

Molekularne mechanizmy działania i patogenetyczna rola deregulacji BCL6 w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B — implikacje kliniczne i terapeutyczne

Molecular mechanisms and pathogenetic role of BCL6 deregulation in diffuse large B-cell lymphomas — clinical and therapeutic implications

Weronika Prusisz, Tomasz Sewastianik, Przemysław Juszczynski

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

Streszczenie

Deregulacja onkogenu BCL6 jest najczęstszym zaburzeniem molekularnym w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL) u dorosłych. Gen BCL6 po raz pierwszy sklonowano z translokacji chromosomalnych dotyczących 3q27. Gen ten koduje białko należące do rodziny represorów transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością domeny BTB/POZ oraz palców cynkowych. Dimeryzacja BCL6 powoduje rekrutację korepresorów, które odpowiadają za zróżnicowane biologiczne funkcje tego białka. Ekspresja BCL6 w limfocytach B jest niezbędna do rozpoczęcia reakcji germinalnej, w trakcie której komórki B intensywnie proliferują i wskutek procesów edycji sekwencji genów immunoglobulinowych zwiększają powinowactwo przeciwciał do antygeny. W obrębie centrum germinalnego BCL6 kontroluje ekspresję genów, których represja zwiększa tolerancję na fizjologiczne uszkodzenia DNA wynikające ze specyfiki reakcji germinalnej, reguluje progresję cyklu komórkowego, aktywację limfocytów oraz ich różnicowanie. Wyciszenie ekspresji BCL6 jest wymagane do zakończenia reakcji germinalnej i dalszego różnicowania limfocytów w komórki pamięci lub plazmocyty. Konstytutywna ekspresja BCL6 wskutek zaburzeń strukturalnych lub mechanizmów czynnościowych uniemożliwia różnicowanie limfocytów, sprzyja akumulacji dodatkowych zaburzeń genetycznych i indukuje powstanie DLBCL. Z tego względu inhibicja aktywności BCL6 może stanowić racjonalny cel terapeutyczny w chłoniakach z deregulacją tego onkogenu i czynnościowo zależnych od jego ekspresji. Poznanie molekularnych zależności między strukturą i funkcją białka BCL6 pozwoliło na podjęcie prób projektowania molekuł, które mogłyby specyficznym rozrywać interakcje BCL6 z określonymi zestawami korepresorów i swoiście blokować jego określone funkcje. Niniejszy artykuł stanowi przegląd doniesień dotyczących roli BCL6 w genezie DLBCL oraz obecnego stanu zaawansowania badań dotyczących celowanych inhibitorów BCL6.

Słowa kluczowe: chłoniaki B-komórkowe, BCL6, terapia celowana

Hematologia 2012; 3, 4: 302–312

Adres do korespondencji: Przemysław Juszczynski, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 64 77, faks: 22 34 96 237, e-mail: puszczynski@ihit.waw.pl

Abstract

BCL6 is the most frequently deregulated oncogene in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), the most common lymphoma in adults. BCL6 gene was first cloned from recurring chromosomal translocations involving 3q27. BCL6 encodes a member of the BTB/POZ zinc finger family of transcriptional repressors. Upon dimerization, BCL6 recruits distinct sets of corepressors that mediate its biological activity. BCL6 expression in B-cells is required for formation of germinal centers (GC). Within the GC, BCL6 controls the expression of multiple genes that increase the tolerance to the physiological DNA breaks required for immunoglobulin affinity maturation, regulate cell cycle progression, B-cell activation and differentiation. Downregulation of BCL6 is required for B-cells to undergo further differentiation to memory cells or plasma cells. Constitutive expression of BCL6 due to structural or functional abnormalities in humans and mice inhibits B-cell differentiation and fosters acquisition of additional lesions, leading to DLBCL. For these reasons, BCL6 represents a rational therapeutic target in DLBCL with deregulated expression of this oncogene and reliant on its continuous activity. Dissection of molecular structure-function relationships of the BCL6 protein allowed to design molecules specifically targeting this transcription factor and blocking its function. Herein, we review recent advances in understanding the role of BCL6 in lymphomagenesis and approaches to its therapeutic targeting.

Key words: B-cell lymphoma, BCL6, targeted therapy

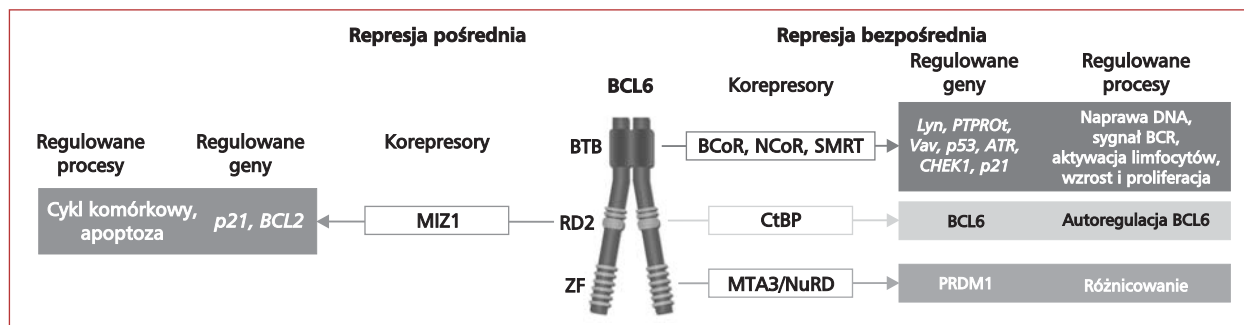
Hematologia 2012; 3, 4: 302–312

BCL6 — gen, białko i molekularne podstawy działania

Gen *BCL6* (*B-cell lymphoma 6*) jest najczęściej deregulowanym onkogenem w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B cell lymphoma*) [1]. Strukturalne nieprawidłowości tego onkogenu występują również w innych nowotworach B-komórkowych wywodzących się z centrów germinalnych (GC, *germinal center*), w tym chłoniaku grudkowym i przewlekłej białaczce limfocytowej [1, 2]. Gen *BCL6* po raz pierwszy sklonowano z translokacji chromosomalnych t(3;14)(q27;q32) oraz t(3;22)(q27;q11) [3, 4]. Ma on wielkość około 23 kb i składa się z 11 eksonów. Białko będące produktem tego genu to jądrowa fosfoproteina o masie 95 kDa, należąca do rodziny białek współdzielących domenę BTB/POZ (*bric-a-brac, tramtrack, broad complex/pox virus zinc finger*) [5]. Białko BCL6 pełni funkcję represora transkrypcyjnego, hamującego ekspresję genów zawierających jego sekwencję *consensus* w obrębie regionów regulatorowych. To składające się z 707 aminokwasów białko można strukturalnie i funkcjonalnie podzielić na trzy regiony: N-końcową domenę BTB, część centralną oraz C-końcową domenę zawierającą palce cynkowe [6]. Podstawową funkcją tej trzeciej domeny jest wiązanie specyficznych sekwencji DNA w promotorach genów regulowanych przez BCL6. Domena ta zawie-

