

Rola ścieżki sygnałowej PI3K-AKT w ontogenezie limfocytów B i patogenezie nowotworów B-komórkowych. Część I

PI3K-AKT axis in normal lymphoid development and B-cell tumors. Part I

Maciej Szydłowski, Ewa Jabłońska, Przemysław Juszczynski

Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Zrozumienie roli, jaką białka i szlaki sygnałowe z nimi powiązane odgrywają w patogenezie nowotworów B-komórkowych, wymaga wyjaśnienia ich funkcji w ontogenezie limfocytów. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydylinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K-AKT) i jej efekторы, w szczególności czynniki transkrypcyjne FOXO, odgrywają istotną rolę w kontroli rozwoju limfocytów B i patogenezie wielu nowotworów B-komórkowych. Oś PI3K-AKT-FOXO reguluje kluczowe dla komórek B procesy, takie jak: proliferacja, cykl komórkowy, apoptoza, stres oksydacyjny czy naprawa uszkodzeń DNA. W pracy przedstawiono molekularne mechanizmy przekazywania sygnału zależnego od osi PI3K-AKT i mechanizmy modulujące jej aktywność oraz ich udział we wczesnym rozwoju limfocytów B, homeostazie obwodowych komórek B i ich końcowym różnicowaniu. W kolejnej części pracy zostaną przedstawione patogenetyczne konsekwencje zaburzeń aktywności osi PI3K-AKT-FOXO w nowotworach B-komórkowych oraz potencjalne zastosowania modulatorów aktywności tej kaskady w ich leczeniu.

Słowa kluczowe: rozwój limfocytów B, PI3K-AKT, FOXO

Hematologia 2013; 4, 2: 103–113

Abstract

Understanding the role of signalling pathways in the pathogenesis of B-cell malignancies requires elucidation of their function in the normal B cell ontogeny. Studies performed so far underscore the role of the PI3K-AKT signalling cascade and its downstream effectors, especially FOXO transcription factors, in control of B cell development and in the pathogenesis of various B-cell tumors. PI3K-AKT-FOXO axis is known to regulate key processes in B cells, such as proliferation, cell cycle, apoptosis, oxidative stress or DNA damage repair. Herein, we review molecular mechanisms of the PI3K-AKT-dependent signal transduction, mechanisms modulating activity of the axis and their impact on early B cell development, peripheral B cell homeostasis and terminal B-cell differentiation. In the next part of the review, functional consequences of the PI3K-AKT-FOXO signalling deregulation in B-cell tumors and potential use of molecules modulating activity of the axis in the treatment of B-cell malignancies will be discussed.

Key words: B cell development, PI3K-AKT, FOXO

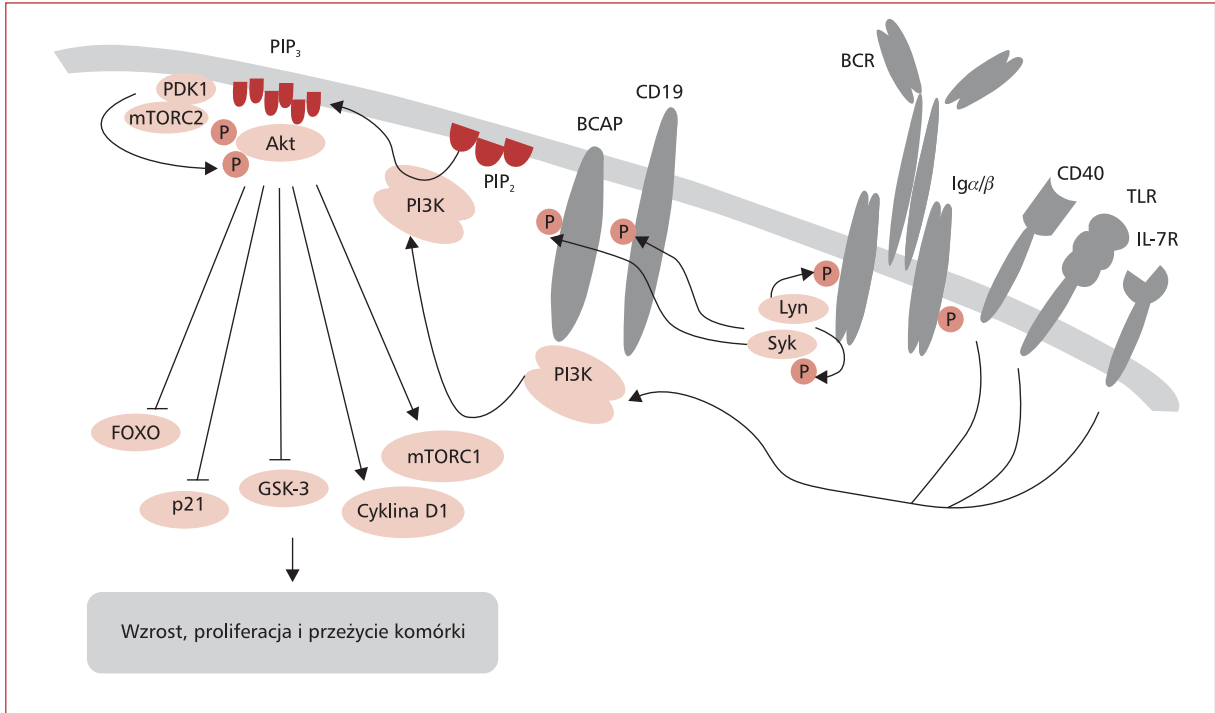
Hematologia 2013; 4, 2: 103–113

Układ sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i AKT w limfocytach

Rozwój i różnicowanie komórek B jest złożonym procesem regulowanym w głównej mierze przez pochodzące z mikrośrodowiska sygnały cytokinowe, kontakt z innymi komórkami oraz sygnały receptora B-komórkowego (BCR, *B cell receptor*) i prekursorowego BCR (pre-BCR). Jednym z głównych wspólnych mechanizmów efektorowych wyzwalanych przez te receptory jest ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*) i kinazy białkowej AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*). Kinazy lipidowe PI3K zawdzięczają swą nazwę zdolności do fosforylowania pierścienia inozytolowego fosfatydyloinozytolu w pozycji 3-hydroksylowej [1]. Rodzina kinaz PI3K obejmuje trzy klasy (I, II, III), z których klasa I odgrywa największą rolę w homeostazie układu immunologicznego. Kinazy I klasy mogą być aktywowane przez sygnały receptorów związanych z kinazami tyrozynowymi (klasa IA) lub sygnały zależne od receptorów związanych z białkami G (klasa IB). Kinazy klasy IB odgrywają istotną rolę w rozwoju i różnicowaniu komórek T, ale ich delecja nie wpływa istotnie na różnicowanie linii B [2, 3]. Z kolei klasa IA odgrywa znacznie większą rolę w rozwoju komórek B [4, 5]. Kinazy PI3K klasy IA stanowią kompleks enzymatyczny złożony z jednej z trzech podjednostek katalitycznych (p110 α , p110 β , p110 δ) oraz jednej z pięciu podjednostek regulatorowych (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , lub p50 α). Kinaza PI3K IA w limfocytach jest aktywowana przez szerokie spektrum receptorów cytokinowych (np. receptor interleukiny 7 [IL-7R]) [6], receptory *Toll*-podobne (TLR, *Toll-like receptors*) [7], CD40 [8] czy BCR [9] (ryc. 1). O ile mechanizm aktywacji PI3K przez BCR jest dobrze poznany, o tyle mechanizmy aktywacji tej kinazy przez inne receptory błonowe na powierzchni komórki B nie są do końca wyjaśnione. Receptor B-komórkowy składa się z osadzonego w błonie przeciwciała połączonego niekowalencyjnie z dwoma białkami śródbłonowymi — Ig α i Ig β . W wyniku aktywacji BCR, domeny ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), wchodzące w skład łańcuchów polipeptydowych Ig α oraz Ig β , są fosforylowane przez kinazę tyrozynową z rodziny Src, Lyn [10]. Fosforylacja domen ITAM umożliwia rekrutację i aktywację kinazy Syk [11], która odpowiada za dalszą propagację sygnału wewnątrzkomórkowego poprzez fosforylację tyrozyn na białkach śródbłonowych BCAP (*B-cell adaptor for PI3K*) i CD19 [12].

