi.org/10.1182/blood.2018881029>
- Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G. J. P. L., Lam, E. W.-F., Burgering, B. M. T., Medema, R. H.**, 2002. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(22), 7842–7852. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.7842-7852.2002>
- Schroers, R., Griesinger, F., Trümper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., Sellmann, L., Dührsen, U., Dürig, J.**, 2005. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *19*(5), 750–758. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403707>
- Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., Obsil, T.**, 2009. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19349–19360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002725>
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., DePinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L., Rajewsky, K.**, 2009. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*, *139*(3), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.041>

- Stevenson, F. K., Krysov, S., Davies, A. J., Steele, A. J., Packham, G.,** 2011. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *118*(16), 4313–4320. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-338855>
- Suzuki, A., Kaisho, T., Ohishi, M., Tsukio-Yamaguchi, M., Tsubata, T., Koni, P. A., Sasaki, T., Mak, T. W., Nakano, T.,** 2003. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, *197*(5), 657–667. <https://doi.org/10.1084/jem.20021101>
- Szydłowski, M., Jabłońska, E., Juszczyński, P.,** 2014. FOXO1 transcription factor: A critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development. *International Reviews of Immunology*, *33*(2), 146–157. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.885022>
- Szydłowski, M., Kiliszek, P., Sewastianik, T., Jablonska, E., Bialopiotrowicz, E., Gorniak, P., Polak, A., Markowicz, S., Nowak, E., Grygorowicz, M. A., Prochorec-Sobieszek, M., Szumera-Cieckiewicz, A., Malenda, A., Lech-Maranda, E., Warzocha, K., Juszczyński, P.,** 2016. FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, *127*(6), 739–748. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-654111>
- Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.,** 2005. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *106*(5), 1770–1777. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0542>
- Ticchioni, M., Essafi, M., Jeandel, P. Y., Davi, F., Cassuto, J. P., Deckert, M., Bernard, A.,** 2007. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*, *26*(50), 7081–7091. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210519>

- Tooze, R. M.**, 2013. A replicative self-renewal model for long-lived plasma cells: Questioning irreversible cell cycle exit. *Frontiers in Immunology*, 4, 460. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00460>
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passegué, E., DePinho, R. A., Gilliland, D. G.**, 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 128(2), 325–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.003>
- Trinh, D. L., Scott, D. W., Morin, R. D., Mendez-Lago, M., An, J., Jones, S. J. M., Mungall, A. J., Zhao, Y., Schein, J., Steidl, C., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Marra, M. A.**, 2013. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 121(18), 3666–3674. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-479865>
- Troutman, T. D., Hu, W., Fulenchek, S., Yamazaki, T., Kurosaki, T., Bazan, J. F., Pasare, C.**, 2012. Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), 273–278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118579109>
- Tsang, P., Cesarman, E., Chadburn, A., Liu, Y. F., Knowles, D. M.**, 1996. Molecular characterization of primary mediastinal B cell lymphoma. *The American Journal of Pathology*, 148(6), 2017–2025.
- Uddin, S., Hussain, A. R., Siraj, A. K., Manogaran, P. S., Al-Jomah, N. A., Moorji, A., Atizado, V., Al-Dayel, F., Belgaumi, A., El-Solh, H., Ezzat, A., Bavi, P., Al-Kuraya, K. S.**, 2006. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood*, 108(13), 4178–4186. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016907>

- Ushmorov, A., Wirth, T.**, 2018. FOXO in B-cell lymphopoiesis and B cell neoplasia. *Seminars in Cancer Biology*, 50, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.07.008>
- van Boxtel, R., Gomez-Puerto, C., Mokry, M., Eijkelenboom, A., van der Vos, K. E., Nieuwenhuis, E. E., Burgering, B. M., Lam, E. W.-F., Coffier, P. J.**, 2013. FOXP1 acts through a negative feedback loop to suppress FOXO-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 20(9), 1219–1229. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.81>
- van Keimpema, M., Grüneberg, L. J., Mokry, M., van Boxtel, R., van Zelm, M. C., Coffier, P., Pals, S. T., Spaargaren, M.**, 2015. The forkhead transcription factor FOXP1 represses human plasma cell differentiation. *Blood*, 126(18), 2098–2109. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-626176>
- Verkoczy, L., Duong, B., Skog, P., Aït-Azzouzene, D., Puri, K., Vela, J. L., Nemazee, D.**, 2007. Basal B Cell Receptor-Directed Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Turns Off RAGs and Promotes B Cell-Positive Selection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), 6332–6341.
- Victoria, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., Nussenzweig, M. C.**, 2012. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, 120(11), 2240–2248. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415380>
- Vogel, M. J., Xie, L., Guan, H., Tooze, R. M., Maier, T., Kostezka, U., Maier, H. J., Holzmann, K., Chan, F. C., Steidl, C., Reichel, J. B., Weitzer, C. D., Gehringer, F., Kick, A. B., Cesarman, E., Roshal, M., Gascoyne, R. D., Möller, P., Wirth, T., Ushmorov, A.**, 2014. FOXO1 repression contributes to block of plasma cell differentiation in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 124(20), 3118–3129. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-590570>