ra zestaw sześciu palców cynkowych typu C2-H2, oddzielonych od siebie konserwowanymi łańcuchami siedmiu aminokwasów. Dwie reszty cysteiny i dwie reszty histydyny koordynują jon cynku i odpowiadają za zwijanie domeny w palcowatą strukturę zdolną do oddziaływania z łańcuchami DNA [7]. Środkowa część białka stanowi w większości nieustrukturyzowany i elastyczny region, łączący domenę BTB z domeną palców cynkowych. Region ten zawiera dodatkowo wiele motywów funkcjonalnych, w tym domenę RD2 (*repression domain 2*), wymaganą do aktywności hamującej transkrypcję, oraz trzy motywy PEST, będące celem acetylacji zależnej od p300, odpowiadające tym samym za regulację aktywności BCL6 [8].

N-końcowa domena BTB/POZ w BCL6 jest wysoce konserwowanym motywem, tworzącym ściśle posplatany homodimer o motyłowatym kształcie [9, 10]. Dimeryzacja jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania BCL6, ponieważ prowadzi do formowania tak zwanej bruzdy bocznej (*lateral groove*). Ta charakterystyczna powierzchnia, wyeksponowana na styku obu łańcuchów dimeru, bezpośrednio rekrutuje i specyficznie oddziałuje z korepresorami BCL6: SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*) [11–13], NCoR (*nuclear receptor corepressor*) [12] oraz BCoR (*BCL6 corepressor*) [14], które są kluczowe dla funkcjonowania BCL6 [11, 14]. Aktywność represyjna BCL6



Rycina 1. Mechanizmy i konsekwencje działania BCL6. Poprzez odrębne motywy strukturalne BCL6 rekrutuje różne zestawy korepresorów odpowiedzialnych za różne funkcje biologiczne tego białka. Precyzyjne przerywanie oddziaływań BCL6 z konkretnymi zestawami korepresorów, a tym samym selektywne modulowanie specyficznych funkcji BCL6 może być racjonalną strategią terapeutyczną (szczegóły i wyjaśnienia w tekście)

Figure 1. Mechanisms and consequences of BCL6 function. Through distinct structural motifs, BCL6 recruits different sets of corepressors, responsible for different biological activities of this protein. Precise disruption of BCL6 interactions with its corepressors might modulate specific biological functions of this protein and represent a rational therapeutic strategy (details and explanations of the abbreviations in the text)

polega również na rekrutacji kompleksów deacetylaz histonowych I i II klasy, bezpośrednio lub poprzez korepresory [15].

BCL6 może również wchodzić w bezpośrednią interakcję z szeregiem innych korepresorów, takich jak na przykład MTA3 (*metastasis-associated 3*) [16] czy CtBP1 (*C-terminal-binding protein 1*) [17]. W oddziaływaniach między BCL6 i MTA3 zaangażowana jest domena RD2, a rezultat tego oddziaływania to utworzenie trzeciorzędowego kompleksu z kompleksem korepresora NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*). Poza swą typową funkcją specyficznego względem sekwencji czynnika blokującego transkrypcję, BCL6 potrafi również hamować ekspresję określonych genów w sposób pośredni. BCL6 może oddziaływać z białkiem ZBTB17/Miz1 (*zinc finger and BTB domain-containing protein 17/Myx-interacting protein 1*) i pośrednio wiązać się z elementami Inr (*initiator motif*) promotorów regulowanych genów, hamując w ten sposób ich transkrypcję [18–20].

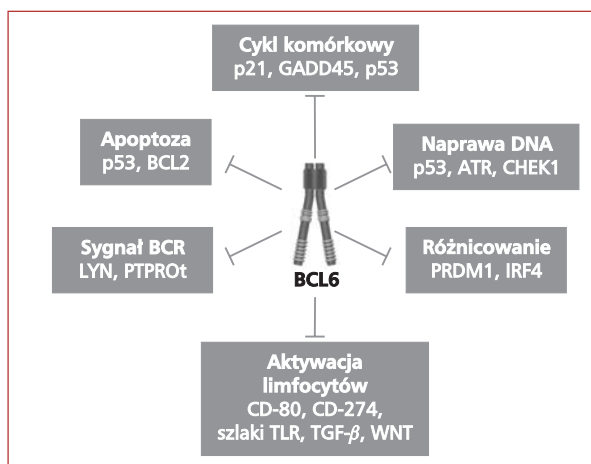
Odmienne zestawy korepresorów, rekrutowane przez BCL6 poprzez różne mechanizmy, są odpowiedzialne za zróżnicowane, biologiczne funkcje tego białka (ryc. 1). Rekrutowane poprzez „bruzdę boczną” BCoR, NCoR i SMRT regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za przebieg reakcji germinalnej. Rekrutacja MTA3 blokuje natomiast transkrypcję czynnika transkrypcyjnego PRDM1 (*PR domain zinc finger protein 1*), znanego także jako BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*), uniemożliwiając przedwczesne różnicowanie limfocytów germinalnych w kierunku komórek plazma-

tycznych [21]. Korepresor CtBP1 oddziałuje zarówno z domeną BTB, jak i centralną częścią BCL6 i jest zaangażowany w negatywną autoregulację ekspresji BCL6, wynikającą z wiązania BCL6 do własnych elementów regulatorowych. Ponieważ rekrutacja różnych korepresorów jest związana z regulacją różnych zestawów genów docelowych i różnymi konsekwencjami biologicznymi [21], to precyzyjne przerywanie oddziaływań BCL6 z konkretnymi zestawami korepresorów, a tym samym selektywne modulowanie specyficznych funkcji BCL6 może być racjonalną strategią terapeutyczną.

BCL6 jako nadrzędny czynnik regulujący reakcję germinalną

Rolę BCL6 w układzie odpornościowym poznano, wykorzystując myszy jako organizmy modelowe [22–24]. Zwierzęta pozbawione *Bcl6* nie wykształcały GC w odpowiedzi na immunizację, cechował je defekt w odpowiedziach immunologicznych zależnych od limfocytów T i były niezdolne do wytwarzania przeciwciał o wysokim powinowactwie. Myszy ze znokautowanym genem wykazywały również poważne reakcje zapalne oraz wzmożoną sekrecję cytokin typu 2 przez limfocyty T [22–24].