Fosforylowane tyrozyny BCAP i CD19 wiążą podjednostkę regulatorową PI3K — p85 α [13, 14], która następnie rekrutuje do błony komórkowej podjednostkę katalityczną PI3K — p110 δ . Po związaniu z BCAP i CD19, PI3K uzyskuje dostęp do swojego substratu, 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂), fosfolipidu wchodzącego w skład błony komórkowej. Aktywna PI3K fosforyluje PIP₂, w wyniku czego powstaje (3,4,5)-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₃) — cząsteczka sygnałowa rekrutująca do błony szeroką grupę białek sygnałowych. Białka CD19 i BCAP są kluczowe dla aktywacji PI3K przez BCR, gdyż jednoczesna delecja obu tych białek powoduje zahamowanie aktywacji PI3K w odpowiedzi na agregację BCR po stymulacji antygenem lub przeciwciałami anti-IgG/IgM [15]. Ilość PIP₃ w błonie komórkowej jest regulowana przez dwie fosfatazy inozytoli: PTEN i SHIP1; PTEN hydrolizuje 3'-fosforan, natomiast SHIP1 — 5'-fosforan (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₃) [16]. Utrata funkcji PTEN wynikająca z delecji genu lub mutacji w jego obrębie prowadzi do nowotworzenia, co wskazuje na supresorowy charakter PTEN [17]. W kontekście nowotworów B-komórkowych ilość PIP₃ w błonie komórkowej podlega szczególnej kontroli, ponieważ dopiero jednoczesna delecja *Pten* i *Ship1* w komórkach B prowadzi do rozwoju agresywnych chłoniaków, odpowiadających na leczenie inhibitorami PI3K [18]. Zahamowanie aktywności tej ścieżki poprzez aktywację fosfatazy SHIP1 w niektórych nowotworach B-komórkowych znacząco zmniejsza ilość PIP₃ i prowadzi do zahamowania wzrostu tych nowotworów [19, 20].

Zwiększenie ilości PIP₃, wynikające z aktywności kinazy PI3K, prowadzi do rekrutacji i aktywacji wielu białek sygnałowych zawierających domenę PH (*pleckstrin homology*), odpowiedzialną za wiązanie błonowego PIP₃. Jednym z głównych efektorów PI3K jest kinaza AKT, inaczej zwana kinazą białkową B (PKB, *protein kinase B*), która odpowiada za fosforylację wielu różnych białek zaangażowanych w podstawowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, wzrost, migracja czy metabolizm. Po stymulacji receptorów błonowych i aktywacji PI3K zwiększone wytwarzanie PIP₃ powoduje rekrutację AKT do błony komórkowej i jej aktywację wskutek fosforylacji treoniny 308 i seryny 473, odpowiednio, przez kinazę 1 zależną od fosfatydyloinozytolu (PDK1) oraz kinazę mTORC2 [21, 22]. W pełni aktywna kinaza AKT fosforyluje i reguluje aktywność wielu białek odpowiedzialnych za funkcje biologiczne ścieżki sygnałowej PI3K-AKT. Jednym z głównych



Rycina 1. Aktywacja ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydylinozytolu (PI3K) i kinazy białkowej AKT w limfocytach B. Ta ścieżka sygnałowa w komórkach B jest aktywowana sygnałem pochodzącym z różnych receptorów na powierzchni komórki B, między innymi receptora IL-7 (IL-7R), receptora *Toll*-podobnego (TLR), CD40 i receptora B-komórkowego (BCR). Aktywność PI3K powoduje konwersję 4,5-bisfosforanu fosfatydylinozytolu (PIP₂) do (3,4,5)-trisfosforanu fosfatydylinozytolu (PIP₃) — cząsteczki sygnałowej pośredniczącej w rekrutacji oraz aktywacji wielu ważnych białek sygnałowych, między innymi kinazy AKT. W błonie komórkowej kinaza AKT ulega fosforylacji i aktywacji przez kinazę 1 zależną od fosfatydylinozytolu (PDK1) i mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*), a następnie translokacji do jądra komórkowego, gdzie reguluje aktywność różnorodnych białek zaangażowanych w podstawowe procesy komórkowe, takich jak: mTOR, kinaza syntazy glikogenowej 3 (GSK-3) oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny (FOXO); BCAP — *B-cell adaptor for PI3K*

Figure 1. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) pathway in B-cells. PI3K is activated by numerous B cell surface receptors such as receptor of IL-7 (IL-7R), CD40, Toll-like receptor (TLR or B-cell receptor (BCR)). PI3K catalyses phosphorylation of phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PIP₂) to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃), which mediates membrane recruitment of numerous signalling proteins. One of the most important PI3K effectors is AKT kinase. Upon membrane recruitment and phosphorylation by pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1) and mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2), active AKT translocates to the nucleus, where it phosphorylates many proteins implicated in cell growth, cell division and suppression of apoptosis such as mTOR, glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) or transcription factors FOXO (Forkhead box transcriptions factor, class O); BCAP — *B-cell adaptor for PI3K*

substratów AKT jest kinaza treoninowo-serynowa mTOR. Kinaza ta jest katalityczną podjednostką dwóch funkcjonalnie odrębnych kompleksów różniących się wrażliwością na rapamycynę (mTORC1 i mTORC2) [23]. Kinaza AKT pośrednio kontroluje funkcje wrażliwego na rapamycynę kompleksu mTORC1 poprzez fosforylację i inaktywację, hamującego jego aktywność, TSC1/2 [24]. Kompleks mTORC1 jest efektem AKT odpowiedzialnym za regulację syntezy białek poprzez fosforylację dwóch białek stymulujących translację, kinazy S6 oraz białka 4E-BP1. Kompleks mTORC1 stymuluje w ten sposób wzrost i proliferację

komórek [25]. Innym ważnym substratem kinazy AKT jest kinaza syntazy glikogenowej 3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase 3*). Enzym ten bierze udział w regulacji syntezy glikogenu i białek oraz wpływa na funkcje licznych czynników transkrypcyjnych, przez co jest zaangażowany we wzrost komórki, proliferację, migrację, apoptozę oraz metabolizm glukozy i odpowiedź immunologiczną.

