



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

El papel del oncogén *BCL6* en linfomas B.

Role of *BCL6* oncogene in B-cell lymphomas.

Autora: Carmen Iglesias Montalvo

Directora: M. Dolores Delgado Villar

Codirectora: Ana Batlle Lopez

Santander, Junio 2017

INDICE

RESUMEN	4
ABREVIATURAS:.....	5
GLOSARIO	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS B. CENTRO GERMINAL.....	8
3. ESTRUCTURA, EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE BCL6.....	10
3.1. Gen y proteína BCL6:	10
3.2. Expresión de BCL6	11
3.3. Regulación de la expresión de BCL6	11
4. FUNCIÓN DE BCL6: MECANISMOS DE ACCIÓN Y GENES DIANA	15
4.1. Mecanismos bioquímicos de acción de BCL6.....	15
4.2. Genes diana y rutas reguladas por BCL6.....	17
5. DESREGULACIÓN DE BCL6 EN LINFOMAS.....	23
5.1. BCL6 y linfomagénesis	23
5.2. Alteraciones en la regulación de BCL6.....	26
6. TERAPIA DIRIGIDA CONTRA BCL6.....	31
6.1. Diseño racional de inhibidores de BCL6	31
6.2. Moléculas inhibidoras de BCL6	34
6.3. Combinación de terapias en linfomas	38
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFIA.....	41

RESUMEN

BCL6 es un represor transcripcional indispensable para la inmunidad adaptativa, dado que es esencial para la formación del centro germinal, donde se produce la generación de anticuerpos de alta afinidad. Para ejercer su función como master regulador del centro germinal regula diferentes vías de señalización, inhibiendo la diferenciación a células plasmáticas, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y varias rutas que intervienen en los estadios finales de la diferenciación de los linfocitos B. La desregulación de BCL6 es suficiente para la generación de linfomas. Es por ello que la expresión de BCL6 está altamente regulada tanto por mecanismos transcripcionales como post-transcripcionales. La desregulación de BCL6 se detecta en diferentes tipos de linfomas agresivos, con frecuencia de origen centrogerminal, siendo especialmente frecuente en DLBCL. A pesar de los avances, los linfomas todavía tienen una alta tasa de recidivas. El desarrollo de terapia dirigida contra BCL6 se plantea como una atractiva alternativa para estos pacientes. Para diseñar estos inhibidores de BCL6 es importante conocer cuáles son las regiones implicadas en la represión transcripcional. Gracias a varios estudios se han desarrollado moléculas que inhiben el dominio BTB (BPI, RI-BPI y pequeñas moléculas) y moléculas que actúan a nivel del dominio RD2 de BCL6. La combinación de los inhibidores de BCL6 con fármacos que actúan sobre las vías reprimidas por BCL6 aumenta la muerte de las células de los linfomas con menor toxicidad que la terapia convencional.

Palabras clave: BCL6, centro germinal, represión transcripcional, diferenciación de células B, linfomas, terapia dirigida.

BCL6 is a transcriptional repressor necessary for adaptive immunity, since it is essential for the formation of the germinal center, where the generation of high affinity antibodies takes place. To exert its function as a master regulator of the germinal center, BCL6 regulates different signaling pathways, such as inhibiting plasma cell differentiation, DNA damage response, apoptosis and several pathways involved in the final states of B-cell differentiation. Deregulation of BCL6 is sufficient for the generation of lymphomas. This is why BCL6 expression is highly regulated by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Deregulation of BCL6 is detected in different types of aggressive lymphomas, often of germinal center origin, being especially frequent in DLBCL. Despite the latest advances, lymphomas still have a high relapse rate. The development of therapy directed against BCL6 is considered as an attractive alternative for these patients. To design these BCL6 inhibitors it is important to know which regions are involved in transcriptional repression. Several studies have developed molecules that inhibit the BTB domain (BPI, RI-BPI and small molecules) and molecules that act on RD2 domain of BCL6. The combination of BCL6 inhibitors with drugs acting on BCL6 repressed pathways increases the death of lymphoma cells with less toxicity than conventional therapy.

Key words: BCL6, germinal center, transcriptional repression, B-cell differentiation, lymphoma, targeted therapy.

ABREVIATURAS:

AICDA:	Activation Induced Cytidine Deaminase
ATR:	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
AUF1:	AU-rich element binding protein 1
BCL2:	B Cell Lymphoma 2
BCL6:	B Cell Lymphoma 6
BCOR:	BCL6 Corepressor
BCR:	B-cell receptor
BMI1:	B lymphoma Mo- MLV insertion region 1 homolog
BTB/POZ:	Broad complex/tramtrack/bric-a-brac
CCND1:	Cyclin D1
CD20:	Cluster of differentiation 20
CDKN1A:	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
CHEK1:	Checkpoint kinase 1
CTCF:	Transcriptional regulator
CG:	Centro Germinal
DLBCL:	Diffuse Large B cell Lymphoma
eIF4e:	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EP300:	E1A binding protein p300
FDC:	Follicular Dendritic Cell
FL:	Follicular Lymphoma
GEP:	Gene Expression Profile
HAT:	Histone acetyl transferase
HDAC:	Histone deacetylase complexes
HSP90:	Heat shock protein 90
Ig:	Immunoglobulin
IRF8:	Interferon regulatory factor 8
IRF4/MUM1:	Interferon regulatory factor 4
IL21-R:	Interleukin 21 receptor
IFN- α/β :	Interferon α/β
LCR:	Locus Control Region
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MTA3:	Metastasis associated 1 family, member 3
NCOR:	Nuclear Receptor Corepressor
NuRD:	Nucleosome remodeling and deacetylase
NF- κ B:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OxPhos:	Oxidative phosphorylation
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PRDM1:	Positive Regulatory Domain 1
SMRT:	Silencing Mediator of the Retinoid and Thyroid hormone receptors
STAT5:	Signal Transducers and Activators of Transcription protein 5
SYK:	Spleen tirosina quinasa
T _{FH} :	Follicular B Helper T cells
TP53:	Tumor protein p53
H2AX:	H2A histone family, member X

GLOSARIO

AICD: Se trata de una enzima de 24 kDa que en los humanos está codificado por el gen *AICDA*. Genera mutaciones en el ADN por deaminación de bases de citosina, las cuales son convertidas en uracilo.

ATR: producto de un gen cuya función es la de detectar los daños del ADN y poner en marcha una cascada de puntos de control en respuesta a roturas simples o dobles de la cadena de ADN.

B cell lymphoma 6 (BCL6): es un represor transcripcional y miembro de la familia de factores de transcripción BTB/POZ dedos de zinc. BCL6 se detectó inicialmente en una translocación que ocurre en el cromosoma 3q27 en el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

BCL6 co-represor (BCOR): co-represor transcripcional que interactúa con BCL6 en células B del centro germinal y de linfomas. BCOR forma un complejo (PRC1) que contiene la histona desmetilasa KDM2B, ubiquitina ligasas RING1A y RING1B y otras proteínas relacionadas con PRC1.

BTB: dominio estructural situado en el N-terminal de BCL6 que media la dimerización de BCL6. La dimerización del dominio BTB de BCL6 genera dos "lateral groove" idénticos y simétricos. Sirven para el reclutamiento de co-represores.

Centroblastos: Células B del centro germinal sometidas a una rápida división e hipermutación somática de sus loci de inmunoglobulina. Los centroblastos se localizan en la zona oscura del centro germinal.

Centrocitos: células B del centro germinal que derivan de los centroblastos y emigran a la zona clara del centro germinal donde examinan la afinidad de sus receptores de anticuerpos con ayuda de células dendríticas foliculares (FDC) y células T helper foliculares del centro germinal.

Centro germinal (CG): zona dentro de los órganos linfoides secundarios que se forman tras la activación de células B. En esta estructura se articula la respuesta de larga duración y alta afinidad de las células B, dependientes de su unión a células T. Las células B sufren hipermutación somática del gen de las inmunoglobulinas y recombinación de clase, lo que conduce a la maduración de los anticuerpos.

Deacetilación de histonas: Las histonas suelen estar cargadas positivamente debido a los grupos amino presentes en los residuos de lisina y arginina. Estas cargas positivas ayudan y afianzan la interacción con las cargas negativas de los grupos fosfato del esqueleto carbonado del ADN. La deacetilación de histonas elimina los grupos acetilo, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN, impidiendo la transcripción.

Retro-inverted BCL6 peptide inhibitors (RI-BPI): péptidos pequeños diseñados para imitar la secuencia del péptido SMRT que interacciona directamente con el dímero BCL6. Estos péptidos se unen al dominio BTB de BCL6 y dan como resultado la interrupción de la interacción de BCL6 con los co-represores del dominio BTB, el cese de la represión de los genes diana de BCL6 y la muerte celular del linfoma.

SMRT/NCOR (Silencing Mediator of the Retinoid and Thyroid hormone receptors/ Nuclear Receptor Corepressor): proteínas homólogas co-represoras que interactúan con muchos factores de transcripción represores. El núcleo de la represión SMRT/NCOR contiene HDAC3, TBL1 y GPS2.

PEST: Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el encargado de defender nuestro organismo de agentes patógenos externos, diferenciándose el sistema innato, primera línea de defensa, y el sistema adaptativo.

Las células NK, NK-like T cells y las células Gamma delta junto con granulocitos y macrófagos constituyen los principales efectores del sistema innato. Cuando el sistema inmune innato entra en contacto con un antígeno a través de unas proteínas conocidas como “Pattern Recognition Receptors” se inicia la respuesta inflamatoria no específica, proporcionando una respuesta rápida, pero que dura poco y es inespecífica. La respuesta innata además estimula la respuesta adaptativa que tiene como protagonistas a los linfocitos B y T, y que a diferencia de la anterior se caracteriza por la especificidad y la memoria.

La interacción del linfocito B con el antígeno, produce una señal que induce la migración a los órganos linfoides secundarios, estimula la proliferación dando lugar a los centros germinales (CG) y se inician una serie de procesos conocidos como hipermutación somática y cambio de isotipo, cuyo objetivo es la generación de unos anticuerpos de alta afinidad específicos frente al antígeno que inició la respuesta. De esta manera se producen células de memoria de vida larga tras varios días de expansión clonal. En caso de reexposición al mismo antígeno se produce una respuesta muy específica, rápida y efectiva (Moss & Drayson, 2015).

Para la formación de los centros germinales, responsables de proporcionar el ambiente necesario para la generación de los anticuerpos de alta afinidad, se requiere la expresión del gen *BCL6*, siendo por ello considerado el “master regulator” de dicha estructura (Basso & Dalla-Favera, 2010). *BCL6* es un potente represor transcripcional, identificado en 1993 como la diana de alteraciones cromosómicas que afectaban al cromosoma 3q27 en los linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) (Ye et al., 1993). Los animales deficientes de *BCL6* son inmunodeficientes al no ser capaces de generar centros germinales y por otro lado, la desregulación de *BCL6* es suficiente para inducir linfomas en modelos animales.

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento de los linfomas agresivos, estos siguen siendo una causa importante de mortalidad y morbilidad, con un incremento de la mortalidad en las últimas dos décadas. Por tanto, es importante conocer los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de linfomagénesis, entre los que destaca la desregulación del oncogén *BCL6*.

En este trabajo se lleva a cabo una revisión de la literatura de los últimos años sobre la importancia de *BCL6* en los eventos que se producen en el centro germinal, y como su alteración es responsable del desarrollo de linfomas B agresivos. También se describen los últimos avances en el desarrollo de moléculas inhibitoras de *BCL6* y su uso prometedor en terapia antitumoral.

2. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS B. CENTRO GERMINAL

La diferenciación normal de las células B se produce en la médula ósea a partir de un precursor B conocido como progenitor de células B o linfoblasto B. El precursor B sufre reordenamiento del gen VDJ, diferenciándose hasta dar lugar a la célula B madura que expresa inmunoglobulina IgM e IgD en su superficie. Esta fase de la diferenciación es independiente de antígeno y tiene lugar en la médula ósea (Jaffe et al, 2008) (Huang & Melnick, 2015).

Los linfocitos B naïve abandonan la médula ósea y circulan por la sangre periférica hacia los nódulos linfáticos, comenzando la fase de diferenciación linfoide dependiente de antígeno (Figura 1). Si se encuentran con un antígeno T dependiente que se une a su receptor Ig de superficie en las áreas extrafoliculares del nódulo linfático, las células B naïve pueden madurar directamente en células plasmáticas extrafoliculares que producen la respuesta temprana mediada por IgM contra un antígeno. Más frecuentemente los linfocitos B naïve migran al límite entre los folículos y la zona de células T o zona interfolicular, donde pasan por unas fases de transformación y proliferación conformando el centro germinal (Jaffe et al, 2008) (Huang & Melnick, 2015) (Hatzi & Melnick, 2014).

Los centroblastos del centro germinal expresan la proteína BCL6, un factor de transcripción nuclear que también es expresado por los centrocitos (Jaffe et al, 2008).

El centro germinal es una estructura dinámica dentro del nódulo linfático que está compuesto por dos estructuras bien diferenciadas histológicamente y con microambientes diferentes: la zona oscura y la zona clara (Huang & Melnick, 2015), donde se producen la *hipermutación somática* y el *cambio de clase* respectivamente, dos procesos moleculares que son exclusivos de las células B (Figura 1)

- Zona oscura del centro germinal: contiene los centroblastos. Aquí se produce la expansión clonal y la hipermutación somática de la región variable de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas para generar clones de alta afinidad para un amplio rango de antígenos (Jaffe et al, 2008). Tras finalizar el proceso migran a la zona clara.
- Zona clara: contiene los centrocitos. Aquí se producen tres procesos diferentes
 - Selección positiva de células B que expresan inmunoglobulinas de alta afinidad
 - Proceso de recombinación y cambio de clase para producir diferentes tipos de inmunoglobulinas, aumentando su variedad y produciendo Ig asociadas a diferentes funciones biológicas.
 - Inicio de la diferenciación en células plasmáticas. Algunas células pueden volver a la zona oscura para volver a sufrir todo el proceso, lo que suele ocurrir cuando el anticuerpo generado no tiene la suficiente afinidad por el antígeno (Huang & Melnick, 2015).