Centra germinalne są wyspecjalizowanymi strukturami, w których następuje ekspansja klonu odpowiadającego na antygen i dojrzewanie powinowactwa oraz funkcji efektorowych przeciwciał, wynikających z hipermutacji somatycznych (SHM, *somatic hypermutation*) genów immunoglobulinowych (IG) i zmiany klas (CSR, *class switch recombination*)



Rycina 2. Biologiczna aktywność BCL6 w centrum germinacyjnym. Ekspresja BCL6 umożliwia zapoczątkowanie i przebieg reakcji germinacyjnej, wpływając na procesy detekcji i naprawy uszkodzeń DNA, kinetykę proliferacyjną, próg apoptotyczny, natężenie sygnału receptora B-komórkowego, różnicowanie i aktywację limfocytów. Deregulacja BCL6 i konstytutywna, niepoddająca się fizjologicznej kontroli, ekspresja tego białka ma z tego względu charakter onkogenny (szczegóły i wyjaśnienia w tekście)

Figure 2. BCL6 is the master regulator of germinal center reaction. Expression of BCL6 facilitates initiation and progression of the germinal center reaction by modulating genes involved in DNA damage sensing and repair, proliferation, apoptosis, B-cell receptor signaling threshold, differentiation and activation of lymphocytes. For these reasons, deregulation and constitutive expression of BCL6 is oncogenic (details and explanations of the abbreviations in the text)

[25]. Oba te zjawiska zależą od aktywności enzymu AID (*activation-induced deaminase*), wprowadzającego podwójne złamanie nici DNA. W obrębie centrum germinacyjnego BCL6 blokuje ekspresję wielu czynników zaangażowanych w detekcję uszkodzeń i naprawę DNA (ryc. 2), w tym *TP53* (*tumor protein p53*) [26], *ATR* (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) [27], *CHEK1* (*CHK1 checkpoint homolog Saccharomyces pombe*) [28], *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), kodujący białko p21 czy *GADD45A* (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha*) [18]. Zmniejszona ekspresja tych genów pozwala limfocytom B z GC tolerować fizjologiczne pęknięcia nici DNA wymagane do hipermutacji somatycznej oraz rekombinacji przy przełączaniu klas IG, bez zapoczątkowania odpowiedzi apoptotycznej i zatrzymania progresji cyklu komórkowego. BCL6 może również promować proliferację komórek poprzez represję genów wpływających na zatrzymanie cyklu komórkowego, na

przykład genu białka p21 [18]. W procesie tym pośredniczy interakcja BCL6 z ZBTB17 umożliwiającą wiązanie do promotora *CDKN1A*.

Profil transkrypcyjny limfocytów B centrów germinacyjnych charakteryzuje się również zależną od BCL6 represją niektórych genów antyapoptotycznych, w tym *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) [19]. Podobnie jak w przypadku p21, BCL6 wiąże się do promotora *BCL2* poprzez oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym ZBTB17 i powoduje represję jego transkrypcji [19]. Supresja BCL2 powoduje zwiększoną podatność na śmierć komórkową i reprezentuje niezwykle istotną i kluczową właściwość fenotypu centroblastów. Obniżony próg apoptotyczny tych komórek pozwala na ich efektywną i skuteczną eliminację na drodze apoptozy, o ile nie ocali ich sygnał receptora B-komórkowego i innych ścieżek sygnałowych.

BCL6 wykazuje złożoną, lecz spójną aktywność regulującą wobec molekuł zaangażowanych w oddziaływanie między limfocytami B i T. BCL6 reguluje ekspresję CD80 (*cluster of differentiation 80*), CD274 (*cluster of differentiation 274*) [20, 29] i innych genów kodujących białka ścieżek sygnałowych zaangażowanych w odpowiedzi na cytokiny i chemokiny, takich jak receptory TLR (*toll-like receptors*) i TGF- β (*transforming growth factor beta*) czy ścieżki WNT. Tym sposobem BCL6 podtrzymuje fenotyp limfocytów B z centrów rozrodczych i zapobiega ich przedwczesnemu różnicowaniu i/lub opuszczeniu GC przez centroblasty przed zakończeniem fazy ekspansji proliferatywnej i dojrzewania powinowactwa przeciwciał [30–33]. BCL6 hamuje również końcowe różnicowanie limfocytów B centrów germinacyjnych poprzez bezpośrednią represję genu *PRDM1*, niezbędnego do terminalnego różnicowania w komórki plazmatyczne [34–36]. Dodatkowo BCL6 negatywnie reguluje IRF4 (*transcription factor interferon regulatory factor 4*) — czynnik transkrypcyjny odgrywający kluczową rolę w tworzeniu komórek plazmatycznych i w procesie przełączania klas [37, 38].

Poziom sygnału pochodzącego od BCR (*B-cell receptor*) jest kluczowym, obok sygnałów limfocytów T, czynnikiem determinującym los limfocytów germinacyjnych, kierując je albo ku kolejnym iteracjom procesów edycyjnych IG, albo na ścieżkę dalszego rozwoju i różnicowania. BCL6 kontroluje amplitudę i próg sygnału BCR w centroblastach poprzez represję fosfatazy PTPROt (*protein tyrosine phosphatase receptor type O, truncated*), kontrolującej aktywność SYK (*spleen tyrosine kinase*) — proksymalnej kinazy szlaku BCR [39]. Zależna od BCL6 represja PTPROt obniża próg zarówno dla tonicznych, jak i indukowanych przez ligand sygnałów od BCR w limfocytach B centrów germinacyjnych,

co ułatwia ich przeżywanie. Gdy tylko zostaną wytworzone receptory B-komórkowe o wysokim powinowactwie, wzmocniony, zależny od ligandu sygnał BCR najprawdopodobniej umożliwia supresję BCL6 poprzez zależną od MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) fosforylację domen PEST w BCL6 i związaną z tym proteasomalną degradację, zapewniając w rezultacie wyjście z reakcji germinacyjnej [40]. Dodatkowo utrzymujący się sygnał od CD40 (*cluster of differentiation 40*) w jasnej strefie GC powoduje redukcję ekspresji BCL6 poprzez indukcję IRF4 w ścieżce zależnej od czynnika jądrowego κ B (NF κ B, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [41]. Dalszy wkład w terminację programu BCL6 mają sygnały pochodzące od cytokin i aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Czynniki te wiążą się w obrębie eksonu 1 i intronu 1 *BCL6*, co w rezultacie powoduje zahamowanie jego ekspresji [42]. Miejsca wiązania STAT5 położone wśród elementów regulatorowych *BCL6* w chłoniakach DLBCL u ludzi często są zmutowane, co wskazuje, że utrata zależnej od STAT5 supresji BCL6 może mieć swój udział w deregulowanej ekspresji tego onkogenu [42].