Ponadto PI3K jest kluczowa dla aktywacji ścieżki sygnałowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), ponieważ w komórkach B z delecją genów kodujących białka BCAP i p85 α

nie wykazano wzrostu ekspresji genów antyapoptycznych indukowanych przez NF- κ B [26]. Kinaza AKT fosforyluje i aktywuje kinazę I κ B (IKK, *I κ B kinase*), co prowadzi do fosforylacji i degradacji inhibitora I κ B, translokacji NF- κ B do jądra komórkowego, a w rezultacie — do transkrypcji genów regulowanych przez ten czynnik [27–29]. Kinaza AKT w tym zakresie współdziała z kinazą tyrozynową Brutona (BTK, *Burton's tyrosine kinase*) i kinazą białkową C (PKC, *protein kinase C*).

Antyapoptotyczne działanie AKT wynika również z wpływu na regulację funkcji niektórych białek z rodziny BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*). Kinaza AKT fosforyluje serynę 136 proapoptotycznego białka BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*), przez co ułatwia wiązanie BAD z białkiem opiekuńczym 14-3-3, prowadzi do uwolnienia białek antyapoptotycznych związanych z BAD i sekwestracji BAD w cytoplazmie [30–32]. Kinaza AKT może również wpływać na ekspresję białek biorących udział w regulacji apoptozy poprzez regulację aktywności białek z rodziny FOXO (*Forkhead box transcription factor, class O*). Czynniki tej rodziny są jednymi z najistotniejszych efektorów ścieżki sygnałowej PI3K-AKT. Obejmują one grupę czterech pokrewnych białek (FOXO1, 3, 4, 6), spośród których w komórkach układu chłonnego najwyższej ekspresji ulegają FOXO1, FOXO3 i FOXO4 [33]. Czynniki te kontrolują ekspresję genów regulujących przebieg apoptozy, cykl komórkowy, naprawę DNA, odpowiedź na stres oksydacyjny oraz metabolizm glukozy. Aktywna kinaza AKT fosforyluje jądrowe czynniki transkrypcyjne FOXO, co prowadzi do ich interakcji z białkiem opiekuńczym 14-3-3, eksportu do cytoplazmy, a w konsekwencji — do zahamowania ich aktywności transkrypcyjnej [34]. Kinaza AKT blokuje w ten sposób odbywającą się z udziałem FOXO transkrypcję genów kodujących białka promujące apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego, w tym: inhibitory cyklu komórkowego p21^{WAF1} i p27^{KIP1} [35], białka p130 należącego do rodziny białek *retinoblastoma* [36], GADD45 α (*growth arrest and DNA-damage-inducible α*) [37], BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*) [38] i ligandu FAS [39]. Nadekspresja białka FOXO z mutacją uniemożliwiającą jego inaktywację przez AKT hamuje proliferację i indukuje apoptozę komórek B [40].

Powyższe informacje wskazują, że z jednej strony inaktywacja FOXO przez AKT jest kluczowa dla proliferacji komórek B w odpowiedzi na aktywację ścieżki PI3K-AKT. Z drugiej jednak strony, czynniki transkrypcyjne FOXO zwiększają odporność komórki na stres oksydacyjny poprzez

indukcję transkrypcji genów chroniących przed jego skutkami, takich jak manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD2, *manganase superoxide dismutase 2*) oraz katalaza [41, 42]. W ten sposób FOXO mogą sprzyjać przeżyciu komórek w warunkach stresu i kontrolować konsekwencje wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) w warunkach spoczynkowych. Mechanizm ten jest szczególnie istotny w krwiotwórczych komórkach macierzystych, ponieważ delecja FOXO u myszy prowadzi do wyczerpania rezerw, a następnie utraty tych komórek w wyniku wzrostu stężenia i aktywności ROS [43]. Zahamowanie AKT i równoczesny wzrost aktywności FOXO są również wymagane na różnych etapach rozwoju limfocytów, w których indukują ekspresję genów kluczowych dla prawidłowego różnicowania tych komórek.

Drugim, obok kinazy AKT, istotnym efekto-rem aktywności PI3K w limfocytach B jest BTK. Kinaza ta należy do rodziny kinaz Tec zawierających pojedynczą domenę PH na N-końcu. Interakcja BTK z PIP₃ w błonie komórkowej jest konieczna do późniejszej fosforylacji i aktywacji tej kinazy [44]. W odpowiedzi na aktywację BCR dochodzi do fosforylacji BTK na reszcie tyrozynowej 551 przez jedną z kinaz należących do rodziny Src, a następnie do autofosforylacji i uzyskania jej pełnej aktywności. Potem BTK fosforyluje i aktywuje fosfolipazę C γ 2, co skutkuje mobilizacją jonów wapnia i aktywacją PKC, aktywującej NF- κ B. Aktywność PI3K jest wymagana do pełnej aktywacji przekaźnictwa sygnałów zależnych od jonów wapnia w odpowiedzi na aktywację BCR, gdyż w limfocytach B z delecją genu kodującego podjednostkę katalityczną PI3K p110 δ napływ jonów wapnia do cytoplazmy jest znacznie ograniczony [4, 5].

Rozwój limfocytów B

Celem złożonego i wieloetapowego procesu rozwoju limfocytów B jest wytworzenie komórek zdolnych do produkcji przeciwciał charakteryzujących się wysokim powinowactwem do antygeny. Pierwszymi stadiami w rozwoju limfocytów B są wczesne limfoidalne komórki progenitorowe (ELP, *early lymphoid progenitors*) i wspólne limfoidalne komórki progenitorowe (CLP, *common lymphoid progenitors*) (ryc. 2), w których w szpiku kostnym rozpoczyna się proces rearanzacji genów immunoglobulinowych. Pierwszą zdeterminowaną w kierunku linii limfocytów B komórką jest limfocyt pro-B. Proces różnicowania w komórkę pro-B jest złożony i regulowany przez współpracujące ze sobą cytokiny, między innymi IL-7, i czynniki transkrypcyjne *Ikaros*,

E2A, Pax5 i EBF1 i inne [45–47]. W stadium komórki pro-B łańcuch ciężki immunoglobulin (IGH, *immunoglobulin heavy chain*) ulega rearanżacji w procesie rekombinacji V(D)J (*variable, diverse, joining*), w którym kluczową rolę odgrywają enzymy kodowane przez geny *Rag1* i *Rag2* (*recombination activating gene 1/2*). Jeżeli proces rekombinacji jest skuteczny i prowadzi do powstania funkcjonalnego IGH, to komórka rozpoczyna ekspresję prekursorowego receptora B-komórkowego (pre-BCR), zbudowanego ze zrekombinowanego łańcucha ciężkiego i zastępczego łańcucha lekkiego (SLC, *surrogate light chain*) oraz dwóch cząsteczek sygnałowych $Ig\alpha$ i $Ig\beta$ odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki.