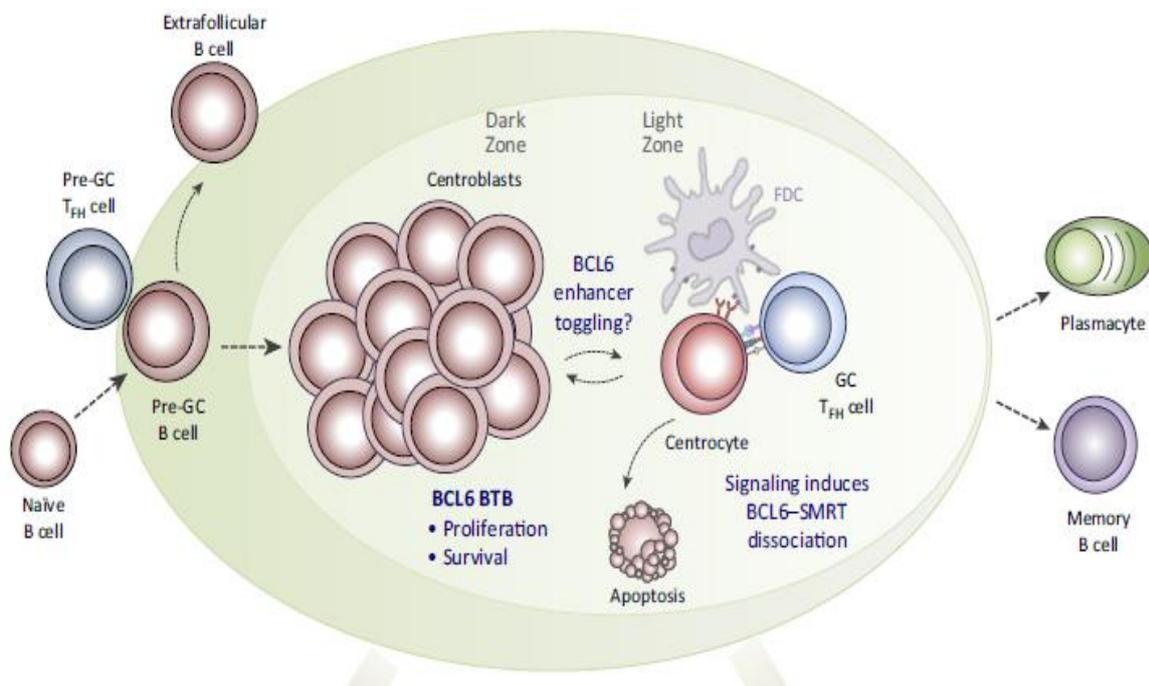


Figura 1. Esquema del centro germinal. El centro germinal se forma en los órganos linfoides secundarios, por las células B activadas. En la médula ósea se produce la fase de maduración independiente del antígeno que culmina con la presentación en la superficie del linfocito B naïve del receptor de la IGH todavía inmaduro y con poca afinidad por los antígenos. Después de interactuar con células T en las regiones interfoliculares, las células B activadas aumentan la expresión de *BCL6* y entran en los folículos, donde proliferan rápidamente mientras sufren hipermutación somática. Estas células se llaman centroblastos y se localizan en la zona oscura de la CG. Luego se diferencian en centrocitos y migran a la zona clara del CG donde se examina la afinidad de sus receptores de Ig con ayuda de células T_{FH} del CG y células dendríticas foliculares (FDC). Los centrocitos con BCR de alta afinidad se seleccionan para su diferenciación en plasmocitos o células B de memoria, pero aquellos con baja afinidad mueren por apoptosis (Hatzl & Melnick 2014).

En ambos procesos (hipermutación somática y el cambio de clase) está involucrada la enzima deaminasa de citosina inducida por activación (AICD). En las células B de los ganglios linfáticos, las mutaciones originadas por AID originan la diversidad de anticuerpos, sin embargo, dado que induce mutaciones aleatorias, el mismo proceso puede potencialmente dar origen a linfomas B, siendo especialmente susceptibles aquellos genes que están transcripcionalmente activos en las células B y contienen secuencias susceptibles de hipermutación somática (Ci et al, 2008).

Para que el proceso de hipermutación somática pueda tener lugar, *BCL6* induce en las células B un estado de aceptación de inestabilidad genómica, evitando que se desencadenen mecanismos de protección y de reparación, facilitando que se produzcan las mutaciones patológicas que derivan en tumores, como se detallara más adelante. Por esta razón, la mayoría de las neoplasias de células B derivan de las células del centro germinal (Ci et al, 2008).

3. ESTRUCTURA, EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE BCL6

3.1. Gen y proteína BCL6:

El gen *BCL6* se localiza en el cromosoma 3q27, comprende unas 24 Kb y está compuesto por 10 exones. El sitio de iniciación de la traducción (ATG), se localiza en el exón 3. Se han localizado dos regiones de autorregulación negativa en el exón 1 e intrón 1. La zona que se extiende unas 2Kb desde el sitio de iniciación de la transcripción (TSS) es una importante región reguladora frecuentemente alterada o reordenada en linfomas (ver apartado 5).

El gen *BCL6* codifica una proteína de 95 kDa (Figura 2). La proteína de BCL6 es miembro de la familia de los factores de transcripción de BTB/POZ/dedos de zinc (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Batlle-López, 2010), que se caracteriza por una región N terminal con un dominio BTB/POZ. Las proteínas BTB-ZF funcionan como dímeros, el dominio BTB es fundamental para su dimerización y también para la represión de la actividad transcripcional de BCL6. Para que BCL6 lleve a cabo sus actividades de represión transcripcional, tiene que reclutar complejos histona deacetilasa (HDAC) de clase I y II, directamente o a través de complejos co-represores. A través del dominio BTB, BCL6 se une a varios complejos co-represores (NCOR, SMRT, BCOR) responsables de inhibir la transcripción cuando se unen a los promotores de sus dianas (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Huang & Melnick, 2015).

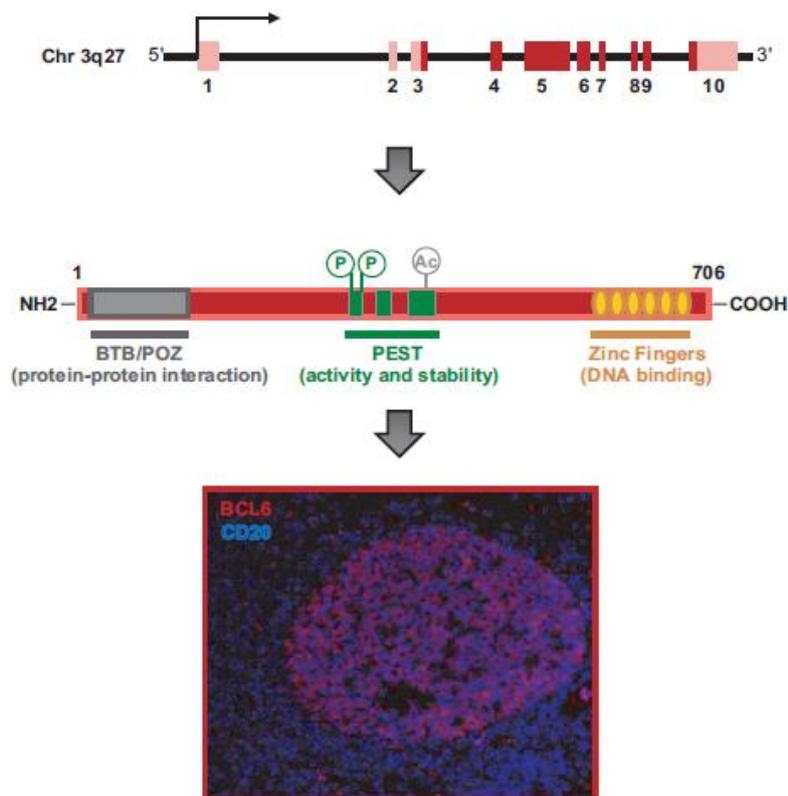


Figura 2. BCL6: gen, proteína y expresión. Arriba se representa el gen *BCL6*. Las secuencias de exones no-codificantes y codificantes están en rojo claro y oscuro respectivamente. En el centro se representa la proteína de BCL6. Se indican los tres principales dominios funcionales (BTB/POZ, PEST y dedos de zinc). Por último, imagen de inmunofluorescencia del centro germinal de una célula de amígdala humana, BCL6 (rojo), CD20 (azul) (Basso & Dalla-Favera, 2012)

El dominio C terminal contiene seis dedos de zinc que son los encargados de unirse directamente al ADN y reconocer secuencias reguladoras específicas (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Batlle-López, 2010). La región central de la proteína de *BCL6* incluye tres dominios PEST, está involucrada en regular la estabilidad y actividad de la proteína y se une al co-represor MTA3 (Figura 2).

3.2. Expresión de BCL6

BCL6 es un represor de transcripción necesario para las células B maduras durante la reacción en el centro germinal, expresándose exclusivamente en esta fase de la diferenciación. Donde primero se detecta la proteína BCL6 es en la zona interfolicular en un pequeño grupo de células B activadas por unión a un antígeno y que siguen la ruta del centro germinal. BCL6 se expresa en centroblastos y en algunos centrocitos, mientras que no se expresa en las células B naive ni en las células plasmáticas y células B memoria (Jaffe et al, 2008) (Wagner et al, 2011) (Huang & Melnick, 2015).

La expresión de BCL6 en ratones de manera constitutiva induce la formación de linfoma difuso de células B grandes y la supervivencia de las células del linfoma depende de su presencia (Ci et al, 2008).

3.3. Regulación de la expresión de BCL6

La expresión de BCL6 está altamente regulada. Los mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales son muy importantes para la regulación de la expresión del ARNm de BCL6 y la estabilidad de la proteína en linfocitos normales (Bunting & Melnick, 2013) (Figura 3).

El hecho de que la expresión proteica de BCL6 esté restringida a las células B del centro germinal indica que está sometida a una regulación muy estricta durante la reacción en el centro germinal. Tanto el ARNm de BCL6 como su proteína están regulados de manera positiva durante la activación de las células B (Hatzi & Melnick, 2014) (Basso & Dalla-Favera, 2010).

Mecanismos transcripcionales de regulación

BCL6 es crucial en los acontecimientos pre centro germinal. La regulación positiva de BCL6 parece ser importante para estas células pre centro germinal, de manera que se formen interacciones duraderas con las células Tfh y puedan dirigirse hacia el centro germinal (Huang & Melnick, 2015) (Ci et al, 2008).

La expresión de BCL6 depende de varias vías de señalización, destacando las vías de IRF8, PI3K e IL21-R (Figura 3a) (Bunting & Melnick, 2013) (Huang & Melnick, 2015).

- **IRF8.** La inducción de la expresión de BCL6 durante la activación de las células B está mediado por IRF8, el único factor conocido que se une y directamente induce la expresión de BCL6 en las células B al entrar y durante su transición por el centro germinal.

- **PI3K.** La señalización mediante PI3K facilita la expresión de BCL6 cuando se produce el cambio de clase de las inmunoglobulinas, regulando negativamente los niveles de IRF4, que a su vez regula BCL6.
- **IL21-R.** En el centro germinal la proliferación de las células B requiere receptores para IL-21, así se produce una regulación positiva de BCL6 y se mantiene su expresión.

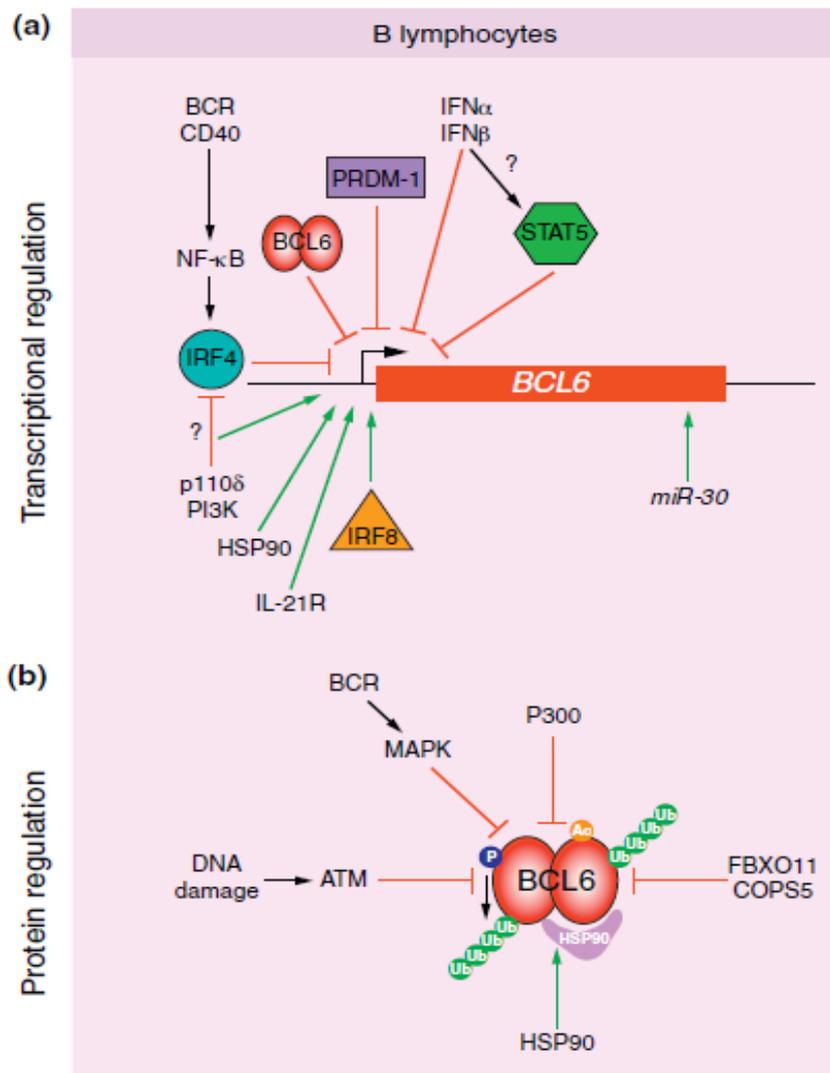


Figura 3. Representación esquemática de los principales mecanismos de regulación transcripcional y postranscripcional de BCL6 en linfocitos B. El esquema a) representa los reguladores transcripcionales de la inducción del gen *BCL6* (flechas verdes) y regulación negativa (barras rojas). El esquema b) representa la regulación postraduccional de la estabilización de proteínas BCL6 (flechas verdes) y degradación (barras rojas) (Bunting & Melnick, 2013).