Kontrola reakcji GC przez BCL6 nie jest ograniczona do jego roli w limfocytach B — ekspresja BCL6 zachodzi również w wyspecjalizowanej subpopulacji limfocytów T pomocniczych (Tfh, *T follicular helper*) [43, 44]. Limfocyty Tfh charakteryzują się ekspresją BCL6, CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor type 5*), PD-1 (*programmed cell death protein 1*) i ICOS (*inducible T-cell costimulator*). Limfocyty te odgrywają ważną rolę w tworzeniu i utrzymywaniu reakcji centrów germinalnych poprzez oddziaływanie z grudkowymi komórkami dendrytycznymi (FDC, *follicular dendritic cells*) i limfocytami B, a ponadto zapoczątkowują reakcję germinalną przez zaindukowanie ekspresji BCL6 w aktywowanych limfocytach B i dostarczają im sygnałów antyapoptotycznych oraz stymulujących do przeżycia i proliferacji. Limfocyty T pomocnicze stymulują SHM w nowo utworzonych GC i albo nadal dostarczają sygnałów do przeżycia i proliferacji limfocytom B z korzystnymi wersjami IG, albo zabijają komórki z bezużytecznymi układami genów IG poprzez oddziaływanie receptora śmierci Fas z ligandem FasL. Wreszcie, Tfh są wymagane do różnicowania się limfocytów B w komórki plazmatyczne, a także w komórki pamięci. Tym samym BCL6 jest kluczowym regulatorem biologii Tfh, choć zachodzi to w znacznej mierze poprzez odmienny zestaw genów niż ten kontrolujący tożsamość centroblastów [43, 44]. Ekspresja BCL6 w limfocytach T blokuje ich

różnicowanie w kierunku innych subpopulacji poprzez zahamowanie ekspresji i funkcji głównych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ich rozwój, w tym T-bet (*T-box expressed in T cells* — komórki Th1), GATA3 (*GATA binding protein 3* — komórki Th2), FOXP3 (*Forkhead box P3* — komórki Treg) i ROR γ t (*RAR-related orphan receptor γ* — komórki Th17). Zależna od BCL6 represja BLIMP1 jest dodatkowym mechanizmem, dzięki któremu BCL6 blokuje różnicowanie komórek innych niż Tfh, ponieważ BLIMP1 kieruje różnicowaniem w komórki efektorowe T CD8+ i komórki CD4+ inne niż Tfh [43, 44].

Mechanizmy deregulacji ekspresji BCL6 w nowotworach związanych z centrami rozrodczymi

Ze względu na aktywność BCL6 w biologii reakcji germinacyjnej oraz jego udział w potencjalnie onkogennych procesach, takich jak wykrywanie i naprawa uszkodzeń DNA i kontrola cyklu komórkowego, ekspresja tego czynnika transkrypcyjnego pozostaje pod ścisłą kontrolą, a deregulacja tego onkogenu jest najczęstszą genetyczną aberracją w DLBCL. Translokacje chromosomalne dotyczące *locus BCL6* (3q27) są najczęstszą przyczyną niekontrolowanej ekspresji tego onkogenu. U transgenicznych myszy nadekspresja Bcl6 w komórkach B wywoływana przy użyciu promotora I μ [45] wystarczała do zainicjowania początkowo limfoproliferacji, a następnie do rozwinięcia chłoniaka histologicznie bardzo zbliżonego do typowego ludzkiego DLBCL [45, 46]. W przeważającej większości przypadków translokacji 3q27/*BCL6* w ludzkich nowotworach pęknięcia są zlokalizowane tuż przy końcu 3' eksonu 1 i w związku z tym region kodujący białko BCL6 pozostaje nietknięty [5]. Wskutek takiej konfiguracji złamań sekwencja kodująca BCL6 zostaje włączona w obręb kontroli transkrypcyjnej heterologicznych promotorów [47]. Substytucja promotora powoduje ciągłą, niezakłócaną przez sygnały fizjologiczne, ekspresję i aktywność BCL6 w limfocytach B [48]. Najczęstszym partnerem w translokacji 3q27/*BCL6* jest *locus* ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego (IGH@), ale translokacje mogą również zachodzić przy udziale innych partnerów [49]. W niektórych DLBCL pęknięcie w 3q27 powoduje umieszczenie receptora interleukiny 21 (IL-21) z chromosomu 16 pod kontrolą promotora *BCL6*, podczas gdy region kodujący BCL6 jest regulowany przez promotor receptora IL-21 [50]. Powoduje to wzmożoną ekspresję zarówno IL-21, jak i BCL6, co w obu przypadkach może mieć charakter onkogenny.

Deregulacja BCL6 w DLBCL może zachodzić również wskutek innych mechanizmów niż translokacje. Poprzez wiązanie się do elementów rozpoznawczych w 5' regionie regulatorowym własnego genu BCL6 tworzy pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego regulującego własną ekspresję. Kluczowym korepresorem dla tej autoregulacji BCL6 jest CtBP [17]. Hipermutacje somatyczne sekwencji autoregulatorowych *BCL6* mogą prowadzić do utraty zdolności do samoregulacji, a tym samym wpływać na nadekspresję BCL6 [51]. Dodatkowy poziom, na którym możliwa jest kontrola aktywności BCL6, jest tworzony przez modyfikacje potranslacyjne. Acetylacja motywu KKYK sekwencji PEST centralnej części białka BCL6 przez acetylotransferazę p300 upośledza jego zdolność do represji transkrypcji, między innymi przez wyłączenie zdolności rekrutacji deacetylaz histonowych (HDAC, *histone deacetylase*) [8]. Częste mutacje inaktywujące p300 w DLBCL prowadzą do zmniejszenia acetylacji BCL6 i wzmagają jego aktywność w tych nowotworach [52].

Ekspresja BCL6 w centroblastach może być również regulowana w sposób zależny od ścieżki ubikwityna–proteasom. W odpowiedzi na masową akumulację uszkodzeń DNA w centroblastach kinaza ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) uruchamia fosforylację BCL6, prowadząc w ten sposób do jego interakcji z izomerazą PIN1 (*peptidyl-prolyl-isomerase 1*) i ubikwitynozależnej proteolitycznej degradacji przez proteasom [53]. W tym wypadku utrata ekspresji BCL6 pozwala uszkodzonym limfocytom B wejść w apoptozę zależną od szlaków wyzwalanych przez uszkodzenia DNA. Ekspresja BCL6 może być także modulowana niezależnie od opisanej ścieżki poprzez kompleks ligazy ubikwitynowej SCF (*SKP1–CUL1–F-box protein [SCF] ubiquitin ligase complex*) zawierający białko FBXO11 (*the orphan F-box protein*) [54]. Inaktywacja FBXO11 zwiększa stabilność BCL6 i poziom jego ekspresji, a gen kodujący *FBXO11* ulega delecji lub jest zmutowany w wielu liniach komórkowych DLBCL i pierwotnych komórkach chłoniakowych [54].