Prawidłowo funkcjonujący receptor pre-BCR generuje sygnał, który jest warunkiem kontynuacji dalszego różnicowania tej linii. Skutkiem aktywności pre-BCR i sygnałów cytokinowych jest wyłączenie ekspresji jednego z dwóch alleli genu łańcucha ciężkiego i SLC oraz wznowienie ekspresji genów *Rag* [48]. Komórki posiadające funkcjonalny pre-BCR, zwane na tym etapie rozwoju dużymi komórkami pre-B (*large pre-B*), dzielą się kilkakrotnie, aby dać początek tak zwanym małym komórkom pre-B (*small pre-B*) (ryc. 2). W małych niedzielących się komórkach pre-B dochodzi do wznowienia ekspresji *Rag1/2* i rearanżacji genu łańcucha lekkiego immunoglobulin (IGL, *immunoglobulin light chain*). Jeżeli proces rearanżacji jest produktywny, to niedojrzałe komórki B rozpoczynają ekspresję funkcjonalnego BCR.

U myszy niedojrzałe komórki B, które nie wykazują autoreaktywności, tak zwane przejściowe limfocyty B (*transitional B cells*), opuszczają szpik kostny i migrują do otrzewnej (komórki B1) bądź krążą we krwi i zasiedlają obwodowe narządy chłonne (komórki B2) (ryc. 2). Wśród komórek B2 można wyróżnić dwie subpopulacje — migrujące limfocyty B grudki chłonnej (FO, *follicular B cells*) oraz limfocyty B strefy brzeżnej (MZ, *marginal zone B cells*), zasiedlające strefę brzeżną śledziony (ryc. 2). Jeśli FO rozpoznają antygen, to następuje pobudzenie BCR powodujące aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych prowadzących do proliferacji komórki i jej dalszego różnicowania. Proces ten zachodzi w obwodowych narządach chłonnych, w wyspecjalizowanych strukturach zwanych centrami germinalnymi (ryc. 2).

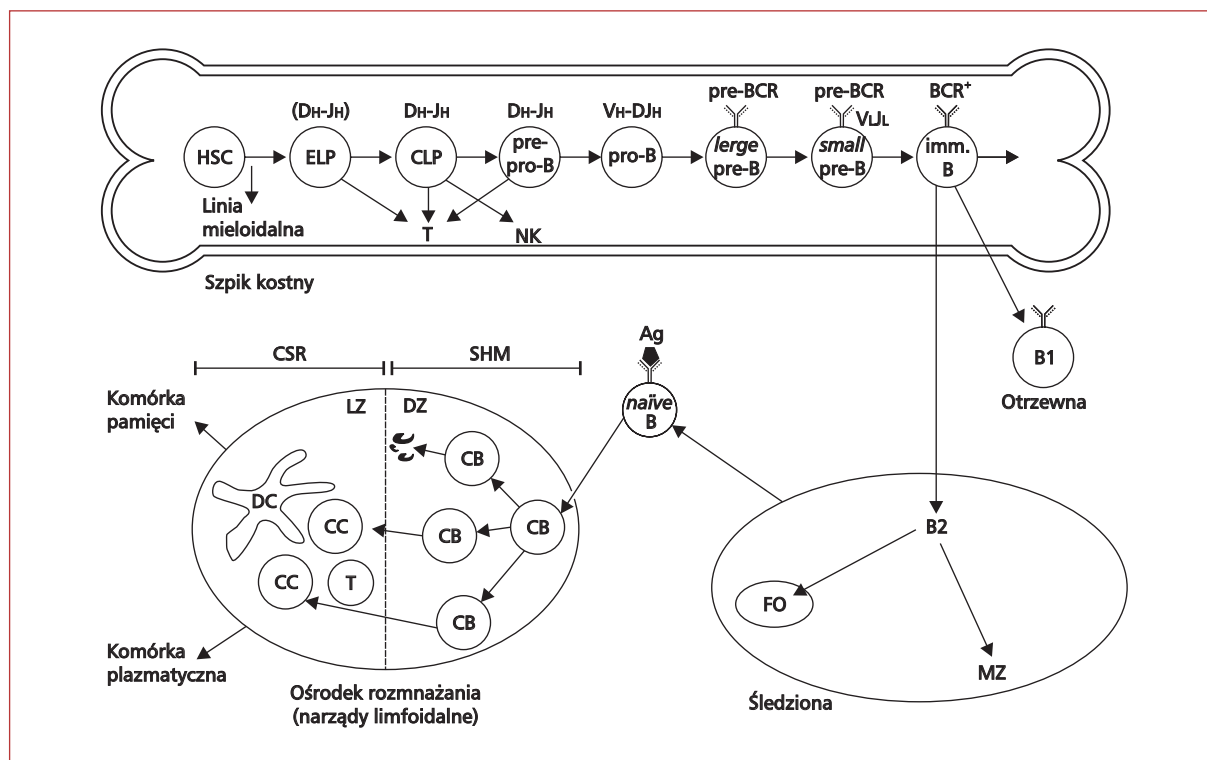
W strukturach tych zachodzą dwa procesy o kluczowym znaczeniu dla wytworzenia przeciwciał o wysokiej swoistości i różnych funkcjach efektorowych — hipermutacja somatyczna (SHM, *somatic hypermutation*) oraz rekombina-

cja prowadząca do przełączania klasy przeciwciał (CSR, *class switch recombination*) (ryc. 2). Zarówno SHM, jak i CSR wymagają aktywności enzymatycznej białka AID (*activation-induced deaminase*), którego ekspresja podlega czasowej regulacji podczas reakcji germinalnej. Wskutek wytworzenia receptora powierzchniowego o wysokim powinowactwie komórka B, uzyskująca kostymulację limfocyty T, ulega terminalnemu różnicowaniu do komórki plazmatycznej lub limfocyty B pamięci.

Rola ścieżki sygnałowej PI3K-AKT we wczesnym rozwoju limfocytów B

Wczesny rozwój limfocytów B wymaga współdziałania wielu czynników transkrypcyjnych i cytokin. Najistotniejszą cytokiną na tym etapie u zwierząt modelowych jest IL-7 i zależna od IL-7R aktywacja ścieżki sygnałowej Pi3k-Akt. U człowieka rola IL-7 wydaje się mniejsza lub przynajmniej kompensowana przez inny czynnik [49–51]. Zdefiniowaną funkcją IL-7 u ludzi jest wpływ tej cytokiny na zahamowanie przedwczesnej rearanżacji łańcucha lekkiego [52].