Cuando la célula B ha completado su maduración por el centro germinal, sufre una regulación negativa de BCL6 y se produce su salida del centro germinal. La regulación negativa está mediada principalmente por factores de transcripción como IRF4 y PRDM1 (BLIMP1) (Bunting & Melnick, 2013). La regulación también está mediada por moléculas de superficie, interferones y el propio BCL6 (Figura 3a).

- **IRF4.** BCL6 e IRF4/MUM1 se expresan de manera recíproca, siendo IRF4/MUM1 positivo en los centrocitos tardíos y las células plasmáticas. IRF4/MUM1 juega un papel muy importante como regulador negativo de la expresión de BCL6 (Jaffe et al, 2008).
A través de la interacción con moléculas de superficie como CD23 y CD40 ligando de las células dendríticas foliculares y los linfocitos T, los centrocitos disminuyen la expresión de la proteína de BCL6 y se diferencian en células B memoria o células plasmáticas. La estimulación del receptor de CD40 en las células B por su ligando, expresado en las células T, produce una regulación negativa de BCL6. Ambos están involucrados en la selección de las células que han adquirido la función de expresar anticuerpos de alta afinidad, que se adquiere en las fases finales de la reacción en el CG. La estimulación por CD40 activa la vía de señalización transcripcional de IRF4 mediado por NF- κ B, que reprime la transcripción de BCL6 (Hatzi & Melnick, 2014) (Basso & Dalla-Favera, 2010).
- **PRDM1 (BLIMP1).** El factor de transcripción PRDM1 (BLIMP1) también regula negativamente la transcripción de BCL6 cuando las células B abandonan el centro germinal (Bunting & Melnick, 2013). PRDM1 es, a su vez, inhibido por BCL6 (apartado 4).
- **IFN- α y el IFN- β .** Los interferones producen de manera directa regulación negativa de los niveles de ARNm de BCL6 en las células B del centro germinal, seguramente a través de STAT5, que es un regulador negativo de BCL6 en células B (Bunting & Melnick, 2013) (Huang & Melnick, 2015).
- **BCL6** puede regular su propia expresión a través de un mecanismo de autorregulación negativa mediante el cual modula su expresión uniéndose a su propio promotor (Basso & Dalla-Favera, 2010).

Regulación epigenética de BCL6

Recientemente se ha descrito la regulación epigenética de BCL6 mediada por el regulador de la cromatina CTCF. Se trata de un regulador multifuncional que induce y mantiene interacciones de la cromatina. CTCF se une al ADN a través de un dominio de 11 dedos de zinc capaces de unirse a varias secuencias (Batlle-Lopez et al, 2015).

La unión de CTCF a la región reguladora del exón 1A de BCL6 en células del centro germinal se asocia a marcas de cromatina activa y contrarresta la autorregulación negativa de BCL6 (Batlle-Lopez et al, 2015). Por otra parte CTCF se une al intrón 1 de BCL6 en células plasmáticas, reprimiendo su expresión (Hatzi & Melnick, 2014). El silenciamiento de CTCF se relaciona con reducción de la expresión de BCL6 en las

células B del centro germinal y aumento de PRDM1 y otros marcadores de células plasmáticas (Batlle-Lopez et al, 2015).

Mecanismos post-transcripcionales

Existen otros mecanismos pos-transcripcionales (Figura 3b) que garantizan el silenciamiento de BCL6 una vez ha terminado la maduración y permiten la diferenciación terminal en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria (Hatzi & Melnick, 2014).

Los mecanismos post-transcripcionales que regula los niveles de la proteína de BCL6 son:

- **Regulación de la estabilidad del ARNm:** La estabilidad del ARNm BCL6 depende de la chaperona AUF1 y HSP90. HSP90 es también responsable de la estabilidad de la proteína de BCL6 y la protege de la degradación, alargando su vida media y la de su ARNm. El aumento de la salida de ARNm de BCL6 del núcleo celular esta mediado por el factor eIF4e (Hatzi & Melnick, 2014) (Bunting & Melnick, 2013).
- **Inactivación funcional de la proteína BCL6 por acetilación mediada por EP300:** Se ha descrito una secuencia (KKYK) incluida en el dominio PEST de BCL6 (ver Figura 2) que puede ser acetilada por EP300 (una enzima con actividad lisina acetil transferasa). La acetilación de BCL6 desencadena su disociación de los complejos co-represores, lo que tiene un efecto negativo sobre la actividad de BCL6 al mismo tiempo que facilita la función de TP53, una de las dianas conocidas de BCL6. Esto sugiere que existe coordinación entre la regulación negativa de BCL6 y la activación de sus dianas moleculares (Basso & Dalla-Favera, 2010).
- **Degradación vía ubiquitin-proteasoma por fosforilación mediada por ATM y MAPK:**
 - La activación del receptor de las células B por la unión al antígeno estimula la señalización de BCR que desencadena la fosforilación de BCL6 a través de MAP quinasa, esto conlleva la degradación de BCL6 por la vía de ubiquitin-proteasoma (Hatzi & Melnick, 2014) (Basso & Dalla-Favera, 2010).
 - Otro mecanismo importante en la regulación de BCL6 es la respuesta al daño del ADN, que produce la degradación de la proteína de BCL6 a través de una vía independiente de la que se activa cuando se estimula el receptor de las células B. Cuando los daños en el ADN se acumulan, se produce la fosforilación de BCL6 por la quinasa ATM, seguido por su interacción con la isomerasa Pin1 y la degradación de BCL6 por el sistema ubiquitin-proteasoma. Este mecanismo sirve para garantizar la degradación de BCL6 cuando el daño al ADN es masivo (Basso & Dalla-Favera, 2010).

- La degradación ubiquitin-dependiente de BCL6 en las células B también está mediada por FBXO11-CUL1 E3 ligasa y la proteína COPS5 (Bunting & Melnick, 2013).

En resumen, la regulación de BCL6 es un complejo proceso coordinado en distintos puntos para asegurar unos niveles adecuados de expresión en las células B y que garanticen una correcta regulación negativa de BCL6 en los estadios finales de la reacción del centro germinal. Esto es fundamental para que el proceso de diferenciación pueda avanzar (Basso & Dalla-Favera, 2010).

4. FUNCIÓN DE BCL6: MECANISMOS DE ACCIÓN Y GENES DIANA

BCL6 habilita y mantiene el fenotipo del centro germinal reprimiendo genes que controlan el ciclo celular, la muerte celular, diferenciación terminal en células plasmáticas y también la respuesta al daño del ADN, proporcionando un ambiente tolerante a las roturas de ADN asociado a los mecanismos de remodelación del gen de la inmunoglobulina, necesarios para producir anticuerpos de alta afinidad contra diferentes isotipos (Ci et al, 2008) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

El bloqueo de la activación y diferenciación prematura de las células B por las células T u otras señales solubles mediante la inhibición de varias rutas involucradas en la activación dependiente de linfocitos T, es importante para prevenir la salida de los centroblastos del centro germinal antes de que completen la fase de expansión proliferativa y de maduración de la afinidad de los anticuerpos (Huang & Melnick, 2015).

4.1. Mecanismos bioquímicos de acción de BCL6

Como ya se ha explicado, BCL6 es un represor transcripcional que reduce la expresión de ARNm de sus genes diana, para lo que se une al ADN como un homodímero. Al formarse el homodímero, se forman dos surcos idénticos y extendidos en los laterales de manera simétrica que forman sitios de acoplamiento para las proteínas co-represoras SMRT, NCOR y BCOR. Estas proteínas a su vez, atraen a las histonas deacetilasas 1 y 2. La homodimerización y reclutamiento de co-represores se realiza a través del dominio N-terminal (BTB/POZ) y una región media no estructurada, a menudo denominada segundo dominio de represión o dominio RD2 (Figura 4). Tanto BTB como RD2 atraen distintos tipos de co-represores y en función de cuál sea el co-represor que se une, se reprimen diferentes dianas (Huang & Melnick, 2015) (Basso & Dalla-Favera, 2012). La deacetilación de histonas conlleva la represión transcripcional de los genes diana de BCL6 (Wagner et al, 2011).

Formación de complejos co-represores

Los co-represores que se unen al dominio BTB tienen como función la regulación de un programa transcripcional asociado a los primeros estadios de la reacción del centro germinal (Huang & Melnick, 2015) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

El dominio BTB lleva a cabo sus funciones de represor transcripcional a través de dos mecanismos simultáneos pero funcionalmente independientes al interactuar con dos tipos de complejos de represión en promotores y “enhancers” (Hatzi & Melnick, 2014) (Cardenas et al, 2017).

- Aunque BCL6 se une a miles de promotores, solo reprime de forma potente el subconjunto donde forma un complejo ternario con reclutamiento simultáneo de BCOR y SMRT/NCOR, que reprime de manera efectiva la transcripción en un ambiente donde la cromatina está reprimida.
La formación del complejo ternario de BCL6 se asocia a marcas epigenéticas en la cromatina que forman “una huella bioquímica de represión por BCL6”. La huella de represión del promotor por BCL6 consiste en depleción de las modificaciones de histonas activadoras y enriquecimiento en marcas de represión como H3K27me3 (histona H3 trimetilada en la lisina 27) y metilación del ADN (Hatzi & Melnick, 2014) (Huang & Melnick, 2015).
- Un segundo mecanismo independiente, implica la regulación de “enhancers” por BCL6, ligados a un conjunto diferente de genes que los regulados por el complejo promotor ternario (Hatzi & Melnick, 2014).
Los “enhancers” tienen dos configuraciones, “active” y “poised”. Los “active enhancers” están asociados con genes transcripcionalmente activos que están marcados con mono/dimetilación de H3K4, y acetilación de H3K27. “Poised enhancers” están marcados con mono/dimetilación de H3K4, pero no acetilación de H3K27 y se asocia con genes reprimidos. BCL6 alterna la configuración de los “enhancers” de la configuración “active” a “poised”. Esta acción se lleva a cabo reclutando el complejo SMRT-HDAC3 para deacetilar H3K27, e impedir la acetilación de H3K27 por EP300. Este mecanismo parece ser esencial para que las células B puedan realizar cambios rápidos en su fenotipo en respuesta a señales ambientales (Hatzi & Melnick, 2014).

El dominio RD2 (región central de BCL6) controla, al menos en parte, la migración de las células B al folículo. Recluta HDAC2 y el complejo MTA3/NuRD y otros posibles co-represores. MTA3 regula las dianas involucradas en la modulación de la diferenciación en células plasmáticas (Huang & Melnick, 2015) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

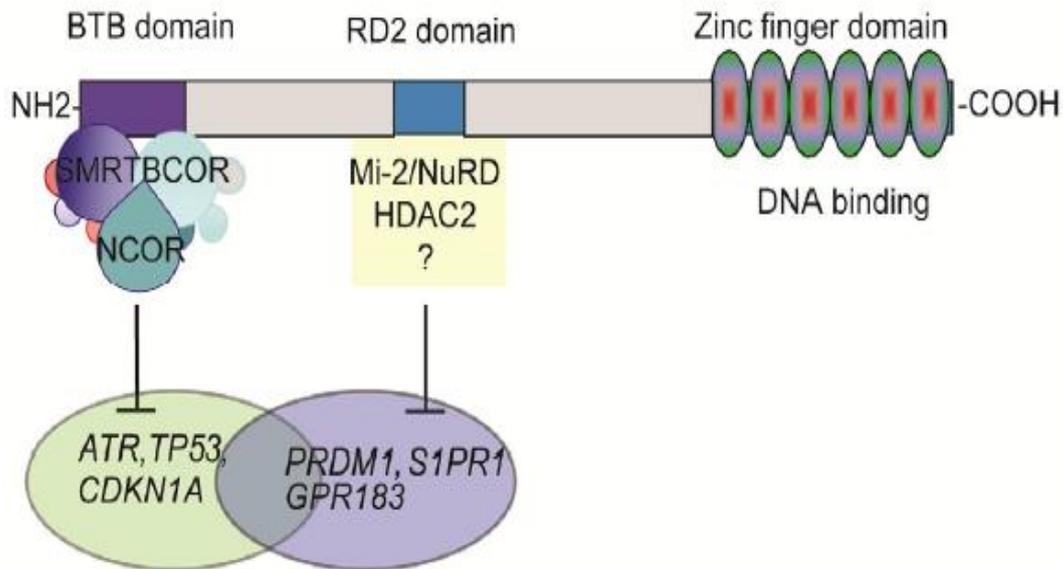


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos clave de acción de BCL6. Este oncogen lleva a cabo sus funciones de represor transcripcional reclutando co-represores, sobre todo a través del dominio BTB Y RD2. Los co-represores que se unen al dominio BTB son NCOR, BCOR y SMRT. A RD2 se unen los complejos HDAC2 y MTA3 (Huang & Melnick, 2015).

La actividad de represión transcripcional de BCL6 necesita en la mayoría de los casos que se una directamente a sitios específicos del ADN a través del dominio C-terminal de dedos de zinc. Es interesante que cerca de los sitios de unión de BCL6 al ADN se hayan encontrado otros sitios que son importantes para la modulación del desarrollo del centro germinal, así como para la unión de competidores de la actividad de BCL6 (Huang & Melnick, 2015) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

4.2. Genes diana y rutas reguladas por BCL6

BCL6 tiene un gran impacto sobre el centro germinal, regulando los genes y las rutas clave implicados en el ciclo celular, la diferenciación a células plasmáticas y la apoptosis, así como en la inflamación (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

El estudio del programa transcripcional fisiológico de BCL6 en las células B del centro germinal normal requiere conocer los sitios de unión de BCL6. Esto ha sido posible gracias a un estudio del año 2010 (Basso et al, 2010) que incluía tres análisis complementarios:

- Bioquímico: ChIP – on – chip (Chromatin Immunoprecipitation followed by microarray), permiten identificar regiones promotoras unidas a BCL6 en las células de los linfomas y en células B normales.
- ARACNe: “reverse-engineering algorithm” que identifica relaciones transcripcionales potentes conservadas en un gran grupo de fenotipos de células B. Se realiza junto a ChIP – on – chip
- GEP (Gene Expression Profiling): que permite identificar las dianas que están fisiológicamente reprimidas en las células B del centro germinal (Basso et al, 2010).