Mimo że nadekspresja BCL6 wywołana translokacjami wystarcza do zainicjowania chłoniaka, to jego onkogeny potencjał w znacznym stopniu zależy od obecności innych czynników. Transgen μ -*BCL6* nie powoduje nowotworów limfocytów germinalnych u myszy pozbawionych genu *Aicda* (*activation-induced cytidine deaminase*), co sugeruje, że ekspresja AID jest niezbędna do rozwinięcia onkogenego działania BCL6. Enzym AID to kluczowy enzym, którego aktywność jest wymagana do wprowadzenia podwójnych pęknięć DNA podczas hipermutacji somatycznej i przełączania klas. Obserwacje

te wskazują, że BCL6 tworzy sprzyjające środowisko do nagromadzenia potencjalnie onkogennych uszkodzeń pojawiających się w wyniku aberrantnej mutagennej aktywności AID, ale nie jest zdolny do transformacji komórek, które nie mogą zainicjować działania maszyny edytującej receptory IG [55].

Pełniejsze zrozumienie funkcji i kontekstu działania BCL6 wymaga scharakteryzowania globalnego programu transkrypcyjnego realizowanego przez ten onkogen w centroblastach i chłoniakach wywodzących się z limfocytów germinalnych. Dzięki wykorzystaniu mikromacierzowego profilowania ekspresji genów zestawionego z globalną identyfikacją promotorów regulowanych przez BCL6 w liniach komórkowych i izolowanych limfocytach B centrów germinalnych [20, 56, 57] zdefiniowano zestaw genów regulowanych przez BCL6, a dzięki bioinformatycznej analizie ich wzajemnych powiązań i rekonstrukcji układów sygnałowych modulowanych przez BCL6 *in silico* scharakteryzowano biologiczny kontekst działania tego onkogeny. BCL6 zarządza spójnym biologicznie zespołem genów, w tym związanymi ze znanymi już wcześniej ścieżkami, takimi jak: naprawa DNA, regulacja cyklu komórkowego, transkrypcji i stanu chromatyny. Co więcej, w badaniach tych stwierdzono także wpływ BCL6 na inne ścieżki sygnałowe, między innymi dotyczące przekazywania sygnałów przez receptory TLR, IFN, TGF, ścieżkę WNT i cytokiny. BCL6 reguluje również geny biorące udział w transkrypcji, metabolizmie RNA i ubikwitynylacji białek [20, 56, 57]. Szczególną cechą programu transkrypcyjnego zależnego od BCL6 jest jego ekspansja (zwiększenie liczby genów regulowanych w limfocytach nowotworowych) i jednoczesna częściowa utrata właściwości (brak wpływu BCL6 w komórkach nowotworowych na niektóre geny regulowane w prawidłowych limfocytach). Ponadto BCL6 powoduje represję kilku onkogenów limfocytów B (w tym: *BCL2*, *MYC*, *BMI1*, *JUNB*, *CCND1*, *PIM1*, *PIM2*, *EIF4E*, *BAG1* i *NOTCH2*), zatem tym samym może niejako równoważyć swój własny potencjał onkogeny, hamując ekspresję innych onkogenów. Obserwacje te sugerują, że aby w pełni uwolnić swój onkogeny potencjał, BCL6 musi współdziałać z innymi, dodatkowymi partnerami.

Kliniczne konsekwencje ekspresji BCL6 w DLBCL

Mimo że zmiany strukturalne dotyczące genu *BCL6* są uznanym czynnikiem patogenetycznym

w rozwoju DLBCL, to klinicznych konsekwencji translokacji *BCL6*, jak dotąd, bezspornie i jednoznacznie nie określono. Istniejące doniesienia wskazują zarówno na korzystne, jak i negatywne znaczenie prognostyczne translokacji *BCL6* [58–60]. W większości tych doniesień translokacje *BCL6* nie korelowały z ekspresją białka, najprawdopodobniej z powodu alternatywnych dla translokacji mechanizmów deregulacji. Rearanżacje tego onkogenu są znacznie częstsze w bardziej agresywnych chłoniakach DLBCL typu ABC (*activated B-cell*), natomiast hipermutacja somatyczna elementów regulatorowych *BCL6* i ekspresja białka jest wyższa w DLBCL typu GC-B (*germinal center B-cell*) [61]. Niejasne znaczenie prognostyczne translokacji *BCL6* może również wynikać z różnorodności genów będących partnerami tego onkogenu. Heterologiczne regiony regulatorowe w translokacjach, w których partnerem są regiony genów *IG*, mogą wykazywać inny potencjał aktywujący transkrypcję *BCL6* niż regiony partnerów nieimmunoglobulinowych. W konsekwencji różne translokacje mogą powodować ekspresję białka na znacznie różniących się poziomach i w rezultacie ich wpływ prognostyczny może się istotnie różnić [62, 63]. W przeciwieństwie do niejasnego prognostycznego wpływu translokacji, mRNA i ekspresja białka *BCL6* są biomarkerami znacznie lepszego rokowania u chorych leczonych standardową polichemioterapią zawierającą antracyklinę [64, 65]. U chorych z wysokim poziomem mRNA *BCL6* mediana przeżycia całkowitego (OS, *overall survival*) była istotnie wyższa niż u chorych z niską ekspresją tego genu (odpowiednio 171 i 24 miesiące; $p = 0,007$) [65]. Ekspresja białka *BCL6* oceniana immunohistochemicznie wiązała się również z dłuższym OS tych chorych. Ekspresja genu *BCL6* stanowiła niezależny czynnik prognostyczny w analizie wieloczynnikowej, uwzględniającej również parametry Międzynarodowego Indeksu Prognostycznego (IPI, *International Prognostic Index*). W przeciwieństwie do chorych leczonych według schematu CHOP (cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon), u chorych poddawanych immunochemioterapii z zastosowaniem rytuksymabu w połączeniu z CHOP ekspresja białka *BCL6* nie wiązała się z lepszymi wynikami leczenia [66].