U zwierząt delecja podjednostki regulatorowej $p85\alpha$ prowadzi do bloku różnicowania limfocytów na etapie pro-B/pre-B, natomiast delecja podjednostki katalitycznej $p110\delta$ lub jej inaktywujące mutacje powodują częściowy blok różnicowania na tym etapie [5, 53]. Niecałkowity blok w przypadku delekcji podjednostek Pi3k wynika najprawdopodobniej z mechanizmów kompensacyjnych będących skutkiem obecności pozostałych jednostek tego enzymu. Aktywacja Pi3k na etapie pro-B wynika głównie z aktywności IL-7-IL-7R, gdyż delecja IL-7R powoduje podobny fenotyp — zatrzymanie rozwoju komórek B w stadium komórki pro-B [54, 55]. Kolejnym ogniwem sygnału Pi3k jest Akt, gdyż wyłączenie aktywności izoform 1 i 2 tej kinazy w komórkach hematopoetycznych również powoduje częściowy blok pro-B/pre-B [56]. Efektorem tej osi warunkującym różnicowanie na etapie komórki pro-B jest *Foxo1*. Delecja *Foxo1* indukowana na wczesnych etapach rozwoju komórek B powoduje zahamowanie różnicowania [57]. Ponieważ *Foxo1* reguluje ekspresję IL-7R, to zatrzymanie rozwoju mysich limfocytów B z delecją *Foxo1* na etapie komórek pro-B jest najprawdopodobniej wynikiem obniżonej ekspresji IL-7R, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia proliferacji i wzrostu liczby komórek apoptotycznych. Ścieżka sygnałowa zależna od IL-7R, Pi3k, Akt i *Foxo1* stanowi zatem układ sprzężenia zwrotnego, w którym ekspresja IL-7R zależy od aktywności czynnika



Rycina 2. Rozwój i różnicowanie limfocytów B zdeterminowane przy użyciu modelu mysiego. Wczesny rozwój komórek w szpiku kostnym przebiega niezależnie od antygeny. Wraz z postępowaniem tego procesu zmniejsza się potencjał komórek do samoodnowy i następuje utrata zdolności różnicowania się do innych typów komórek krwi. Począwszy od stadium naiwnej dojrzałej komórki B, jej dalszy los zależy od kontaktu z antygenem. Wynikiem tego procesu jest końcowe różnicowanie się komórek B w komórki pamięci lub komórki plazmatyczne wytwarzające przeciwciała o wysokim powinowactwie. Szczegóły dotyczące ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) i kinazy białkowej AKT (AKT) w tym procesie omówiono w tekście; HSC — krwiotwórcza komórka macierzysta; ELP — wczesna limfoidalna komórka progenitorowa; CLP — wspólna limfoidalna komórka progenitorowa; T — limfocyt T; NK — komórka naturalnej cytotoksyczności; D_H — region D genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin; J_H — region J genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin; V_H — region V genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin; V_L — region V genu łańcucha lekkiego immunoglobulin; J_L — region J genu łańcucha lekkiego immunoglobulin; BCR — receptor B-komórkowy; pre-BCR — prekursorowy receptor B-komórkowy; *large* pre-B — duża dzieląca się komórka pre-B; *small* pre-B — mała niedzieląca się komórka pre-B; imm. B — niedojrzały limfocyt B; B1 — subpopulacja komórek B otrzewnej; B2 — subpopulacja komórek B obwodowych narządów chłonnych; FO — migrujące limfocyty B grudki chłonnej; MZ — limfocyty B strefy brzeżnej; Ag — antygen; *naive* B — naiwny limfocyt B; DZ — strefa „ciemna” ośrodka rozmnażania; LZ — strefa „jasna” ośrodka rozmnażania; CB — centroblasty; CC — centrocyty; DC — komórka dendryczna; SHM — hipermutacja somatyczna; CSR — rekombinacja przełączania klas

Figure 2. Outline of B-cell developmental stages determined using the mouse model. The early B cell development occurs in the bone marrow through antigen-independent differentiation stages. Subsequent stages are characterized by decreased self-renewal potential and reduced capability of giving rise to other types of blood cells. Beginning with the naive B-cell stage, its further fate depends on antigen encounter. The outcome of this process is generation of the high-affinity antibody producing plasma cells or memory B cells. See text for details; HSC — hematopoietic stem cell; ELP — early lymphoid progenitor; CLP — common lymphoid progenitor; T — T lymphocyte; NK — natural killer cell; D_H — diversity segment of the immunoglobulin heavy chain; J_H — joining segment of the immunoglobulin heavy chain; V_H — variable segment of the immunoglobulin heavy chain; V_L — variable segment of the immunoglobulin light chain; J_L — joining segment of the immunoglobulin light chain; BCR — B-cell receptor; pre-BCR — precursor B-cell receptor; *large* pre-B — proliferating pre-B cell; *small* pre-B — non-proliferating pre-B cell; imm. B — immature B lymphocyte; B1 — subpopulation of B cells residing in peritoneum; B2 — subpopulation of B cells residing in lymphoid organs, such as spleen; FO — follicular B cells; MZ — marginal zone B cells; Ag — antigen; *naive* B — naive B cell; DZ — germinal centre “dark” zone; LZ — germinal centre “light” zone; CB — centroblasts; CC — centrocytes; DC — dendritic cell; SHM — somatic hypermutation; CSR — class switch recombination

Foxo1. Drugi defekt w komórkach pro-B myszy z delecją *Foxo1* dotyczy obniżenia transkrypcji genów *Rag1* i *Rag2*. Foxo1 bezpośrednio oddziałuje z sekwencją wzmacniającą (enhancerem) Erag aktywującym transkrypcję *Rag1/2* i umożliwiającym rekombinację V(D)J [58, 59].

Obserwacje te wskazują, że zarówno pełna inaktywacja Foxo1, jak i jego nadaktywność powodują zaburzenia w ekspresji genów wymaganych do prawidłowego przebiegu różnicowania komórek pro-B. Inkubacja komórek pro-B z IL-7 wywołuje aktywację ścieżki Pi3k-Akt [60, 61], a inhibicja kinazy Pi3k lub Akt *in vitro* podwyższa ekspresję genów *Rag* [62], co sugeruje, że ścieżka ta hamuje aktywność transkrypcyjną Foxo1 i ekspresję zależnych od niego genów. Podobny efekt wywołuje delecja genu *Sin1*, kodującego białko wchodzące w skład kompleksu mTORC2, który odpowiada za fosforylację i aktywację kinazy Akt. Delecja tego genu prowadzi do utraty zdolności Akt do blokowania aktywności transkrypcyjnej Foxo1. Myszy z delecją *Sin1* wykazują podwyższoną ekspresję zależnych od Foxo1 genów *IL-7R* i *Rag1/2*, promującą dłuższe przeżycie komórek pro-B [63]. Jednocześnie delecja *Foxo1* całkowicie znosi ekspresję *Rag1/2* [64]. Reasumując, prawidłowy przebieg wczesnych etapów różnicowania komórek B wymaga ścisłej regulacji aktywności osi Pi3k-Akt-Foxo, a zaburzenie tej kontroli, zarówno przez hiperaktywację osi, jak i wyłączenie jej efektorów, prowadzi do zaburzeń w różnicowaniu limfocytów.