Estos estudios permitieron identificar más de 1200 genes a los que BCL6 se une en su promotor provocando su regulación negativa en condiciones fisiológicas en las células B de los centro germinales, proporcionando una mejor comprensión de las funciones de BCL6 en células B normales (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso et al, 2010). Una característica de BCL6 es el amplio control sobre varias dianas de la misma vía de señalización (Basso & Dalla-Favera, 2010).

Además BCL6 parece relevante en unas vías que antes no se habían tenido en cuenta, modulando la señalización a través de receptores tipo Toll, INF-R, diferentes citoquinas, TGF-R y la señalización de WNT (Figura 5) (Basso & Dalla-Favera, 2010).

Todo ello sugiere que BCL6 no actúa solo como un potente represor, alterando la expresión de sus dianas, sino que también es un modulador de la transcripción que permite controlar la expresión de moléculas esenciales para dos funciones fundamentales del centro germinal: i) BCL6 modula la activación y diferenciación de las células B del centro germinal y ii) controla el daño al ADN y la respuesta apoptótica de las células B del centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

Rutas celulares reguladas por BCL6

1. Activación mediada por células T y señalización por BCR y CD40

La activación de las células B en las fases finales de la reacción del centro germinal es fundamental para la selección de las células B basándose en la afinidad de su receptor Ig y para que las células seleccionadas continúen con la diferenciación. La unión de BCR al antígeno además de señales co-estimuladoras, son necesarias para que señales de supervivencia rescaten de la apoptosis a aquellas células B que expresen anticuerpos de alta afinidad en su superficie. La interacción entre linfocitos B y T se produce entre el receptor CD40 de las células B y su ligando CD154, que se expresa sobre todo en células T CD4+ activadas. La señalización de CD40 es necesaria para tener una buena respuesta inmune.

La señalización mediada por CD40 no se ha demostrado en todas las células del centro germinal, solo en un pequeño grupo de centrocitos en los que la expresión de BCL6 está disminuida. La señalización mediada por CD40 activa

diferentes vías, cuyo resultado es la activación de varios factores de transcripción, incluyendo NF- κ B, NF-AT y AP-1 (Basso & Dalla-Favera, 2010). BCL6 modula varias moléculas involucradas en la señal de transducción de BCR y CD40, desde la superficie hasta el núcleo, como la señalización mediada por Ca^{2+} , y las vías MAPK y NF- κ B. La función de BCL6 es prevenir una progresión y activación precoz de las células B hacia las fases finales de la diferenciación. Así mismo se ha demostrado que las rutas MAPK y NF- κ B regulan a su vez a BCL6, lo que indica que BCL6 modula sus propias señales regulatorias (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

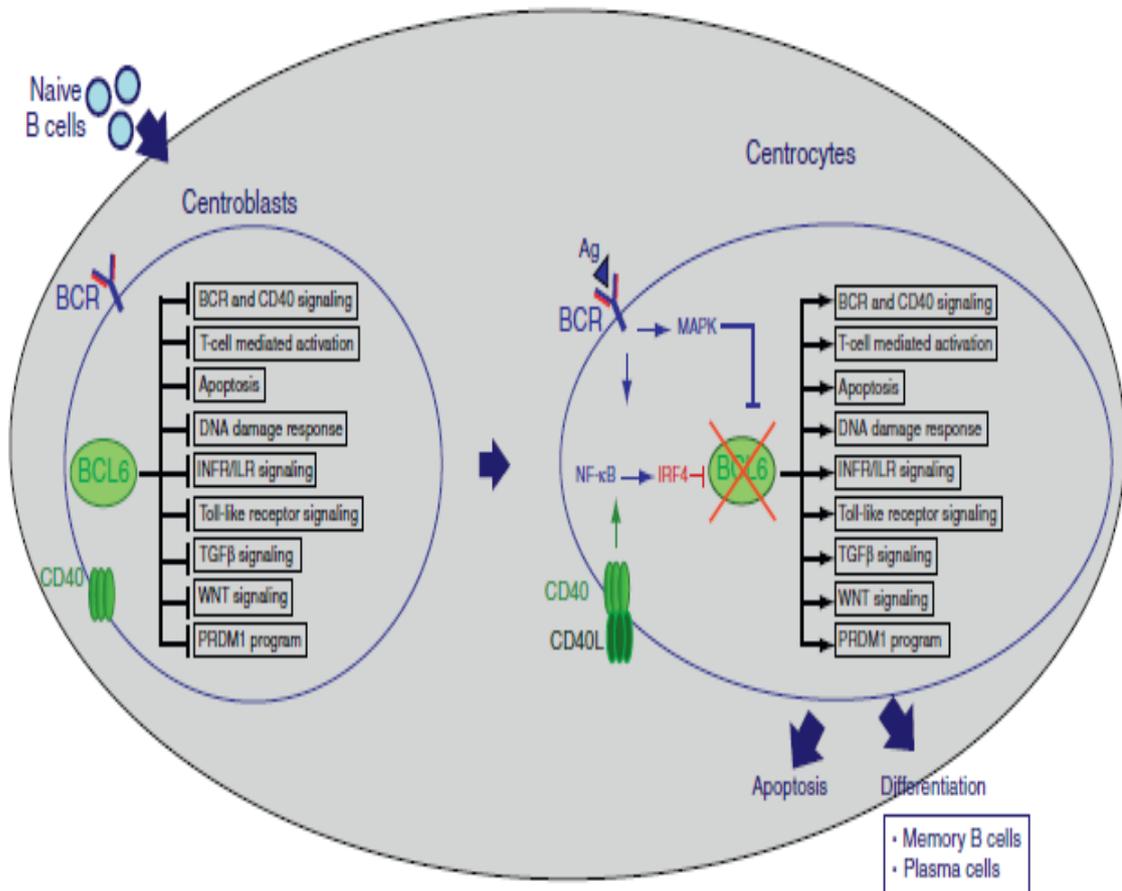


Figura 5. Representación esquemática de las rutas celulares reguladas por BCL6 en las células B del centro germinal. La represión transcripcional por BCL6 en centroblastos cesa en los centrocytes cuando se activan determinadas vías de señalización que conducen a la disminución en la transcripción de BCL6 y la degradación de la proteína (Basso & Dalla-Favera, 2010).

2. Diferenciación a células plasmáticas

La diferenciación terminal define el proceso por el cual las células B del centro germinal se convierten en células plasmáticas y se requieren cambios en la producción de anticuerpos tanto los unidos a la membrana celular como los que son secretados. Este proceso se asocia a pérdida de la capacidad proliferativa (Wagner et al, 2011).

BCL6 reprime varias señales que podrían activar las células B de manera prematura, de manera que se asegura que las células B tienen el tiempo suficiente para pasar por el proceso de hipermutación somática. Aunque los mecanismos que conducen a la diferenciación terminal de las células B no se conocen del todo, sí se sabe que la regulación de los factores de transcripción PRMD1, XBP1 e IRF4 es esencial en este proceso (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

BCL6 reprime la transcripción de los genes de PRMD1 e IRF4, que son los factores de transcripción encargados de regular la salida y diferenciación terminal de las células B de los centro germinales en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Wagner et al, 2011) (Hatzi & Melnick, 2014).

PRDM1 (BLIMP1) es un factor de transcripción, reprimido directamente por BCL6 a través del co-represor MTA3 y necesario para el fenotipo de secreción de las células plasmáticas que actúa por encima de XBP1. Se expresa en un grupo de células B del centro germinal tardías que no expresan BCL6, y células plasmáticas (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Wagner et al, 2011). PRMD1 también es un supresor tumoral que está silenciado o mutado en casi el 25% de los ABC-DLBCL, por lo que su supresión es un mecanismo que también conduce a la aparición de linfomas, al bloquearse la diferenciación de las células B (Hatzi & Melnick, 2014).

IRF4 es un factor de transcripción expresado en un subconjunto de centrocitos en el centro germinal y en las células plasmáticas, necesario para producir las mismas. Se cree que IRF4 actúa por encima o al mismo tiempo que PRDM1 para la generación de células plasmáticas (Basso & Dalla-Favera, 2010).

La conclusión es que una expresión elevada de BCL6 implica una capacidad proliferativa alta porque bloquea la diferenciación de las células B post centro germinal. Si BCL6 disminuye y aumenta PRMD1, se produce la diferenciación en células efectoras y su salida del centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

3. Respuesta a daño al DNA

La alteración de las rutas que controlan el daño al ADN contribuye a la función normal de las células B, permitiendo que se produzca la hipermutación somática, pero provoca que se vuelvan resistentes al daño del ADN y a la apoptosis, pudiendo degenerar en neoplasias malignas si el proceso se descontrola (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Hatzi & Melnick, 2014).

La aplicación de la tecnología ChIP-on-chip de todo el genoma en asociación con GEP ha puesto en evidencia el papel de BCL6 como modulador de la detección y ejecución de respuestas ante el daño al ADN, gracias a la identificación de un gran conjunto de genes diana de BCL6 implicados en esta vía (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Ranuncolo et al, 2008). Entre los genes reprimidos por BCL6 están: ATR, CHEK1, TP53 y CDKN1A. BCL6 también se une y reprime otros supresores tumorales como CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, PTEN y otros (Hatzi & Melnick, 2014).

Estudios de ganancia y pérdida de función en células B primarias humanas y líneas de células de DLBCL, demostraron que BCL6 impide la fosforilación de la histona 2AX y la reparación de la rotura de la doble hebra tras la exposición a agentes que dañaban el ADN. Esto se debía en parte a la represión directa de la transcripción de ATR mediada por BCL6, poniendo en evidencia su papel protegiendo las células de las apoptosis tras el daño del ADN (Ci et al, 2008) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

BCL6 reprime los genes clave de los puntos de control que siguen a ATR en la cascada (CHEK1, TP53 y CDKN1A). La expresión mantenida de BCL6 disminuye la acción de estos sensores del daño del ADN, jugando así un papel fundamental en la linfomagénesis (Ci et al, 2008) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

Mediante experimentos de ChIP-on-chip se pudo determinar con más precisión el sitio de unión de BCL6 a CHEK1. CHEK1 es una tirosina quinasa, que se activa por fosforilación de la serina 345 por ATR, involucrada en la vía de reparación del daño al ADN y que involucra la activación de TP53 y sus dianas en la cascada. La depleción de BCL6 en las células B del CG primario induce un aumento en los niveles de proteína de CHEK1 (Ranuncolo et al, 2008).

Disminuyendo la actividad de CHEK1, BCL6 no permite una completa activación de TP53 y facilita la progresión del ciclo celular a través de la fase S y G2/M. BCL6 también reprime TP53 de forma directa (Ranuncolo et al, 2008) (Basso & Dalla-Favera, 2010).

4. Apoptosis y proliferación

Las funciones de pro supervivencia y proliferación de BCL6 son potencialmente peligrosas. Así, aunque estas acciones son esenciales para permitir mutagénesis y maduración de las inmunoglobulinas, también hace a las células B del centro germinal propensas a la transformación maligna (Hatzi & Melnick, 2014).

Sin embargo, las células B del centro germinal tienen un perfil transcripcional que se caracteriza por la regulación negativa de varios genes anti apoptóticos y la regulación positiva de genes pro apoptóticos, dando como resultado una alta susceptibilidad para la apoptosis mostrada por las células B. El mantenimiento del fenotipo pro apoptótico garantiza que las células B del centro germinal serán eliminadas por apoptosis si presentan múltiples daños del ADN (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

BCL6 puede compensar su potencial oncogénico al silenciar genes supresores de tumores mediante su unión y represión de un gran conjunto de genes, que pueden contribuir a la aparición de tumores cuando se desregulan en las células B del centro germinal normal, incluyendo *BCL2*, *c-MYC*, *CCND1* y *BMI1*. Es plausible que la represión BCL6 de estos genes haya evolucionado como un mecanismo para contrarrestar su potencial para generar tumores en las células B de los centros germinales. (Hatzl & Melnick, 2014) (Basso & Dalla-Favera, 2012)

BCL2 es un gen involucrado en suprimir las vías intrínsecas de la apoptosis y es un gen diana directo de BCL6. BCL2 es silenciado normalmente por BCL6, que coopera con el factor de transcripción MIZ1 para reprimir este locus. Sin embargo las traslocaciones cromosómicas y las mutaciones del promotor de BCL6 en los linfomas (ver apartado 5) permiten que BCL2 escape a la represión de BCL6 (Hatzl & Melnick, 2014) (Basso & Dalla-Favera, 2010). Además BCL2 está traslocado frecuentemente en FL y DLBCL.

BCL6 inhibe *MYC* después de las primeras divisiones celulares que siguen a la activación de las células B. Tras la hipermutación somática, las células B de los centros germinales migran hacia las zonas claras para ser seleccionadas a través de su interacción con los linfocitos T helper y las células dendríticas foliculares. En este momento se deja de reprimir *MYC* para facilitar que un grupo de células B vuelvan a la zona oscura para seguir madurando (Hatzl & Melnick, 2014).

Estos hallazgos sugieren que BCL6 puede prevenir la detención del ciclo y las respuestas apoptóticas en las células B del centro germinal para permitir que se produzcan los procesos de remodelación del ADN sin que se inicien respuestas ante el daño del ADN (Basso & Dalla-Favera, 2010).

5. Señalización por IFN/IL

Las dianas directas de BCL6 incluyen varios genes que apuntan a varias vías de señalización que pueden tener un papel en la activación y diferenciación de células B del centro germinal. Varias rutas involucradas en la respuesta a quimiocinas y citoquinas están moduladas por BCL6, en particular varios receptores de interleukinas y tipo interferón que conducen a la activación de JAK/STAT. Además, miembros de la familia STAT están reprimidos directamente por BCL6.