BCL6 jako cel terapeutyczny w DLBCL

BCL6, jako onkogenny czynnik transkrypcyjny, którego deregulacja inicjuje powstanie niektórych chłoniaków DLBCL i wpływa na ich biologiczną charakterystykę, stanowi logiczny i atrakcyjny cel terapeutyczny. Molekularne mechanizmy patogene-

tyczne wynikające z zaburzonych oddziaływań międzybiałkowych dotychczas uznawano jednak za niepoddające się interwencji terapeutycznej. Opierając się na zrozumieniu zależności między strukturą i działaniem *BCL6*, w ostatnich latach dokonano znaczących postępów w pracach nad otrzymaniem swoistych antagonistów, które mogą tę opinię istotnie zmienić. Potencjalnym celem działań tych inhibitorów są przede wszystkim domena dimeryzacyjna, „bruzda boczna” i obdarzona ładunkiem kieszeń w obrębie struktury cząsteczki *BCL6* [67, 68]. Onkogenna aktywność *BCL6* zależy przede wszystkim od jego zdolności do rekrutacji korepresorów poprzez unikatowe miejsce wiązania, znajdujące się w części N-terminalnej (domena BTB). Cząsteczki, które są zdolne do zablokowania tego miejsca, są tym samym w stanie hamować onkogenne funkcje *BCL6* zależne od rekrutacji tych korepresorów. Specyficzny peptydowy inhibitor *BCL6*, BPI (*BCL6 peptide inhibitor*), stanowiący rekombinowany fragment korepresora SMRT, swoiście przyłącza się do „bruzdy bocznej” w domenie BTB *BCL6* i interferuje z rekrutacją korepresorów. W ten sposób BPI zakłóca działanie *BCL6* i reaktywuje ekspresję genów regulowanych przez ten czynnik. Podawany zwierzętom BPI rekapitułuje fenotyp myszy *Bcl6*^{-/-} i upośledza tworzenie GC w odpowiedzi na antygeny zależne od limfocytów T [67]. Ponadto BPI hamuje proliferację i indukuje apoptozę nowotworowych limfocytów B. Dalsze modyfikacje BPI (skrócenie, konwersja do formy zawierającej D-aminokwasy, addycja motywów zwiększających penetrację przez błony) doprowadziły do otrzymania jego ulepszonej formy RI-BPI (*retro-inverted BPI*) — dużo silniejszej i stabilniejszej, a wciąż utrzymującej wysoką swoistość oryginalnego fragmentu [68]. Forma RI-BPI okazała się nietoksyczna, nieimmunogenna i, podobnie jak wyjściowy peptyd, była w stanie odtworzyć fenotyp myszy pozbawionych *Bcl6* [68]. Poza tym RI-BPI indukował apoptozę w komórkach chłoniaków pochodzących z pierwotnych ludzkich DLBCL, nie uszkadzając jednocześnie zdrowych tkanek limfatycznych i nie oddziałując na inne nowotwory. Chociaż RI-BPI powoduje reaktywację wielu genów zwykle blokowanych przez *BCL6*, to specyficzna toksyczność tego inhibitora w dużej mierze jest związana z odblokowaniem kilku ściśle określonych genów, w tym transkrypcji *EP300*. Czynnik transkrypcyjny *BCL6* bezpośrednio blokuje ekspresję acetylotransferazy lizynowej p300 (*EP300*) i jej kofaktora BAT3 (*HLA-B-associated transcript 3*) [52]. Reekspresja *EP300* i *BAT3* była niezbędna dla toksyczności RI-BPI w komórkach chłoniakowych, a zablokowanie ich ekspresji poprzez

interferencję RNA znosiło toksyczność tego inhibitora [52]. Przywrócenie ekspresji EP300 po zastosowaniu RI-BPI powoduje hiperacetylację p53 oraz białka szoku cieplnego HSP90 (*heat shock protein 90*), co prowadzi do zwiększonej aktywności p53 i upośledzenia opiekuńczych funkcji HSP90. Acetylacja HSP90 wpływa na przyspieszenie degradacji i zmniejszenie ekspresji AKT i RAF1, kontrolowanych przez to białko opiekuńcze. Ponadto endogenne HSP90 oddziałuje bezpośrednio z BCL6, stabilizując zarówno białko, jak i mRNA [69]. Inhibitor HSP90 — PU-H71 zmniejszał ekspresję BCL6 poprzez stymulację jego degradacji w proteasomach, a także destabilizując samo mRNA. Inhibitor ten odblokowywał ekspresję genów regulowanych przez BCL6 i prowadził do śmierci komórek pierwotnych ludzkich DLBCL oraz tłumiał wzrost tych DLBCL *in vivo* [69]. Reasumując, toksyczność RI-BPI w znacznej mierze polega na zależności od p300 modulacji funkcji p53 oraz HSP90. Obserwacje te wskazują również na potencjalne racjonalne skojarzenia dostępnych klinicznie celowanych inhibitorów, które mogą wpływać na procesy modulowane przez deregulację BCL6, takie jak będące w trakcie badań klinicznych i/lub zarejestrowane już inhibitory deacetylaz histonowych i inhibitory HSP90.

Peptydy blokujące BCL6 nie osiągnęły dotychczas etapu badań klinicznych i są dostępne wyłącznie jako związki narzędziowe, wskazujące na terapeutyczny potencjał inhibicji BCL6, mechanizm jego toksyczności i możliwe kombinacje z innymi lekami. Inhibitory drobnocząsteczkowe reprezentują alternatywne podejście terapeutyczne, którego celem są interakcje BCL6. Poszukiwania *in silico* potencjalnych cząstek wykazujących powinowactwo do miejsca wiązania korepresorów w domenie BTB BCL6, w połączeniu z symulacjami bioinformatycznymi i testami funkcjonalnymi, doprowadziły do identyfikacji związku o kodowej nazwie „79–6”, który specyficznie blokuje interakcje BCL6 z korepresorami BCoR, NCoR oraz SMRT. Związek ten cechuje dobra penetracja do wnętrza komórek pozwalająca na reaktywację ekspresji genów regulowanych przez BCL6 i selektywną indukcję apoptozy komórek DLBCL zależnych od BCL6 [70]. Cząsteczka ta nie interferowała z działaniem innych represorów transkrypcji z domenami BTB i nie wykazywała istotnego wpływu na nowotwory BCL6-niezależne, co wskazuje na dużą specyficzność działania tego inhibitora. Związek 79–6 swobodnie hamował wzrost BCL6-zależnych nowotworów również *in vivo*, nie wpływając na wzrost chłoniaków niezależnych od BCL6. Chociaż cząsteczka 79–6 wciąż wymaga strukturalnej optymalizacji,

zanim trafi do prób klinicznych, to racjonalne projektowanie drobnocząsteczkowych antagonistów BCL6 jest niewątpliwym przełomem, który może wprowadzić tę klasę leków do leczenia klinicznego.

Biomarkery umożliwiające identyfikację nowotworów wrażliwych na inhibitory BCL6

Poważną przeszkodą w zastosowaniu terapii celowanych ukierunkowanych na BCL6 w praktyce i jednym z głównych problemów badań klinicznych z zastosowaniem terapii celowanych w ogóle jest możliwość wytypowania chorych, u których cel terapii stanowi krytyczny czynnik biologiczno-patogenetyczny. Biorąc pod uwagę molekularną heterogenność DLBCL, jest to szczególnie problem w tej chorobie. W badaniach *in vitro* brak ekspresji BCL6 zawsze powodował oporność na BPI, ale obecność BCL6 nie decydowała o wrażliwości na ten inhibitor [56, 67].