Komórki B posiadające funkcjonalny pre-BCR wchodzą w kolejne etapy rozwoju [65]. W odpowiedzi na sygnał z IL-7R, a prawdopodobnie również pre-BCR, w proliferujących dużych komórkach pre-B wzrasta aktywność Pi3k-Akt, co z kolei prowadzi do zahamowania aktywności Foxo1, obniżenia ekspresji *Rag1/2* i *IL-7R* i sprzyja postępowi cyklu komórkowego [66]. Wyciszenie sygnału z IL-7R następujące w małych komórkach pre-B obniża aktywność Pi3k-Akt i w rezultacie wywołuje wzrost ekspresji i aktywności czynników transkrypcyjnych Foxo1 i Pax5 aktywujących wiele genów kluczowych dla dalszego rozwoju komórki pre-B, takich jak *Rag1/2* czy *Blnk* [66]. Reekspresja genów *Rag1/2* umożliwia komórce rekombinację Igl, natomiast białko adaptorowe Blnk uczestniczy w przekazywaniu sygnału z receptora pre-BCR przez kinazę Syk do wnętrza komórki; oba te mechanizmy promują rearanżację i ekspresję Igl. Delecja *Foxo1* w komórkach pro-B skutkuje obniżeniem ekspresji obu genów *Rag* i wstrzymaniem rozwoju limfocytów B w stadium pre-B, podkreślając decydującą rolę Foxo1 w regulacji

ekspresji genów *Rag*, również w komórkach pre-B [57]. Podsumowując, ścieżka Pi3k-Akt promuje proliferację dużych komórek pre-B i jednocześnie wpływa na proces rekombinacji łańcuchów lekkich zależny od Foxo1 [67]. Jeżeli rekombinacja łańcucha lekkiego jest produktywna, to komórka pre-B kontynuuje swój rozwój jako niedojrzały limfocyt B, wykazujący ekspresję BCR klasy IgM/IgD na błonie komórkowej. Konstytutywny, toniczny i niezależny od antygeny sygnał z BCR jest niezbędny, by limfocyt mógł kontynuować różnicowanie, wyjść ze stadium komórki pre-B i wyciszyć ekspresję genów *Rag* [68]. Genetyczna delecja SYK powoduje, że toniczny sygnał nowo powstałego BCR nie jest w stanie aktywować PI3K i wyłączyć ekspresji *Rag1* i *Rag2*, a komórki z takim defektem wykazują ciągłą aktywność procesu rekombinacji genu łańcucha lekkiego [69].

Aktywność PI3K odgrywa również rolę w procesie negatywnej selekcji i klonalnej delecji nowo powstałych, autoreaktywnych, niedojrzałych komórek B [70, 71]. Autoreaktywne BCR zostają internalizowane, w wyniku czego nie są w stanie aktywować Pi3k, co w konsekwencji prowadzi do kontynuacji procesu rekombinacji łańcucha lekkiego. Podwyższona ekspresja PTEN i obniżony sygnał z CD19 dodatkowo hamują aktywność ścieżki Pi3k-Akt. Przedłużający się stan obniżonej aktywności osi Pi3k-Akt może powodować ekspresję proapoptotycznych genów zależnych od Foxo1 i sprawiać, że autoreaktywne komórki B są bardziej podatne na apoptozę. Wprowadzenie konstytutywnie aktywnej formy kinazy Akt do niedojrzałych komórek B prowadzi natomiast do wyłączenia tego mechanizmu kontrolnego, nieprawidłowości w procesie negatywnej selekcji i pozwala autoreaktywnym komórkom B na opuszczenie szpiku kostnego [70, 71].

Rola osi PI3K-AKT w homeostazie obwodowych limfocytów B

Aktywność ścieżki Pi3k-Akt, zależna od BCR, odgrywa również ważną rolę w różnicowaniu i przeżyciu obwodowych komórek B. Kluczowym sygnałem antyapoptotycznym dla naiwnych obwodowych limfocytów B jest toniczny, niezależny od antygeny, sygnał z BCR [72–75]. Indukowalna delecja BCR u myszy powoduje śmierć obwodowych limfocytów B, co wskazuje, że ekspresja BCR jest niezbędna do przeżycia tych komórek [73]. Sygnał ten zależy od zdolności BCR do inicjacji transdukcji sygnału przez Iga i aktywacji szlaku Pi3k-Akt. Utrata domeny ITAM w Iga, a tym samym — za-

hamowanie rekrutacji kinaz do $Ig\alpha$, spowodowały utratę dojrzałych komórek B [76], natomiast delecja fosfatazy PTEN lub wprowadzenie konstytutywnie aktywnej PI3K δ do komórek z ekspresją $Ig\alpha$ pozbawionej domen ITAM spowodowało ocalenie obwodowych, spoczynkowych limfocytów B pozbawionych sygnału BCR [77]. Efektorem osi, również w tym przypadku, jest Foxo1, ponieważ delecja jego genu miała podobny wpływ na przeżycie komórek pozbawionych sygnału BCR. Delecja *Foxo1* w obwodowych limfocytach B prowadzi również do zmniejszenia ich liczby w węzłach chłonnych z powodu obniżenia ekspresji L-selektyny — białka odgrywającego kluczową rolę w zasiedlaniu obwodowych narządów chłonnych przez limfocyty B [57]. Delecja *Foxo1* wpływa również na rozkład subpopulacji komórek B, powodując wzrost liczby komórek MZ w obwodowych narządach chłonnych [57, 78]. Podobnie indukowalna delecja PTEN u myszy wywołuje wzrost liczby komórek MZ z jednoczesnym zmniejszeniem się populacji komórek FO w śledzionie [79]. Przeciwny fenotyp, charakteryzujący się obniżoną liczbą komórek MZ, obserwuje się w przypadku delekcji Pi3k lub inaktywacji Akt1/2 [4, 80–82]. Również u myszy z delecją CD19 obserwuje się zmniejszenie liczby komórek MZ [81]. Reasumując, badania te wskazują że zarówno funkcjonowanie dojrzałych komórek B, jak i rozkład komórek B między specyficzne subpopulacje są w znacznym stopniu kontrolowane przez aktywność osi Pi3k-Akt-Foxo.