Estas rutas juegan un papel en la en la diferenciación de las células plasmáticas, el déficit de STAT3 produce un defecto en la producción de células plasmáticas productoras de IgG (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

6. Señalización por receptores Toll-like

La ruta de los receptores tipo Toll tiene un papel en la respuesta inmune dependiente de linfocitos T y en el desarrollo de las células B de memoria (Basso & Dalla-Favera, 2012).

Una actividad moduladora en la vía del receptor tipo Toll ha sido sugerida por la presencia entre los genes diana de BCL6 de aquellos que codifican receptores tipo toll y transductores de las señales que se derivan de estos receptores. Estos hallazgos sugieren que su silenciamiento por BCL6 también puede ser necesario para estímulos activadores durante la fase proliferativa de la reacción en el centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2010).

7. Señalización por TGF β

TGF tipo β es un factor de crecimiento que promueve la diferenciación de las células plasmáticas secretoras de IgA y atenúa la respuesta de las células B ante antígenos de baja afinidad (Basso & Dalla-Favera, 2012).

BCL6 tiene una acción moduladora sobre la capacidad de TGF- β para regular la diferenciación post-centro germinal actuando sobre los genes que codifican receptores de tipo TGF β , un ligando (BMP2), y los efectores nucleares (Basso & Dalla-Favera, 2010) (Basso & Dalla-Favera, 2012).

8. WNT

La vía de señalización WNT también parece estar afectada por BCL6 a través del control de genes que codifican sus receptores, transductores de señal, y factores de transcripción de la vía de señalización. La señalización por WNT interviene en los últimos estadios de la diferenciación de las células, por lo que esta vía está silenciada por BCL6 en la primera etapa de la reacción en el centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2010).

5. DESREGULACIÓN DE BCL6 EN LINFOMAS

5.1. BCL6 y linfomagénesis

La expresión desregulada de BCL6 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del fenotipo proliferativo y la supervivencia de los linfomas de células B que surgen del centro germinal. Como se ha descrito en el apartado anterior, BCL6 juega un papel clave en la modulación de genes implicados en la detección y respuesta al daño del ADN, por lo que BCL6 puede contribuir a la linfomagénesis al inducir tolerancia al daño del ADN, favoreciendo así la acumulación de mutaciones oncogénicas adicionales. Otro mecanismo por el que BCL6 favorece la aparición de tumores es bloqueando la diferenciación terminal (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Bunting & Melnick, 2013) (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

En consecuencia, la mayoría de los linfomas de células B surgen de células B del centro germinal y expresan BCL6 constitutivamente, como se documenta más claramente en el caso de linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) con fenotipo GCB y linfomas foliculares (FL) (Hatzi & Melnick, 2014) (Bunting & Melnick, 2013).

En la Figura 6 (Cortiguera, 2017) se muestra un esquema de los diferentes tipos de linfomas B según su sitio de origen.

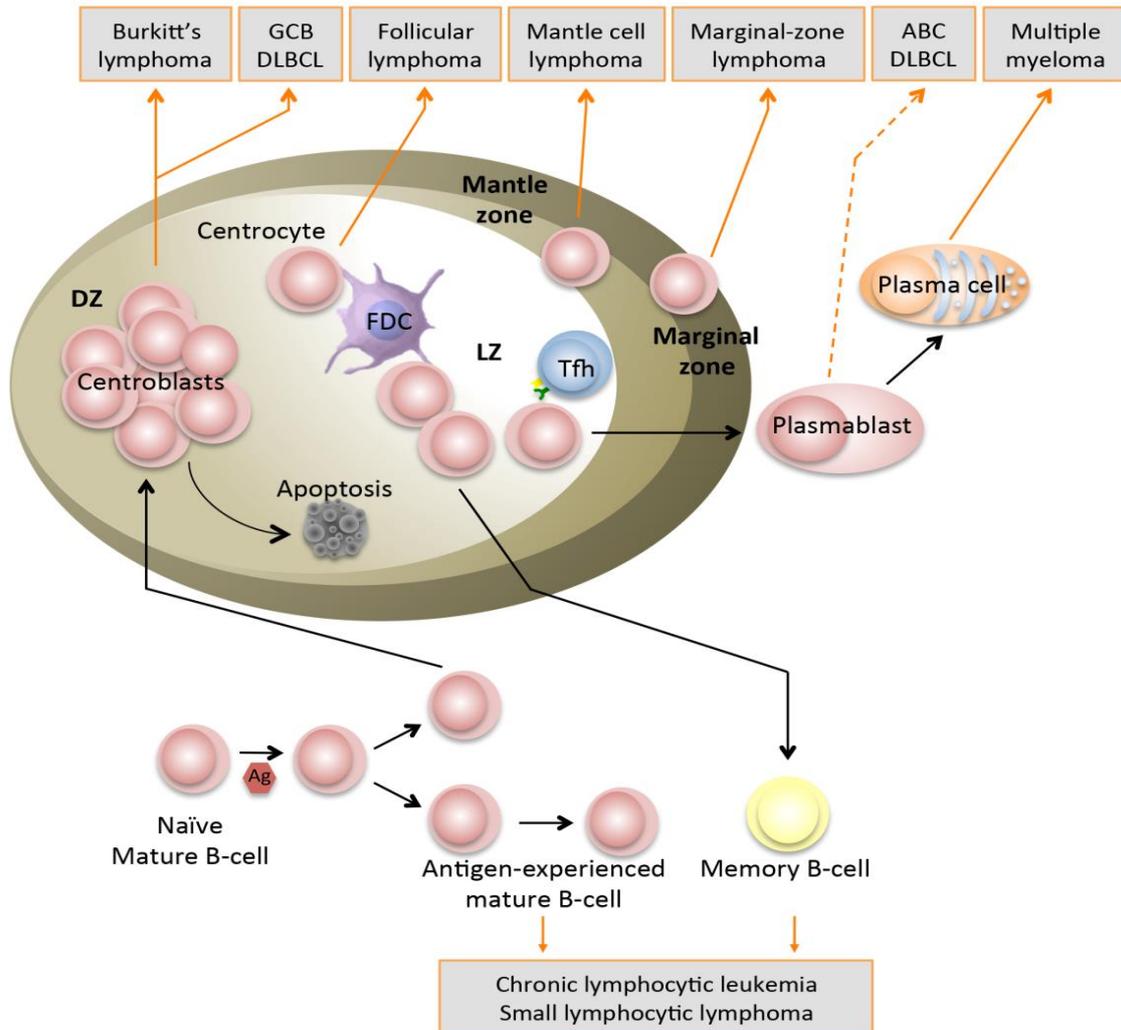


Figura 6. Esquema de los diferentes linfomas de células B y sus zonas de origen. Las flechas naranjas señalan el tipo de linfoma y su célula de origen. (Cortiguera, 2017)

Basándonos en la clasificación de los linfomas de la WHO recientemente actualizada (Swerdlow et al, 2016), se resumen a continuación las características más importantes de los linfomas B donde BCL6 se encuentra desregulado.

Linfomas difusos de células B grandes (DLBCL)

Estudios morfológicos, biológicos y clínicos han subdividido los DLBCL en variantes morfológicas, subgrupos moleculares e inmunofenotípicos y variantes patológicas distintas. Los estudios de expresión génica separaron los casos de DLBCL en base a la “célula de origen” (COO) en dos grupos: GCB-like que tiene un perfil de expresión como el de las células B del CG, y ABC-like, cuyo perfil de expresión es como el de las células B periféricas activadas. Cada uno se asocia con diferentes alteraciones cromosómicas. La variante centrogerminal se caracteriza por la expresión de BCL6 y se asocia con un buen pronóstico, frente a la variante ABC que característicamente no expresa BCL6 y son más agresivos (Swerdlow et al, 2016).

Los estudios de expresión génica mostraron que aunque la expresión y actividad BCL6 se asocia generalmente con el tipo GCB de DLBCL, las traslocaciones que afectan al locus BCL6 y determinan su expresión constitutiva ocurren más frecuentemente en el subtipo ABC (24% de las células B activadas (ABC) DLBCL en comparación con el 10% de los casos de GCB-like). Esto sugiere una supresión de la disminución de expresión de BCL6, que ocurre normalmente en las últimas etapas de la reacción del centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Bunting & Melnick, 2013) (Wagner et al, 2011).

Más de un 30% de los DLBCL presentan alteraciones en la región 3q27 que involucra al gen de BCL6 (ver Figura 7A), constituyendo una de las traslocaciones más prevalentes en el DLBCL.

Aunque la clasificación de “COO” proporciona una descripción de un subconjunto de DLBCL, no recoge toda la heterogeneidad biológica de la enfermedad. Un estudio independiente basado en perfiles de expresión génica (GEP) identificó tres subtipos biológicos DLBCL no relacionados con la célula de origen, sino asociados con: i) B cell receptor/proliferation (BCR). BCL6 es un factor de transcripción del grupo BCR; ii) El microambiente tumoral; iii) La respuesta inflamatoria del huésped. Los tres son los rasgos que se usaron para definir los DLBCL (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Wagner et al, 2011).

Linfoma folicular (FL)

BCL6 también aparece expresado en otros linfomas de origen centrogerminal como los linfomas foliculares, neoplasias linfoides compuestas por células B del CG (típicamente tanto centrocitos como centroblastos), que normalmente tienen un patrón folicular, al menos parcialmente. Son normalmente BCL6 positivos.

El FL se clasifica en 3 grados diferentes en función de la proporción de centroblastos. Una serie de estudios sugiere que la separación en función de la histología puede predecir el resultado clínico, siendo los casos con mayor número de células grandes los que se comportan de manera más agresiva y los que tienen más probabilidades de progresar a un DLBCL (Swerdlow et al, 2016). La alteración de 3q27 y/o reorganización de BCL6 se encuentra en un 5-10% de los FL, sobre todo los de grado 3B. El grado 3B asociado a DLBCL tiene una frecuencia de reordenamiento de BCL6 similar a la encontrada en DLBCL.

Recientemente se ha incluido una nueva variante de linfoma agresivo con origen generalmente centrogerminal, los linfomas doble/triple hit, que presentan reordenamiento de *MYC*, *BCL2* y aunque menos frecuentemente presentan también reordenamiento de *BCL6*. Estos casos tienen un índice de proliferación alto (>90% Ki67+) (Swerdlow et al, 2016).

5.2. Alteraciones en la regulación de BCL6

La pérdida de control de la expresión de BCL6 deriva en la transformación maligna de las células B

Tal como se ha descrito anteriormente, la expresión y la transcripción de *BCL6* está bajo un control muy estricto durante la reacción en el CG. Por una parte, durante la activación de las células B aumenta tanto el ARNm de *BCL6* como su proteína. Algunas de las vías y factores que inducen *BCL6* son la señalización mediante *IL21R*, *IRF8*, *STAT5B*. Por otra parte, la estabilidad del ARNm de *BCL6* está regulada por *AUF1* y las chaperonas del ARNm *HSP90*. La exportación del ARNm de *BCL6* del núcleo celular está aumentada por *eIF4e*. (Hatzi & Melnick 2014)

Existen otros mecanismos que aseguran que *BCL6* es silenciado una vez que la maduración por afinidad se ha alcanzado, de manera que las células B pueden continuar la diferenciación terminal hacia células B memoria y células secretoras de anticuerpos. El fallo en los mecanismos de supresión de *BCL6* es la causa subyacente de la transformación maligna de las células B. (Hatzi & Melnick, 2014)

Mecanismos de desregulación de BCL6

Una variedad de mecanismos convergen para alterar la expresión y actividad de *BCL6* en linfomas (Figuras 7 y 8). La expresión constitutiva de *BCL6* puede ser provocada por translocaciones o interrupciones cromosómicas de regiones reguladoras dentro del gen *BCL6*. La expresión de *BCL6* es una característica casi invariable de DLBCL, BL y FL, presumiblemente porque refleja su origen en el CG. En estos linfomas el mantenimiento del programa de expresión génica mediada por *BCL6* parece contribuir a mantener un fenotipo proliferativo (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

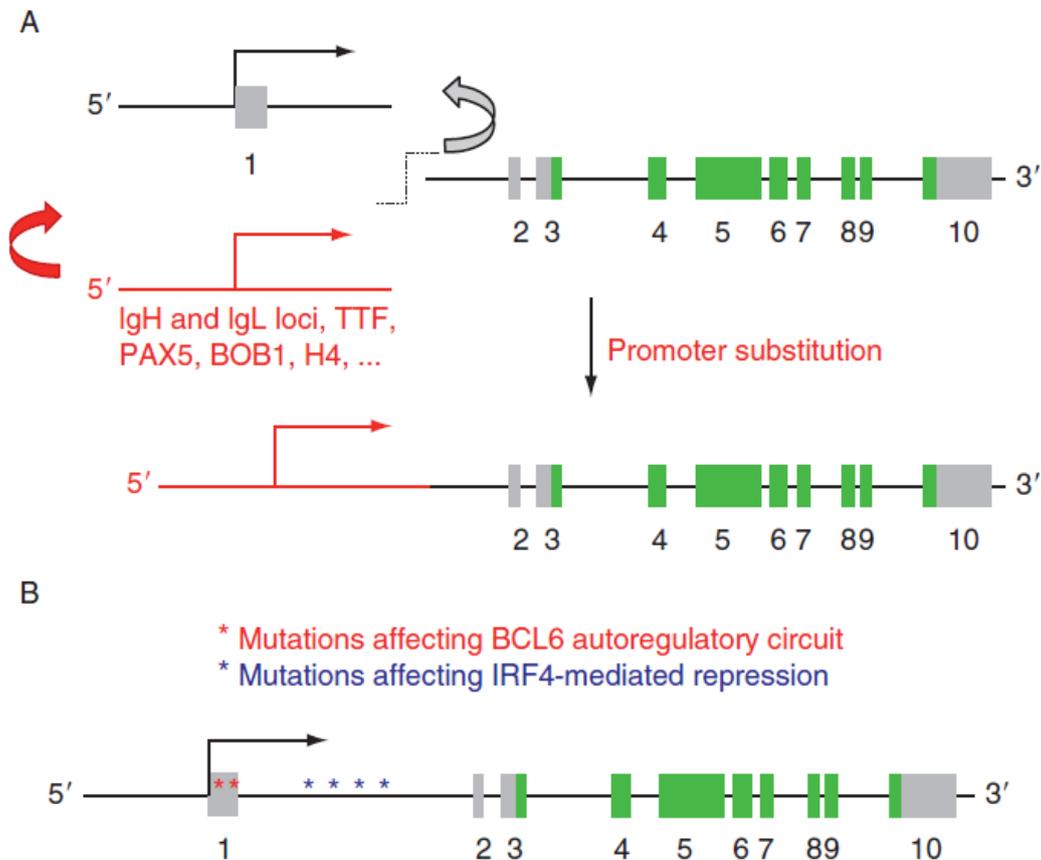


Figura 7. BCL6 es diana de alteraciones genéticas que se asocian con la aparición de linfomas. (A) Se producen traslocaciones que sustituyen la región reguladora 5' por promotores heterólogos (sustitución del promotor). (B) El circuito de autorregulación negativa de BCL6 y la represión mediada por IRF4 están impedidas por mutaciones somáticas (Basso & Dalla-Favera, 2010).