- Wang, F., Marshall, C. B., Yamamoto, K., Li, G.-Y., Plevin, M. J., You, H., Mak, T. W., Ikura, M.,** 2008. Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53. *Journal of Molecular Biology*, 384(3), 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.025>
- Welinder, E., Mansson, R., Mercer, E. M., Bryder, D., Sigvardsson, M., Murre, C.,** 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17402–17407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111766108>
- Xie, L., Ritz, O., Leithäuser, F., Guan, H., Färbinger, J., Weitzer, C. D., Gehringer, F., Brüderlein, S., Holzmann, K., Vogel, M. J., Möller, P., Wirth, T., Ushmorov, A.,** 2014. FOXO1 downregulation contributes to the oncogenic program of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 5(14), 5392–5402.
- Xie, L., Ushmorov, A., Leithäuser, F., Guan, H., Steidl, C., Färbinger, J., Pelzer, C., Vogel, M. J., Maier, H. J., Gascoyne, R. D., Möller, P., Wirth, T.,** 2012. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 119(15), 3503–3511. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-381905>
- Yalcin, S., Zhang, X., Luciano, J. P., Mungamuri, S. K., Marinkovic, D., Vercherat, C., Sarkar, A., Grisotto, M., Taneja, R., Ghaffari, S.,** 2008. Foxo3 Is Essential for the Regulation of Ataxia Telangiectasia Mutated and Oxidative Stress-mediated Homeostasis of Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25692–25705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800517200>
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., Fukamizu, A.,** 2008. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Molecular Cell*, 32(2), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.013>

- Yan, L., Lavin, V. A., Moser, L. R., Cui, Q., Kanies, C., Yang, E.,** 2008. PP2A Regulates the Pro-apoptotic Activity of FOXO1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7411–7420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708083200>
- You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., Mak, T. W.,** 2006. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1657–1663. <https://doi.org/10.1084/jem.20060353>
- Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M. G., Chen, J., Fruman, D. A.,** 2004. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood*, 104(3), 784–787. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3071>
- Zani, V. J., Asou, N., Jadayel, D., Heward, J. M., Shipley, J., Nacheva, E., Takasuki, K., Catovsky, D., Dyer, M. J.,** 1996. Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon. *Blood*, 87(8), 3124–3134.
- Zhao, Y., Fei, M., Wang, Y., Lu, M., Cheng, C., Shen, A.,** 2008. Expression of Foxo3a in non-Hodgkin's lymphomas is correlated with cell cycle inhibitor p27. *European Journal of Haematology*, 81(2), 83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01077.x>
- Zhou, P., Blain, A. E., Newman, A. M., Zaka, M., Chagaluka, G., Adlar, F. R., Offor, U. T., Broadbent, C., Chaytor, L., Whitehead, A., Hall, A., O'Connor, H., Van Noorden, S., Lampert, I., Bailey, S., Molyneux, E., Bacon, C. M., Bomken, S., Rand, V.,** 2019. Sporadic and endemic Burkitt lymphoma have frequent FOXO1 mutations but distinct hotspots in the AKT recognition motif. *Blood Advances*, 3(14), 2118–2127. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018029546>

- Zhou, Y., Uddin, S., Zimmerman, T., Kang, J.-A., Ulaszek, J., Wickrema, A.,** 2008. Growth Control of Multiple Myeloma Cells through Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. *Leukemia & lymphoma*, 49(10), 1945–1953. <https://doi.org/10.1080/10428190802304966>
- Zhu, L., Chang, C.-H., Dunnick, W.,** 2011. Excessive amounts of mu heavy chain block B-cell development. *International Immunology*, 23(9), 545–551. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr049>
- Zhu, W. L., Tong, H., Teh, J. T., & Wang, M.,** 2014. Forkhead box protein O3 transcription factor negatively regulates autophagy in human cancer cells by inhibiting forkhead box protein O1 expression and cytosolic accumulation. *PloS One*, 9(12), e115087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115087>
- Zhuang, J., Hawkins, S. F., Glenn, M. A., Lin, K., Johnson, G. G., Carter, A., Cawley, J. C., Pettitt, A. R.,** 2010. Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: The therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica*, 95(1), 110–118. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.010272>