Rola ścieżki PI3K-AKT w końcowym różnicowaniu się limfocytów B

Podczas odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T aktywowane limfocyty B podlegają reakcji germinalnej, w czasie której proliferują i prowadzą edycję genów immunoglobulinowych wywołującą dojrzewanie powinowactwa przeciwciał i zmiany ich funkcji efektorowych. Część przeciwciał po immunizacji antygenem T-zależnym jest wydzielana, zanim jeszcze dojdzie do zakończenia reakcji germinalnej. Ich źródłem są plazmablasty pozagrudkowe (*extrafollicular plasmablasts*) i krótko żyjące komórki produkujące przeciwciała (ASC, *antibody-secreting cell*), a więc komórki, które nie weszły w reakcję germinalną [82, 83]. Decyzja o kierunku rozwoju komórki B po immunizacji w stronę rozpoczęcia reakcji germinalnej lub wytwarzania przeciwciał zależy od poziomu aktywności Pi3k. Podwyższenie aktywności Pi3k-Akt poprzez delecję *Pten* potęguje różnicowanie się komórek B w kierunku ASC, hamuje CSR oraz re-

akcję germinalną [79, 84]. U podstaw tego mechanizmu leżą fosforylacja i inaktywacja Foxo1 przez Akt, prowadząca do zahamowania ekspresji genu kodującego deaminazę Aid, kluczową dla CSR. Wprowadzenie do mysich komórek B z delecją *Pten* konstytutywnie aktywnego Foxo1 przywraca ekspresję Aid i aktywuje CSR. Badania te wskazują, że los aktywowanych przez antygen komórek zależy od poziomu aktywności Pi3k-Akt. Pozostaje niejasne, jak jest definiowany próg aktywności Pi3k-Akt-Foxo, który determinuje taki lub inny los komórki. Co więcej, całkowite wyłączenie aktywności Pi3k poprzez delecję p110 δ lub CD19 powoduje zupełny brak grudek chłonnych po immunizacji [4, 5]. Zahamowanie ścieżki sygnałowej Pi3k-Akt może również ograniczać reakcję germinalną poprzez negatywne oddziaływanie na różnicowanie się i funkcję pomocniczych grudekowych limfocytów T (Tfh, *T follicular helper*) [85]. Delecja *Foxo1* w komórkach T wzmacnia różnicowanie się komórek Tfh i reakcję germinalną, co sugeruje, że aktywacja Pi3k-Akt i będąca jej następstwem inaktywacja Foxo promują rozwój komórek Tfh [86]. Aktywność Pi3k-Akt ma zatem odmienne skutki w komórkach B i T w kontekście reakcji ośrodka rozmnażania. W limfocytach T utrata aktywności Foxo wzmacnia reakcję germinalną, natomiast w limfocytach B wywołuje zahamowanie tej reakcji.

Wnioski i perspektywy

Ścieżka sygnałowa PI3K-AKT-FOXO odgrywa kluczową rolę w rozwoju i różnicowaniu limfocytów B. Reguluje ona zdolność komórek do proliferacji, rekombinacji genów immunoglobulinowych, dojrzewania, sprawność metaboliczną limfocytów i ich próg apoptotyczny. Jednym z głównych efektorów tej ścieżki są czynniki transkrypcyjne rodziny FOXO.

Mimo poznania sposobu regulacji aktywności osi PI3K-AKT-FOXO i wpływu jej zaburzeń na rozwój limfocytów B, wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Na przykład nie jest jasne, dlaczego różne receptory aktywujące oś wywierają odmienne skutki metaboliczne. Wątpliwości budzi również sposób, w jaki komórka definiuje wymagany poziom aktywności FOXO, ponieważ zarówno zwiększenie aktywności PI3K, jak i całkowita blokada tego szlaku powoduje zaburzenia różnicowania i/lub ma charakter onkogenny. Chociaż niska aktywność AKT i jądrowa lokalizacja czynników transkrypcyjnych FOXO indukuje ekspresję genów proapoptotycznych, to jest ona istotna na różnych etapach różnicowania komórek B i odpowiada za

indukcję ekspresji wielu genów niezbędnych do rozwoju limfocytów, nie powodując zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Mechanizmy wpływające na ostateczny skutek aktywności czynników FOXO nie są dobrze scharakteryzowane i mogą wynikać z innych modyfikacji potranslacyjnych FOXO i współistniejących sygnałów. Szerokie spektrum procesów komórkowych regulowanych przez oś PI3K-AKT-FOXO powoduje, że wiele nowotworów, w tym B-komórkowych, wykazuje konstytutywną aktywność tej osi, a indukowalna delecja *Foxo* prowadzi do rozwoju chłoniaków, co wskazuje na supresorową rolę tego czynnika transkrypcyjnego.

W następnej części tej pracy zostaną przedstawione mechanizmy oraz konsekwencje deregulacji aktywności osi PI3K-AKT-FOXO w nowotworach B-komórkowych u ludzi oraz potencjalne strategie terapeutyczne celujące w tę ścieżkę sygnałową.

Piśmiennictwo

- Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Ahmadi K. i wsp. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Ann. Rev. Biochem.* 2001; 70: 535–602.
- Swat W., Montgrain V., Doggett T.A. i wsp. Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. *Blood* 2006; 107: 2415–2422.
- Webb L.M., Vigorito E., Wymann M.P., Hirsch E., Turner M. Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110 gamma and p110 delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 2005; 175: 2783–2787.
- Okkenhaug K., Bilancio A., Farjot G. i wsp. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002; 297: 1031–1034.
- Clayton E., Bardi G., Bell S.E. i wsp. A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 753–763.
- Venkitaraman A.R., Cowling R.J. Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 2168–2174.
- Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N., Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 2011; 90: 417–427.
- Aagaard-Tillery K.M., Jelinek D.F. Phosphatidylinositol 3-kinase activation in normal human B lymphocytes. *J. Immunol.* 1996; 156: 4543–4554.
- Gold M.R., Chan V.W., Turck C.W., DeFranco A.L. Membrane Ig cross-linking regulates phosphatidylinositol 3-kinase in B lymphocytes. *J. Immunol.* 1992; 148: 2012–2022.
- Reth M., Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 453–479.
- Kurosaki T., Johnson S.A., Pao L. i wsp. Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1815–1823.
- Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 317–330.
- Okada T., Maeda A., Iwamatsu A., Gotoh K., Kurosaki T. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* 2000; 13: 817–827.
- Carter R.H., Wang Y., Brooks S. Role of CD19 signal transduction in B cell biology. *Immunol. Res.* 2002; 26: 45–54.
- Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T., Tedder T.F., Kurosaki T. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 2008; 111: 1497–1503.
- Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11: 329–341.
- Ali I.U., Schriml L.M., Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 1922–1932.
- Miletic A.V., Anzelon-Mills A.N., Mills D.M. i wsp. Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 2407–2420.
- Ong C.J., Ming-Lum A., Nodwell M. i wsp. Small-molecule agonists of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood* 2007; 110: 1942–1949.
- Kennah M., Yau T.Y., Nodwell M. i wsp. Activation of SHIP via a small molecule agonist kills multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* 2009; 37: 1274–1283.
- Chan T.O., Rittenhouse S.E., Tsichlis P.N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 1999; 68: 965–1014.
- Bellacosa A., Chan T.O., Ahmed N.N. i wsp. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998; 17: 313–325.
- Guertin D.A., Sabatini D.M. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci. Signal.* 2009; 2: pe24.
- Potter C.J., Pedraza L.G., Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: 658–665.
- Harris T.E., Lawrence J.C. Jr. TOR signaling. *Sci. STKE* 2003; 2003: re15.
- Andjelic S., Hsia C., Suzuki H. i wsp. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *J. Immunol.* 2000; 165: 3860–3867.
- Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A. i wsp. NF-kappa B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82–85.
- Romashkova J.A., Makarov S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401: 86–90.
- Kane L.P., Shapiro V.S., Stokoe D., Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 1999; 9: 601–604.
- Datta S.R., Dudek H., Tao X. i wsp. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 17: 231–241.
- Datta S.R., Katsov A., Hu L. i wsp. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell.* 2000; 6: 41–51.
- del Peso L., González-García M., Page C., Herrera R., Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687–689.
- Dejean A.S., Hedrick S.M., Kerdiles Y.M. Highly specialized role of Forkhead box O transcription factors in the immune system. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 14: 663–674.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J. i wsp. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857–868.
- Dijkers P.F., Medema R.H., Pals C. i wsp. Forkhead transcription factor FKHR- L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 9138–9148.