BCL6 fue identificado como la diana de traslocaciones cromosómicas que afectan al cromosoma 3q27 en DLBCL (Ye et al., 1993). En el locus de BCL6 se producen traslocaciones cromosómicas que colocan intacta la secuencia codificante de la proteína de BCL6 bajo el control de regiones reguladoras heterólogas (Figura 7A) (Basso & Dalla-Favera, 2015). El locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH) es el que se altera con más frecuencia, así como los promotores de una variedad de genes que se caracterizan por un amplio rango de expresión a lo largo del desarrollo de células B, incluyendo los estadios post centro germinal. En estos casos los mecanismos reguladores se pierden y BCL6 se expresa principalmente a partir del alelo reordenado (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

Los reordenamientos que conducen a la expresión alterada de BCL6 se detectaron en aproximadamente el 40% de los DLBCL y 15% de los FL. Como consecuencia de las traslocaciones cromosómicas que afectan al cromosoma 3q27, los promotores heterólogos derivados de otros cromosomas se yuxtaponen al extremo 5' del gen BCL6, un mecanismo conocido como sustitución del promotor, que impide la regulación negativa de la expresión de BCL6 que está asociada con la diferenciación post centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

Una característica común de los promotores es su actividad constitutiva en el linaje de células B, y en particular su actividad persistente en células post centro germinal, como inmunoblastos y células plasmáticas. Por lo tanto, estas traslocaciones cromosómicas causan desregulación de la expresión de BCL6 impidiendo la disminución fisiológica en células B post centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2012).

La relación entre la desregulación BCL6 y su actividad oncogénica se demostró de forma concluyente en modelos de ratón con un locus de BCL6 reordenado, imitando una translocación encontrada en los linfomas humanos. Estos ratones con expresión de BCL6 alterada desarrollaban linfomas con muchas de las características de los DLBCL de los humanos, incluyendo un patrón histológico difuso, inmunofenotipo de célula B madura, y genes Ig hipermutados que indican que se originan de células del centro germinal o post centro germinal (Basso & Dalla-Favera, 2012).

La traslocación cromosómica no tiene en cuenta todos los casos de sobreexpresión de BCL6, ¿qué otros mecanismos pueden estar actuando para producir este efecto?

En los DLBCL, la desregulación de BCL6 se logra también mediante un mecanismo diferente asociado con el proceso de hipermutación somática, normalmente dirigido a la región reguladora 5' de BCL6. La hipermutación somática ocurre en condiciones normales en las células B para diversificar la respuesta de los anticuerpos. BCL6 fue el primer objetivo no Ig descrito como afectado por hipermutación somática en células B normales del centro germinal. Otros estudios identificaron un subconjunto de DLBCL (aproximadamente el 14% de los casos) que presentaban mutaciones en la región reguladora 5' de BCL6 que interrumpen el circuito de autorregulación negativa o impiden la represión mediada por IRF4 (figura 7B). Mutaciones similares se encontraron en varios linfomas no Hodgkin (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Wagner et al, 2011). Los experimentos en ratones sugirieron que el locus de BCL6 muta con más facilidad que los loci de TP53 o MYC. Una posibilidad es que las mutaciones que ocurren en el sitio 5' UTR de BCL6 podría tener un papel fisiológico, pero podría también conducir a un fracaso del mecanismo de autorregulación y contribuir a la expresión constitutiva de BCL6 (Wagner et al, 2011).

En ratones con rotura homocigótica del locus BCL6, que no producen la proteína BCL6, se encontró expresión aumentada de ARNm de BCL6, y se demostró que era debido a la presencia de un sitio autorregulatorio en el primer exón del gen. La unión de la proteína BCL6 a este sitio redujo la transcripción BCL6. Alrededor del 15% de

DLBCL tiene mutaciones en la secuencia autorregulatoria y esto es, por lo tanto, una vía alternativa de la expresión constitutiva de BCL6 (Wagner et al, 2011).

Mecanismos indirectos de desregulación a nivel transcripcional y postranscripcional

La adquisición de aberraciones genéticas que afectan el locus de BCL6 no es el único mecanismo utilizado por las células B para alterar la regulación de la expresión de BCL6. La desregulación indirecta de la expresión de BCL6 puede lograrse también por mutaciones somáticas de los genes que codifican los reguladores implicados en la regulación transcripcional o post-transcripcional de BCL6. Así se facilitan o mantienen las funciones de BCL6 en los linfomas (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Bunting & Melnick, 2013). La mutación de *BCL6*, al igual que el estado mutacional de las IG, sirve como marcador de las células que han pasado por el centro germinal (Jaffe et al, 2008). Estos mecanismos se resumen a continuación y se muestran en la Figura 8.

- Los elementos de respuesta a IRF4 en el gen BCL6 median la represión de la expresión de BCL6. Interrupciones o mutaciones de estas secuencias son un mecanismo adicional que llevan a la expresión constitutiva de BCL6 (Wagner et al, 2011) (Basso & Dalla-Favera 2015).
- Mutaciones de ganancia de función en su regulador positivo MEF2B25 resultan en la expresión sostenida de BCL6 en linfomas (Basso & Dalla-Favera 2015).
- Los programas más afectados en los DLBCL, independientemente del subtipo, se alteran a causa de modificaciones epigenéticas debidas a la inactivación genética de las acetiltransferasas EP300 y/o CREBBP (Basso & Dalla-Favera, 2015). Varios estudios han descrito la presencia de deleciones genómicas y/o mutaciones somáticas de pérdida de función en el dominio codificante de la histona acetil transferasa (HAT) de CREBBP y/o EP300, dos miembros de la familia KAT3 de histona/proteína lisina acetiltransferasas. En general, estas alteraciones están presentes en el 40% de los casos DLBCL y FL (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Bunting & Melnick, 2013). CREBBP y EP300 facilitan la transcripción por acetilación de histonas así como de proteínas nucleares no histonas, incluyendo BCL6 y TP53. Estas lesiones suelen ser monoalélicas, mientras que la expresión del segundo alelo queda retenida, lo que conduce a una disminución de la actividad HAT. Estos hallazgos sugieren que CREBBP y EP300 funcionan como genes supresores de tumores haploinsuficientes (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Basso & Dalla-Favera 2015).

Las mutaciones de CREBBP conducen a defectos en la inactivación mediada por acetilación de BCL6. Las mutaciones en EP300 inhiben su actividad de lisina acetil-transferasa y pueden estabilizar BCL6 manteniendo complejos Hsp90-BCL6, así como la reducción de la acetilación de BCL6 (ver apartado 3.3). Esto confirma que la desregulación de BCL6 puede ocurrir indirectamente a través de alteraciones genéticas de sus moduladores (Basso & Dalla-Favera, 2012) (Bunting & Melnick, 2013) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

- La estabilidad BCL6 también puede mantenerse mediante una mutación que inhabilita FBXO11, que reduce la tasa de degradación de BCL6 mediada por ubiquitinas (Bunting & Melnick, 2013) (Basso & Dalla-Favera, 2015).

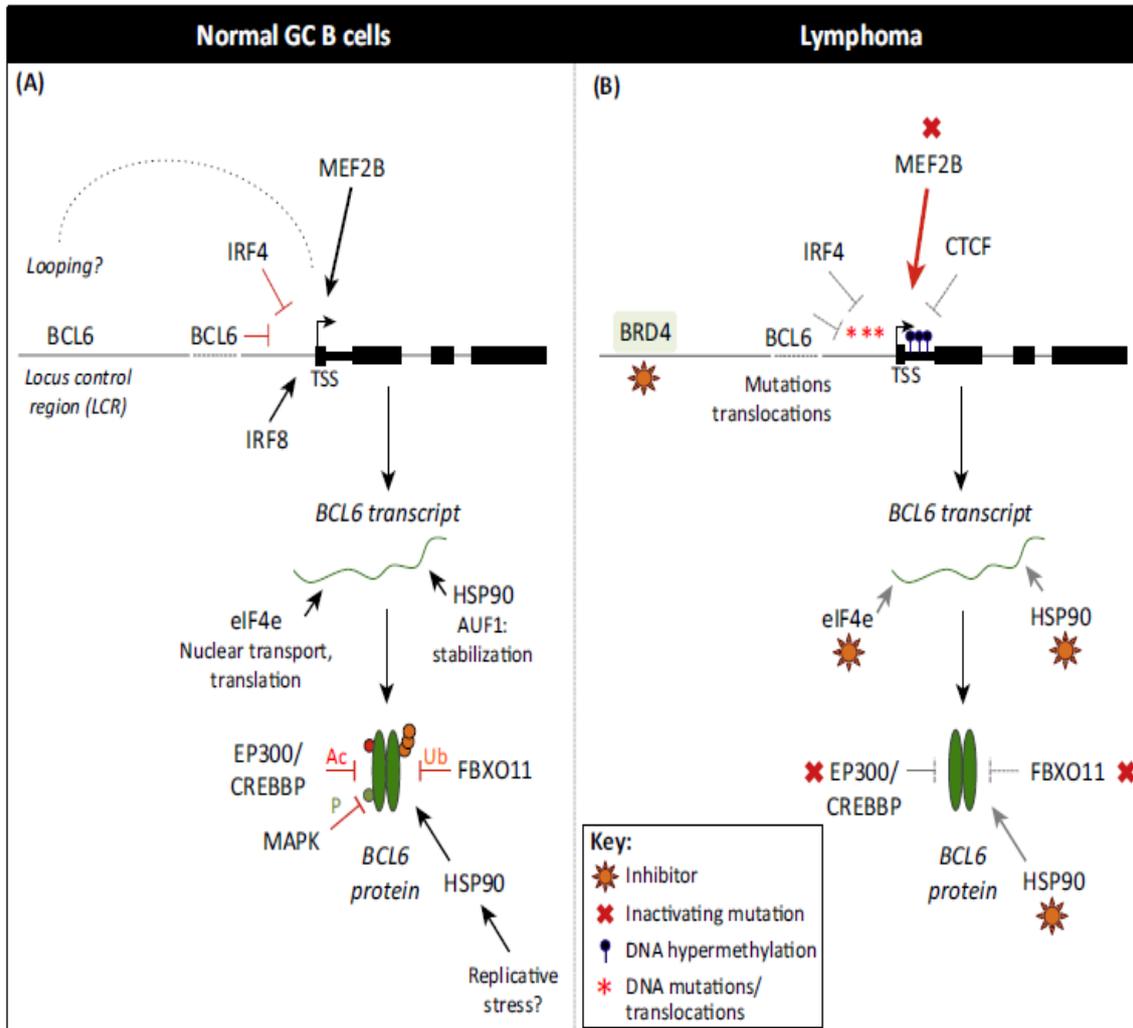


Figura 8. Mecanismos transcripción y regulación de la proteína de BCL6 en células normales Vs células de linfomas (Hatzi & Melnick, 2014).

En conclusión, la expresión alterada de BCL6 se asocia con linfomagénesis al permitir la aparición de aberraciones en un entorno que no responde a los puntos de control del daño del ADN y al interferir con los procesos de diferenciación. La caracterización molecular de los linfomas es esencial para la disección de los subconjuntos tumorales dependientes de BCL6 y por lo tanto potencialmente sensible a la terapia dirigida a BCL6 (Basso & Dalla-Favera, 2012).

6. TERAPIA DIRIGIDA CONTRA BCL6

Uno de los objetivos últimos de la investigación terapéutica experimental en el cáncer es desarrollar agentes dirigidos específicamente contra las lesiones moleculares causales de cada tipo de tumor. Tales agentes tienen potentes efectos antitumorales generalmente, con menos toxicidad debido a que los tumores dependen de estas vías aberrantes de supervivencia que no son esenciales en células normales (Parekh et al, 2008).

La terapia estándar para el tratamiento de DLBCL consiste en una combinación de anticuerpos monoclonales contra CD20 con un régimen de quimioterapia usando varios fármacos (CHOP). Incluso cuando tiene éxito, este régimen tiene como resultado una toxicidad significativa, y en torno al 30% de los pacientes recidivan o progresan, ocasionando una importante morbilidad. El desarrollo de nuevas terapias es necesario tanto para mejorar el resultado de los pacientes, como para reducir la toxicidad de los regímenes actuales (Cardenas et al, 2016).

En los linfomas de origen centro germinal tales como el DLBCL subtipo GCB, BCL6 juega con frecuencia un papel fundamental en el mantenimiento del fenotipo tumoral y por ello constituye una diana terapéutica muy atractiva.

El hecho de que el subtipo ABC-DLBCL a menudo tiene niveles proteicos de BCL6 más bajos que el fenotipo GCB, podría a priori, sugerir que en este tipo de pacientes BCL6 no constituye una potencial diana. Sin embargo, la genética tumoral sugiere lo contrario, dado que los ABC-DLBCL presentan traslocaciones, así como amplificaciones del locus de BCL6, que implican desregulación de su expresión. Se ha sugerido que BCL6 podría funcionar a través de un mecanismo de tipo "hit-and-run" en ABC-DLBCL en base a estudios en los que la expresión transitoria de BCL6 en células madre de murino, indujeron DLBCL más tarde en estos ratones (Cardenas et al, 2016).