Heterogenność molekularną DLBCL można scharakteryzować według podobieństw transkrypcyjnych komórek chłoniakowych do prawidłowych limfocytów B centrum rozrodczego (GCB DLBCL) lub aktywowanych *in vitro* komórek B (ABC DLBCL) [71]. Typ GCB charakteryzuje się wyższym poziomem BCL6, natomiast podgrupa ABC wykazuje częstsze translokacje BCL6, chociaż jego ekspresja jest niższa niż w nowotworach GCB. Mimo wielu biologicznych różnic między tymi typami molekularnymi, przekładających się również na ich charakterystykę kliniczną, w przypadku inhibitorów BCL6 charakterystyka GCB/ABC komórek nowotworowych nie różnicowała wrażliwości na ich działanie [56]. Alternatywnym podejściem do molekularnej klasyfikacji DLBCL jest ich klasyfikacja bez założeń *a priori* o podobieństwach molekularnych [72]. Klasyfikacja taka pozwala na wyodrębnienie trzech biologicznie odrębnych grup. Pierwszą z nich jest grupa wykazująca podwyższoną ekspresję genów związanych z fosforylacją oksydacyjną (grupa OxP [*oxidative phosphorylation*]). Drugą grupą są chłoniaki charakteryzujące się zwiększoną ekspresją genów związanych z odpowiedzią immunologiczną gospodarza (grupa HR [*host response*]). Trzecią i zarazem najliczniejszą grupę stanowiły chłoniaki z intensywną ekspresją komponentów kaskady sygnałów receptora B-komórkowego oraz specyficznych dla komórek B czynników transkrypcyjnych, w tym BCL6 (grupa BCR). Nowotwory typu BCR wykazywały również częstsze translokacje dotyczące BCL6, co sugeruje, że mogą one zależeć od programu transkrypcyjnego BCL6 [56].

W pierwotnych chłoniakach DLBCL, w podgrupie BCR, geny regulowane przez BCL6 były regulowane w skoordynowany sposób w odróżnieniu od pozostałych typów molekularnych. W eksperymentach przeprowadzonych na panelu linii komórkowych DLBCL jedynie chłoniaki typu „BCR” były wysoce wrażliwe na BPI [56]. Reasumując, badania te wskazują na ściśle zdefiniowaną molekularnie grupę chłoniaków DLBCL, która jest zależna od sygnałów BCL6 i wrażliwa na inhibitory tego czynnika transkrypcyjnego. Inhibitor HSP90 PU-71, którego aktywność w znacznej mierze zależy od modulacji ekspresji BCL6, wykazywał podobne profile wrażliwości w eksperymentach na liniach komórkowych [68, 69].

Wnioski i perspektywy

Zależne od programu transkrypcyjnego BCL6 fizjologiczne zmiany kinetyki proliferacyjnej i różnicowania limfocytów oraz odpowiedzi na czynniki genotoksyczne są potencjalnie onkogenne i w istocie często wykorzystywane przez limfocyty ulegające transformacji nowotworowej. Podobnie jak w przypadku innych czynników transkrypcyjnych deregulowanych w onkogenezie, biologiczna aktywność BCL6 zależy od oddziaływań z korepresorami. Interakcje te zwykle zachodzą poprzez relatywnie duże powierzchnie i właśnie dlatego uważano je za niepodatne na interwencje terapeutyczne, szczególnie z użyciem małych cząstek. Zgłębienie molekularnych mechanizmów działania BCL6, a w szczególności dokładne scharakteryzowanie struktury BCL6, pozwoliło na rewizję tej tezy, a otrzymane inhibitory mogą się stać ważnym narzędziem w leczeniu DLBCL. Poznanie molekularnych mechanizmów powodujących onkogeny charakter BCL6, a zwłaszcza mechanizmów efektorowych BCL6, pozwala oczekiwać, że łączona inhibicja tych szlaków może być strategią szczególnie uzasadnioną. Ekspansja programu transkrypcyjnego BCL6 w nowotworach B-komórkowych względem prawidłowych limfocytów B pozwala oczekiwać, że inhibitory BCL6 nie będą wykazywały istotnych działań niepożądanych. Takie nadzieje są również podparte badaniami na zwierzętach, u których inhibitory BCL6 nie wykazywały znaczących działań toksycznych. Obserwacje te uzasadniają potrzebę kontynuowania prac nad rolą inhibitorów BCL6 i określeniem ich miejsca w leczeniu nowotworów B-komórkowych. Obok zasadniczej roli w biologii GC i dobrze udokumentowanej roli w onkogenezie limfocytów B, BCL6 jest również ważnym czynnikiem dla oporności komórek macierzystych przewlekłej

białaczki szpikowej na terapię inhibitorami kinaz tyrozynowych [73, 74]. Tym samym kliniczne zastosowanie inhibitorów BCL6, zarówno w formie monoterapii, jak i terapii skojarzonych z innymi lekami celowanymi, mogą wykraczać poza wskazania dotyczące nowotworów układu chłonnego.

Piśmiennictwo

1. Bastard C., Tilly H., Lenormand B. i wsp. Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1992; 79: 2527–2531.
2. Jantus Lewintre E., Reinoso Martín C., García Ballesteros C. i wsp. BCL6: somatic mutations and expression in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2009; 50: 773–780.
3. Baron B.W., Nucifora G., McCabe N., Espinosa R., Le Beau M.M., McKeithan T.W. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 5262–5266.
4. Ye B.H., Rao P.H., Chaganti R.S., Dalla-Favera R. Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 2732–2735.
5. Ye B.H., Lista F., Lo Coco F. i wsp. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 1993; 262: 747–750.
6. Parekh S., Privé G., Melnick A. Therapeutic targeting of the BCL6 oncogene for diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 874–882.
7. Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin; BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop.* 2006; 46: 43–53.
8. Bereshchenko O.R., Gu W., Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat. Genet.* 2002; 32: 606–613.
9. Melnick A., Carlile G., Ahmad K.F. i wsp. Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: 1804–1818.
10. Ahmad K.F., Melnick A., Lax S. i wsp. Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol. Cell.* 2003; 12: 1551–1564.
11. Dhordain P., Albagli O., Lin R.J. i wsp. Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 10762–10767.
12. Huynh K.D., Bardwell V.J. The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene* 1998; 17: 2473–2484.
13. Wong C.W., Privalsky M.L. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 27695–27702.
14. Huynh K.D., Fischle W., Verdin E., Bardwell V.J. BCOR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev.* 2000; 14: 1810–1823.
15. Lemerrier C., Brocard M.P., Puvion-Dutilleul F., Kao H.Y., Albagli O., Khochbin S. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 22045–22052.
16. Fujita N., Jaye D.L., Geigerman C. i wsp. MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* 2004; 119: 75–86.