36. Yusuf I., Zhu X., Kharas M.G., Chen J., Fruman D.A. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood* 2004; 104: 784–787.
37. Tran H., Brunet A., Grenier J.M. i wsp. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002; 296: 530–534.
38. Dijkers P.F., Medema R.H., Lammers J.W., Koenderman L., Coffier P.J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the Forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 2000; 10: 1201–1204.
39. Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J. i wsp. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857–868.
40. Yusuf I., Zhu X., Kharas M.G., Chen J., Fruman D.A. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood* 2004; 104: 784–787.
41. Nemoto S., Finkel T. Redox regulation of Forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 2002; 295: 2450–2452.
42. Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E. i wsp. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002; 419: 316–321.
43. Tothova Z., Kollipara R., Huntly B.J. i wsp. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128: 325–339.
44. Vihinen M., Kwan S.P., Lester T. i wsp. Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mutat.* 1999; 13: 280–285.
45. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 107–116.
46. Martinez-Climent J.A., Fontan L., Gascoyne R.D., Siebert R., Prosper F. Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence? *Haematologica* 2010; 95: 293–302.
47. Santos P.M., Borghesi L. Molecular resolution of the B cell landscape. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23: 163–170.
48. Daly J., Licence S., Nanou A., Morgan G., Martensson I.L. Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 2007; 26: 4273–4282.
49. Noguchi M., Yi H., Rosenblatt H.M. i wsp. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; 73: 147–157.
50. Schmalstieg F.C., Leonard W.J., Noguchi M. i wsp. Missense mutation in exon 7 of the common gamma chain gene causes a moderate form of X-linked combined immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1169–1173.
51. Leonard W.J., Noguchi M., Russell S.M., McBride O.W. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c. *Immunol. Rev.* 1994; 138: 61–86.
52. Nodland S.E., Berkowska M.A., Bajer A.A. i wsp. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood* 2011; 118: 2116–2127.
53. Fruman D.A., Snapper S.B., Yballe C.M. i wsp. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 1999; 283: 393–397.
54. Peschon J.J., Morrissey P.J., Grabstein K.H. i wsp. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1955–1960.
55. von Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian L.A. i wsp. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1519–1526.
56. Calamito M., Juntilla M.M., Thomas M. i wsp. Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood* 2010; 115: 4043–4050.
57. Dengler H.S., Baracho G.V., Omori S.A. i wsp. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 1388–1398.
58. Amin R.H., Schlissel M.S. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 613–622.
59. Chen Z., Xiao Y., Zhang J. i wsp. Transcription factors E2A, FOXO1 and FOXP1 regulate recombination activating gene expression in cancer cells. *PLoS One* 2011; 6: e20475.
60. Venkitaraman A.R., Cowling R.J. Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 2168–2174.
61. Corcoran A.E., Smart F.M., Cowling R.J. i wsp. The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *EMBO J.* 1996; 8: 1924–1932.
62. Verkoczy L., Duong B., Skog P. i wsp. Basal B cell receptor-directed phosphatidylinositol 3-kinase signaling turns off RAGS and promotes B cell-positive selection. *J. Immunol.* 2007; 15: 6332–6341.
63. Lazorchak A.S., Liu D., Facchinetti V. i wsp. Sin1-mTORC2 suppresses rag and IL-7r gene expression through Akt2 in B cells. *Mol. Cell.* 2010; 13: 433–443.
64. Amin R.H., Schlissel M.S. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 613–622.
65. Rolink A.G., Winkler T., Melchers F., Andersson J. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 23–32.
66. Ochiai K., Maienschein-Cline M., Mandal M. i wsp. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 300–307.
67. Herzog S., Reth M., Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 195–205.
68. Tze L.E., Schram B.R., Lam K.P. i wsp. Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol.* 2005; 3: e82.
69. Meade J., Tybulewicz V.L., Turner M. The tyrosine kinase Syk is required for light chain isotype exclusion but dispensable for the negative selection of B cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 1102–1110.
70. Cheng S., Hsia C.Y., Feng B. i wsp. BCR-mediated apoptosis associated with negative selection of immature B cells is selectively dependent on PTEN. *Cell. Res.* 2009; 19: 196–207.
71. Browne C.D., Del Nagro C.J., Cato M.H., Dengler H.S., Rickert R.C. Suppression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production is a key determinant of B cell anergy. *Immunity* 2009; 31: 749–760.
72. Monroe J.G. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 283–294.
73. Lam K.P., Kuhn R., Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997; 90: 1073–1083.
74. Kraus M., Alimzhanov M.B., Rajewsky N., Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igamma/beta heterodimer. *Cell* 2004; 117: 787–800.
75. Smith S.H., Reth M. Perspectives on the nature of BCR-mediated survival signals. *Mol. Cell.* 2004; 14: 696–697.

76. Torres R.M., Flaswinkel H., Reth M., Rajewsky K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 1996; 272: 1804–1808.
77. Srinivasan L., Sasaki Y., Calado D.P. i wsp. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 2009; 139: 573–586.
78. Chen J., Limon J.J., Blanc C., Peng S.L., Fruman D.A. Foxo1 regulates marginal zone B-cell development. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 1890–1896.
79. Suzuki A., Kaisho T., Ohishi M. i wsp. Critical roles of PTEN in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 657–667.
80. Suzuki H., Matsuda S., Terauchi Y. i wsp. PI3K and BTK differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 280–286.
81. Donahue A.C., Hess K.L., Ng K.L., Fruman D.A. Altered splenic B cell subset development in mice lacking phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Int. Immunol.* 2004; 16: 1789–1798.
82. Pape K.A., Kouskoff V., Nemazee D. i wsp. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 1677–1687.
83. Peakman M.C., Maizels N. Localization of splenic B cells activated for switch recombination by in situ hybridization with Iggamma1 switch transcript and Rad51 probes. *J. Immunol.* 1998; 161: 4008–4015.
84. Omori S.A., Cato M.H., Anzelon-Mills A. i wsp. Regulation of class-switch recombination and plasma cell differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Immunity* 2006; 25: 545–557.
85. Rolf J., Bell S.E., Kovessi D. i wsp. Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J. Immunol.* 2010; 185: 4042–4052.
86. Kerdiles Y.M., Stone E.L., Beisner D.R. i wsp. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 2010; 33: 890–904.