Por todo ello, BCL6 constituye una diana terapéutica muy atractiva en pacientes con linfomas agresivos. Sin embargo, actuar sobre los factores de transcripción se considera desde hace tiempo un desafío en la terapia contra el cáncer (Hatzi & Melnick, 2014).

6.1. Diseño racional de inhibidores de BCL6

Sabemos que BCL6 media sus funciones como regulador de las células B del CG y de los linfomas coordinando el ensamblaje de complejos de represión transcripcional en la cromatina. Los estudios estructurales en profundidad del dominio co-represor BTB y otros dominios de BCL6, han proporcionado una ruta para el diseño racional de estos inhibidores (Hatzi & Melnick 2014).

- A. Dominio BTB.** Las características que hacen que el dominio N-terminal BTB de BCL6 sea una buena diana terapéutica para linfomas de células B son:

- El papel de BCL6 como supresor de los puntos de control es mediado principalmente a través del dominio BTB. Estudios ChIP-seq en células B primarias del CG mostraron que BCL6 reprime *ATR*, *TP53* y *CDKN1A*, genes clave de los puntos de control, reclutando SMRT o BCOR (Hatzi & Melnick, 2014).
- El dominio BTB contiene residuos a través de los cuales BCL6 interactúa con los co-represores SMRT, NCOR y BCOR y son exclusivos de BCL6, no están presentes en otros dominios BTB, planteando la posibilidad de desarrollar inhibidores específicos menos propensos a interferir con otros factores de transcripción. Los tres co-represores se unen a una superficie expuesta común en la interfaz de las dos cadenas del dímero, denominada “lateral groove”, que se forma por homodimerización del dominio BTB (Figura 9). Los ratones que expresan una forma de BCL6 con mutaciones en el “lateral groove” de unión al co-represor no forman centro germinal (Hatzi & Melnick, 2014) (Cardenas et al, 2017).
- NCOR y SMRT reconocen el “lateral groove” a través de un dominio BBD (BCL6 BTB binding domain) de 18 aminoácidos. Ambas proteínas forman complejos similares con HDAC3 y facilitan la deacetilación de histonas. BCOR no comparte secuencia ni estructura con SMRT y NCOR y se une a BCL6 usando una secuencia BBD completamente diferente. Mutaciones que cambian la superficie del “lateral groove” de BCL6 sin afectar la estructura general del dominio no se unen a los BBDs de los co-represores, y estas mutaciones anulan la actividad represora del dominio BTB de BCL6 (Hatzi & Melnick, 2014) (Parekh et al, 2008).

Estas características sugieren que el “lateral groove” de BCL6 podría ser una excelente diana terapéutica. Los agentes que se unen al “lateral groove” y compiten por la unión del co-represor pueden, en principio, revertir las actividades de represión de BCL6 (Parekh et al, 2008). Además, la interfaz del dominio BTB de BCL6 no parece estar involucrado en el fenotipo de inflamación letal causado por la pérdida total de la proteína de BCL6, reduciendo así la probabilidad de toxicidad en la diana (Hatzi & Melnick, 2014).

La parte superior de los dímeros forma un “charged pocket motif”, que está muy conservado en la familia del dominio BTB (Figura 9). Se demostró que el “charged pocket motif” de BCL6 contribuía a la represión transcripcional, y podría constituir otra diana para el diseño de inhibidores de BCL6 (Parekh et al, 2008).

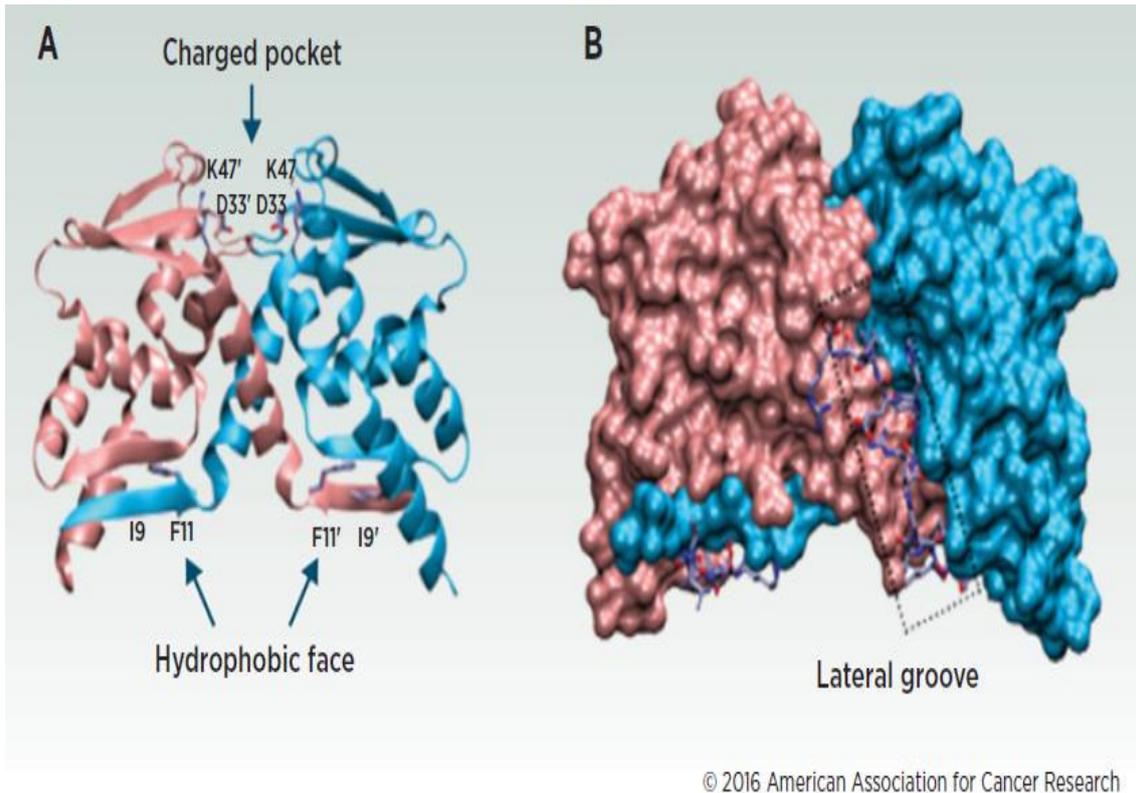


Figura 9. Representación del dominio BTB de BCL6. Este dominio forma un homodimero entre los dos monómeros representados en azul y rojo. A) representación en la que las flechas indican el “charged pocket motif” y la zona hidrofóbica, indicando algunos de los residuos. B) representación del dominio BTB y el “lateral groove” indicado con el recuadro (Cardenas et al, 2017).

B. Dominio RD2. Además del dominio BTB, el dominio RD2 también presenta actividad represora autónoma:

- La región RD2 de BCL6 interactúa con el dominio C-terminal del co-represor MTA3 y CTBP. MTA3 forma un complejo con BCL6 que reprime el locus de *PRDM1*, bloqueando así la diferenciación terminal (Hatzi & Melnick, 2014) (Parekh et al, 2008)
- La expresión de MTA3 es similar a la de BCL6 durante la diferenciación normal en el centro germinal, así como en DLBCL. La depleción de MTA3 de las células de linfoma induce la diferenciación en células plasmáticas, pero no reactiva la expresión de ATR o TP53 ni mata las células de linfoma, ya que la represión de estos genes está mediada por el dominio BTB (Parekh et al, 2008), por lo que a priori constituye una diana menos potente que el dominio BTB.

BCL6 usa, por lo tanto, dos tipos de co-represores para reprimir los genes involucrados en dos rutas biológicas diferentes. Así, el co-represor SMRT/NCOR se une al “lateral groove” del dominio BTB, y MTA3 se une a RD2, bloqueando la diferenciación terminal (Parekh et al, 2007).

El diseño de inhibidores dirigidos contra los dominios de BCL6 de unión a co-represores son mejores que las estrategias encaminadas a disminuir la proteína de BCL6 o su unión al ADN por los dedos de zinc. Los ratones “knockout” BCL6 que no tienen el dominio de los dedos de zinc manifiesta un fenotipo fatal debido a la inflamación sistémica mediada por los macrófagos y células T. Por lo tanto, suprimir la unión de BCL6 a la cromatina probablemente causaría efectos secundarios tóxicos significativos. Por el contrario, actuando contra el dominio de BTB de unión a co-represores, que no está implicado en la respuesta inflamatoria por macrófagos o funciones de las células T, no provoca estos efectos biológicos no deseados (Hatzi & Melnick, 2014).

Por otro lado, comprender los mecanismos bioquímicos de la función del dominio BTB de BCL6 podría servir para seleccionar pacientes en futuros ensayos que prueben los inhibidores de BCL6 en la clínica. Dada la variabilidad en la clínica de DLBCL, la mejor clasificación de los pacientes basada en las firmas trasccripcionales derivadas de las redes diana de promotores y “enhancer” de BCL6, podrían indicar los tumores dependientes de BCL6 BTB que se beneficiarían de los inhibidores de BCL6 (Hatzi & Melnick, 2014).

6.2. Moléculas inhibidoras de BCL6

A continuación se describen las principales características de los inhibidores de BCL6 descritos hasta el momento (ver más detalles en la Figura 10).

A. Moléculas que inhiben el dominio BTB

1. BPI (péptido inhibidor de BCL6):

El primer inhibidor de BCL6 (BPI) fue un péptido recombinante que contenía el dominio BBD (BCL6 BTB binding domain) de SMRT junto con un dominio TAT para facilitar su penetración en la célula (Figura 10). La actividad anti-linfoma de BPI depende del equilibrio entre la penetración celular, estabilidad y su unión a BCL6. (Cerchietti et al, 2009)

La probabilidad de que una de las moléculas lo suficientemente grandes para ocupar completamente el “lateral groove” pueda penetrar fácilmente en las células, es baja. Una forma de liberar moléculas más grandes, como los péptidos, es usando “protein transduction domains” tales como pTAT, que han demostrado penetrar prácticamente todos los tipos de células tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios realizados utilizando péptidos SMRT recombinantes fusionados a pTAT, muestran que estos inhibidores peptídicos de BCL6 (BPI) pueden interrumpir la formación de complejos represores de BCL6. Se demostró que el péptido de fusión recombinante TAT-BBD penetra las células B *in vitro* e interrumpe la interacción entre BCL6 y SMRT. BPI fue capaz de reactivar genes diana de BCL6, inducir la apoptosis y detener el ciclo celular en las células DLBCL. Además, la administración de BPI *in vivo* anuló la formación del centro germinal en respuesta a un estímulo

antigénico dependiente de células T. Sin embargo, BPI no pudo inducir la diferenciación en células de DLBCL (Hatzi & Melnick, 2014) (Parekh et al, 2008), probablemente porque no interfiere con la unión MTA3. Aunque BPI fue eficaz en el rango micromolar bajo, el péptido tenía una vida media corta in vivo y era degradado por las proteasas (Parekh et al, 2008).

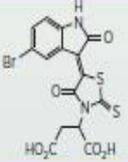
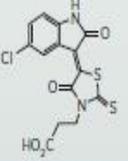
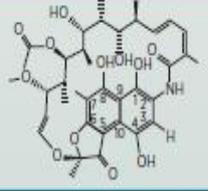
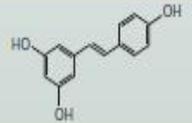
BCL6 inhibitor	Structure	Kd	Method	qPCR	Chip	Differential killing	GI ₅₀ In sensitive cells	In vivo GC Inhibition	In vivo xenograft models	Reference
SMRT ¹⁴¹⁴⁻¹⁴⁴¹	LVATVKEAGRSIHEIPREELRHTPELPL	15.8 ± 3 nmol/L 11.4 ± 1 μmol/L	SPR ITC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18
BBD-BPI	(His) ₆ -pTAT-HA tag -GLVATVKEAGRSIHEIPREEL	10.2 μmol/L	EMSA	Yes	Yes	Yes	11 ± 3 μmol/L	Yes	NA	6, 21
L-BPI	Fu-TAT-GRSIEIIPRG	NA	NA	Yes	Yes	Yes	14 ± 2 μmol/L	NA	NA	6, 21
RI-BPI	TAT-GRGIEHISR-Fu	NA	NA	Yes	Yes	Yes	16 ± 3 μmol/L	Yes	Yes	6, 21
Apt48	gpHGPRDWCLFGgp	NA	NA	Yes	NA	NA	NA	NA	NA	30
79-6		138 ± 31 μmol/L	NMR	Yes	Yes	Yes	408 ± 396 μmol/L	NA	Yes	31
FX1		7 ± 3 μmol/L	MST	Yes	Yes	Yes	39 ± 12 μmol/L	Yes	Yes	34
Rifamycin SV		~1 mmol/L	NMR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	39
Resveratrol		NA	NA	NA	NA	NA	<25 μmol/L	NA	NA	35-37

Figura 10. Inhibidores de BCL6 conocidos hasta la fecha. En la figura está representada la estructura de cada uno, así como su actividad (Cardenas et al, 2017).

2. RI-BPI (péptido inhibidor de BCL6 retro inverso)

Posteriormente se desarrolló una forma más estable de BPI que podría servir en la terapia dirigida contra BCL6 (Cerchiatti et al, 2009). El péptido se acortó y se convirtió en D-aminoácidos resistentes a proteasas (Figura 10). El fármaco peptidomimético de BCL6 retro-inverso (RI-BPI) era más potente y estable que BPI. RI-BPI es un inhibidor de BCL6 que está siendo desarrollado para su uso clínico y actúa impidiendo que BCL6 reclute los complejos co-represores (BCOR, NCOR, SMRT) que se unen al dominio BTB (Dupont et al, 2016).

Las firmas transcripcionales inducidas por él afectan sobre todo a los genes reprimidos por complejos BCL6-promotor ternario, así como los genes vinculados a “enhancer” silenciados por BCL6-SMRT (Hatzi & Melnick, 2014). La función principal de RI-BPI en las células de los linfomas es inducir muerte celular, que se produce porque BCL6 deja de reprimir genes clave de los puntos de control de daño de ADN y genes moduladores como ATR, TP53 y EP300 (Dupont et al, 2016).