17. Mendez L.M., Polo J.M., Yu J.J. i wsp. CtBP is an essential corepressor for BCL6 autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 2175–2186.
18. Phan R.T., Saito M., Basso K., Niu H., Dalla-Favera R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 1054–1060.
19. Saito M., Novak U., Piovan E. i wsp. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 11294–11299.
20. Basso K., Saito M., Sumazin P. i wsp. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 2010; 115: 975–984.
21. Parekh S., Polo J.M., Shaknovich R. i wsp. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* 2007; 110: 2067–2074.
22. Dent A.L., Shaffer A.L., Yu X., Allman D., Staudt L.M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997; 276: 589–592.
23. Fukuda T., Yoshida T., Okada S. i wsp. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 439–448.
24. Ye B.H., Cattoretti G., Shen Q. i wsp. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* 1997; 16: 161–170.
25. Klein U., Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 22–33.
26. Phan R.T., Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004; 432: 635–639.
27. Ranuncolo S.M., Polo J.M., Dierov J. i wsp. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 705–714.
28. Ranuncolo S.M., Polo J.M., Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008; 41: 95–99.
29. Niu H., Cattoretti G., Dalla-Favera R. BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 211–221.
30. Meyer-Bahlburg A., Khim S., Rawlings D.J. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 3095–3101.
31. Pasare C., Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 438: 364–368.
32. Cazac B.B., Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 2000; 13: 443–451.
33. Yu Q., Quinn W.J., Salay T., Crowley J.E., Cancro M.P., Sen J.M. Role of beta-catenin in B cell development and function. *J. Immunol.* 2008; 181: 3777–3783.
34. Reljic R., Wagner S.D., Peakman L.J., Fearon D.T. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1841–1848.
35. Tunyaplin C., Shaffer A.L., Angelin-Duclos C.D., Yu X., Staudt L.M., Calame K.L. Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol.* 2004; 173: 1158–1165.
36. Shapiro-Shelef M., Lin K.I., McHeyzer-Williams L.J., Liao J., McHeyzer-Williams M.G., Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and preplasma memory B cells. *Immunity*. 2003; 19: 607–620.
37. Klein U., Casola S., Cattoretti G. i wsp. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 773–782.
38. Sciammas R., Shaffer A.L., Schatz J.H., Zhao H., Staudt L.M., Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 2006; 25: 225–236.
39. Juszczynski P., Chen L., O'Donnell E. i wsp. BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROt. *Blood* 2009; 114: 5315–5321.
40. Niu H., Ye B.H., Dalla-Favera R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev.* 1998; 12: 1953–1961.
41. Saito M., Gao J., Basso K. i wsp. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2007; 12: 280–292.
42. Walker S.R., Nelson E.A., Zou L. i wsp. Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer. *Mol. Cancer Res.* 2009; 7: 966–976.
43. Liu X., Yan X., Zhong B. i wsp. Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J. Exp. Med.* 2012; 209: 1841–1852.
44. Okada T., Moriyama S., Kitano M. Differentiation of germinal center B cells and follicular helper T cells as viewed by tracking Bcl6 expression dynamics. *Immunol. Rev.* 2012; 247: 120–132.
45. Cattoretti G., Pasqualucci L., Ballon G. i wsp. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell.* 2005; 7: 445–455.
46. Baron B.W., Anastasi J., Montag A. i wsp. The human BCL6 transgene promotes the development of lymphomas in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 14198–14203.
47. Ye B.H., Chaganti S., Chang C.C. i wsp. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J.* 1995; 14: 6209–6217.
48. Chen W., Iida S., Louie D.C., Dalla-Favera R., Chaganti R.S. Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* 1998; 91: 603–607.
49. Ohno H., Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk. Lymphoma* 1997; 27: 53–63.
50. Ueda C., Akasaka T., Kurata M. i wsp. The gene for interleukin-21 receptor is the partner of BCL6 in t(3;16)(q27;p11), which is recurrently observed in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2002; 21: 368–376.
51. Pasqualucci L., Migliazza A., Basso K., Houldsworth J., Chaganti R.S., Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101: 2914–2923.
52. Cerchietti L.C., Hatzi K., Caldas-Lopes E. i wsp. BCL6 repression of EP300 in human diffuse large B cell lymphoma cells provides a basis for rational combinatorial therapy. *J. Clin. Invest.* 2010 Nov 1. pii: 42869. doi: 10.1172/JCI42869 [złożono do druku].
53. Phan R.T., Saito M., Kitagawa Y., Means A.R., Dalla-Favera R. Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 1132–1139.

54. Duan S., Cermak L., Pagan J.K. i wsp. FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature* 2012; 481: 90–93.
55. Pasqualucci L., Bhagat G., Jankovic M. i wsp. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* 2008; 40: 108–112.
56. Polo J.M., Juszczynski P., Monti S. i wsp. Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 3207–3212.
57. Ci W., Polo J.M., Cerchiatti L. i wsp. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 2009; 113: 5536–5548.
58. Offit K., Lo Coco F., Louie D.C. i wsp. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 74–80.
59. Niitsu N., Okamoto M., Nakamura N. i wsp. Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leuk. Res.* 2007; 31: 1191–1197.
60. Akyurek N., Uner A., Benekli M., Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer* 2012; 118: 4173–4183.
61. Iqbal J., Greiner T.C., Patel K. i wsp. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 2332–2343.
62. Akasaka T., Ueda C., Kurata M. i wsp. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* 2000; 96: 2907–2909.
63. Ueda C., Uchiyama T., Ohno H. Immunoglobulin (Ig)/BCL6 versus non-Ig/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma corresponds to a high- versus low-level expression of BCL6 mRNA. *Blood* 2002; 99: 2624–2625.
64. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A. i wsp. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1828–1837.
65. Lossos I.S., Jones C.D., Warnke R. i wsp. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001; 98: 945–951.
66. Winter J.N., Weller E.A., Horning S.J. i wsp. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 2006; 107: 4207–4213.
67. Polo J.M., Dell'Oso T., Ranuncolo S.M. i wsp. Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat. Med.* 2004; 10: 1329–1335.
68. Cerchiatti L.C., Yang S.N., Shaknovich R. i wsp. A peptomimetic inhibitor of BCL6 with potent antilymphoma effects in vitro and in vivo. *Blood* 2009; 113: 3397–3405.
69. Cerchiatti L.C., Lopes E.C., Yang S.N. i wsp. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* 2009; 15: 1369–1376.
70. Cerchiatti L.C., Ghetu A.F., Zhu X. i wsp. A small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell* 2010; 17: 400–411.
71. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. i wsp. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
72. Monti S., Savage K.J., Kutok J.L. i wsp. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005; 105: 1851–1861.
73. Duy C., Hurtz C., Shojaee S. i wsp. BCL6 enables Ph+ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition. *Nature* 2011; 473: 384–388.
74. Hurtz C., Hatzi K., Cerchiatti L. i wsp. BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 2163–2174.