Los DLBCL que presentan una firma de activación por BCR son sensibles a BPI, y de manera congruente también a RI-BPI. Sin embargo un grupo de DLBCL que presentan “OxPhos signature” son resistentes al tratamiento con BPI, a pesar de expresar BCL6 y el tratamiento con RI-BPI ha demostrado ser superior en estos casos (Cerchietti et al, 2009).

RI-BPI no fue tóxico en ratones y podría ser apropiado para su uso en humanos (Cardenas et al, 2017).

3. Pequeñas moléculas inhibidoras de BCL6:

A partir de estudios “in silico” se están desarrollando pequeñas moléculas inhibidoras capaces de unirse al “lateral groove” del dominio BTB de BCL6 tales como los compuestos 79-6 y FX1 (Figura 10).

79-6: el diseño de medicamentos por ordenador permitió la identificación de 79-6, una molécula pequeña con actividad anti-linfoma. 79-6 no induce ninguna toxicidad en los animales, incluso cuando se administra durante un año de forma continua, lo que es consistente con el modelo de ratón BCL6^{BTBmut}. Este compuesto muestra propiedades farmacocinéticas favorables y pueden erradicar completamente linfomas en modelos de ratón (Hatzi & Melnick, 2014).

79-6 se une a BCL6 con menor afinidad que las proteínas co-represoras endógenas, lo que podría limitar su utilidad (Hatzi & Melnick, 2014). Sin embargo, el dominio BTB de BCL6 también se une a los co-represores con relativa baja afinidad. Por lo tanto, aunque las interacciones entre proteínas son difíciles de interrumpir no es necesario generar compuestos de alta afinidad, ya que los inhibidores sólo necesitan competir contra una proteína relativamente débil en el dominio BTB de BCL6 (Cardenas et al, 2016).

FX1: En un estudio reciente (Cárdenas 2016) se utilizó un nuevo método denominado “SILCS” para diseñar pequeñas moléculas mejoradas que se unieran al “lateral groove” del dominio BTB de BCL6 y rompieran la unión con los co-represores endógenos. El compuesto FX1 se identificó como el inhibidor más activo y selectivo contra el dominio BTB de BCL6 (Cardenas et al, 2016)

- FX1 es específico para BCL6 y se une con mayor afinidad que el ligando natural de BCL6, SMRT
- FX1 impide que BCL6 reclute co-represores de sus genes diana. Además es más potente que 79-6 interrumpiendo la unión de BCL6 con SMRT

- FX1 produce la des-represión de los genes diana de BCL6 y su programa transcripcional
- FX1 suprime el subtipo GCB-DLBCL dependiente de BCL6 *in vitro* e *in vivo*. Dado que algunos estudios sugieren que el subtipo ABC-DLBCL depende biológicamente de BCL6, se podría emplear FX1 para tratarlos.

FX1 era 100 veces más potente que la generación anterior de inhibidores de BCL6 representados por 79-6. Es importante destacar que esta potencia superior en la unión se traduce en una eficacia mejorada en ensayos basados en células y modelos animales de GCB-DLBCL, mientras que no se produce toxicidad. Además, se logró mejorar la potencia sin sacrificar la especificidad, ya que FX1 no tuvo ningún efecto sobre otras proteínas BTB. Esta especificidad se debe seguramente al hecho de que los residuos superficiales que recubren el “lateral groove” y se unen a los co-represors son únicos para BCL6 y no se conservan en otras proteínas BTB. Por lo tanto, este enfoque mediante SILCS puede guiar el diseño de inhibidores de la interacción proteína-proteína (Cardenas et al, 2016).

B. Moléculas que actúan a nivel del dominio RD2

La interrupción de la interacción BCL6-MTA3 podría ser potencialmente útil para inhibir el bloqueo de la diferenciación mediado a través del dominio RD2. (Parekh et al, 2008).

Dado que la depleción de MTA3 induce la diferenciación celular, pero no mata a las células del linfoma, la combinación del bloqueo de MTA3 con péptidos o moléculas pequeñas, junto a BPI aumenta la respuesta de las células del linfoma a la terapia, más que usando cada terapia por separado (Parekh et al, 2007).

C. Moléculas que inhiben “charged pocket motif”

Una estrategia péptidomimética alternativa fue el desarrollo de aptámeros (Figura 10) que se unían al dominio BTB de BCL6 de manera diferente a los inhibidores. Aptamer48 es un péptido que puede unirse cerca del “charged pocket motif” (Figura 9) de BCL6 y podría bloquear la actividad represora de BCL6 sin afectar a la interacción con SMRT o NCOR. Aptamer48 promovía la reexpresión de genes diana de BCL6 y fue también capaz de inhibir la proliferación de células de linfoma. Estos datos sugieren que Aptamer48 también podría servir como inhibidor en la terapia dirigida contra BCL6 (Parekh et al, 2008) (Cardenas et al, 2017).

Parece que la respuesta a los inhibidores de BCL6 se correlaciona con los niveles de BCL6, debido a que se requieren mayores dosis para suprimir las líneas celulares que expresan más BCL6. Sin embargo, hay muchas excepciones a esta regla, probablemente debido a los efectos de diferentes conjuntos de mutaciones somáticas y otros factores que alteran la funcionalidad BCL6 (Cardenas et al, 2016).

6.3. Combinación de terapias en linfomas

Determinar las vías de señalización reprimidas por BCL6 en células de linfomas, así como sus mecanismos bioquímicos de acción, permitiría diseñar más eficazmente el tratamiento combinado de inhibidores de BCL6 con otros fármacos. Estudios preliminares de combinación apoyan esta estrategia:

- La des-represión de TP53 y las vías de apoptosis produce la muerte sinérgica de las células del linfoma cuando los inhibidores de BCL6 se combinan con quimioterapia o compuestos activadores de TP53 (Hatzi & Melnick, 2014).
- Estrategias terapéuticas que combinan bloqueo BCL6 con inhibidores de HSP90 o HDAC, elimina células de DLBCL interrumpiendo el círculo de retroalimentación positiva entre BCL6, represión de EP300, y HSP90 (Hatzi & Melnick, 2014).
- La inhibición de BCL6 también induce la expresión de genes antiapoptóticos como BCL2 y BCL2A1. Estos pueden representar un tipo de mecanismos de retroalimentación que permitan la supervivencia DLBCL cuando tratamos con inhibidores de BCL6 (RI-BPI) (Hatzi & Melnick, 2014).

Las mutaciones en el promotor de BCL2 que se producen en algunos DLBCL permiten que BCL2 escape al control por BCL6, de manera que mantiene la supervivencia del linfoma al suprimir la actividad de la proteína pro-apoptótica BH3 (Dupont et al, 2016).

Los datos sugieren que las proteínas de la familia BCL2 proporcionan resistencia a la activación de los puntos de control, activados por el tratamiento con RI-BPI en GCB-DLBCL. Al volverse estos linfomas más dependientes de BCL2 con el tratamiento con RI-BPI, si le añadimos tratamiento contra los mecanismos de feedback que actúan en BCL2, aumentamos la eficacia de la terapia contra BCL6 (Dupont et al, 2016).

De acuerdo con estas líneas, la terapia combinada utilizando fármacos miméticos BH3 tales como ABT-737 (inhibidor de BCL2 en fase de ensayo clínico) produjo una potente sinergia con inhibidores de BCL6 (Hatzi & Melnick, 2014).

- La regulación del receptor de células B por BCL6 y la señalización por NF-κB también podría ser aprovechado para diseñar tratamientos combinados dirigidos. Por ejemplo, se mostró que BCL6 mantiene señalización BCR a través de la represión de SYK (spleen tirosina quinasa) inactivando la fosfatasa PTRPRO (proteín tyrosin phosphatase, receptor type O). Por lo tanto, la inhibición de BCL6 combinada con compuestos contra la señalización BCR tales como inhibidores de SYK y BTK pueden producir destrucción sinérgica de células del linfoma (Hatzi & Melnick, 2014).

En resumen, desde el punto de vista terapéutico, la combinación de inhibidores de BCL6 con fármacos que actúan sobre las vías reprimidas por BCL6 llevó a una mayor muerte celular, lo que sugiere que la terapia combinada contra las funciones de represión de BCL6 podría proporcionar un efecto terapéutico superior (Hatzi & Melnick, 2014) (Parekh et al, 2008). Por lo tanto, se amplía el alcance de los linfomas que pueden responder a la terapia dirigida a BCL6 para incluir DLBCL tipo GCB y ABC. Esto es particularmente importante dado la evolución clínica más desfavorable de ABC-DLBCL.

La potente actividad anti-linfoma y las propiedades farmacológicas favorables de los inhibidores de BCL6 son muy prometedoras para el desarrollo de regímenes terapéuticos definitivos para erradicar los linfomas con menos toxicidad, en comparación con las opciones actuales (Hatzi & Melnick, 2014).

7. CONCLUSIONES

BCL6 juega un papel esencial en la formación del centro germinal, mantiene el equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis de los linfocitos B y genera el ambiente necesario para que se produzca la generación de anticuerpos de alta afinidad. Esto lo consigue por su represión tanto de oncogenes como de genes supresores tumorales que controlan la proliferación, apoptosis, respuesta al daño al ADN, diferenciación celular, etc. En la Figura 11 se resumen los efectos de BCL6 en células B normales del centro germinal y en linfomas.

Sin embargo, la desregulación de BCL6 por mutaciones puntuales o traslocaciones, impiden que se complete la diferenciación fisiológica y generalmente conlleva en muchos casos la generación de Linfomas.

Debido a su papel en el desarrollo de linfomas B, la inhibición de BCL6 mediante la combinación de la terapia dirigida contra BCL6 y fármacos estándar, se presenta como una alternativa terapéutica muy atractiva, con estudios preliminares que sugieren una eficacia clínica superior y una menor toxicidad. Esto es de gran interés especialmente en pacientes de alto riesgo que tienen más probabilidades de ser resistentes a quimioterapia.

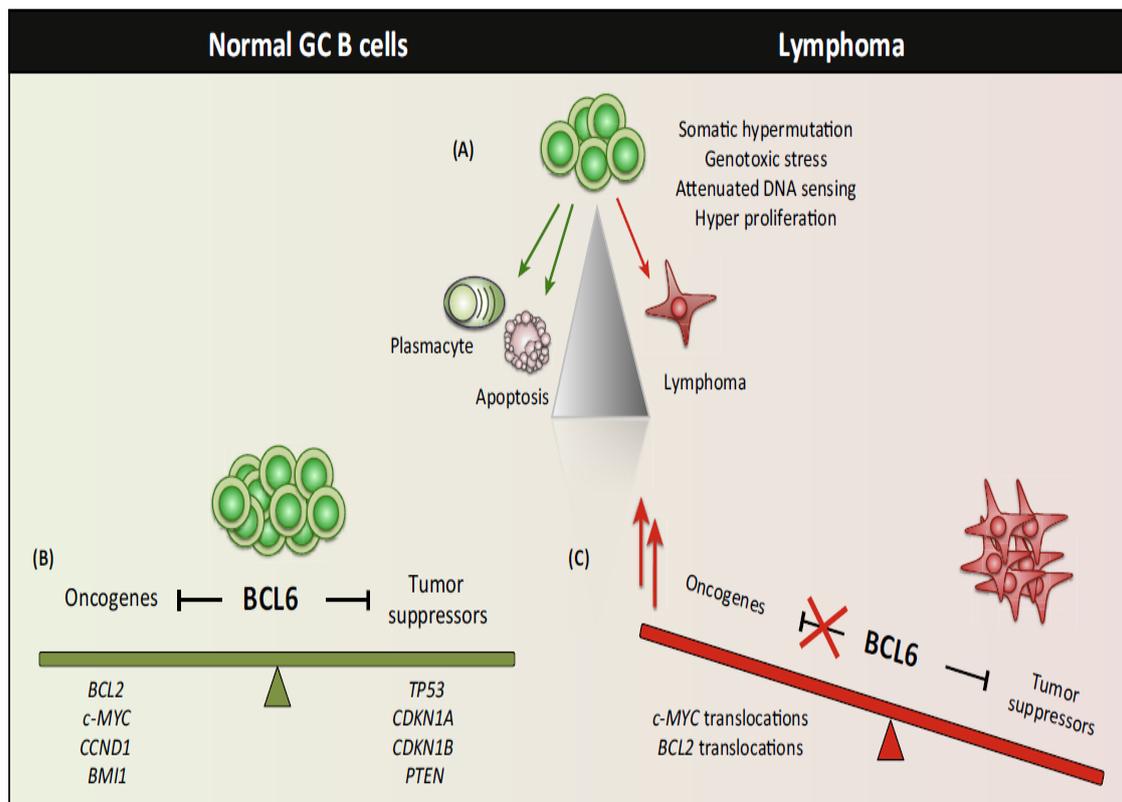


Figura 11. Esquema que representa el papel de BCL6 manteniendo el balance para que se produzca el desarrollo normal de las células B del centro germinal, y como su alteración deriva en la formación de un linfoma de células B al aumentar la actividad de los oncogenes y disminuir la de los supresores tumorales (Hatzl & Melnick, 2014).

8. BIBLIOGRAFIA

Basso K, Dalla-Favera R (2010) BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* **105**: 193-210

Basso K, Saito M, Sumazin P, Margolin AA, Wang K, Lim WK, Kitagawa Y, Schneider C, Alvarez MJ, Califano A, Dalla-Favera R (2010) Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* **115**: 975-984

Basso K, Dalla-Favera R (2012) Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* **247**: 172-183

Basso K, Dalla-Favera R (2015) Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* **15**: 172-184

Batlle-López A (2010) Regulation of BCL6: p38 MAPK signalling and CTCF transcriptional regulation converge at exon 1. Dpt. Medicine. Imperial College London, dissertation

Batlle-Lopez A, Cortiguera MG, Rosa-Garrido M, Blanco R, del Cerro E, Torrano V, Wagner SD, Delgado MD (2015) Novel CTCF binding at a site in exon1A of BCL6 is associated with active histone marks and a transcriptionally active locus. *Oncogene* **34**: 246-256

Batlle-Lopez A, Cortiguera MG, Delgado MD (2015) The epigenetic regulator CTCF modulates BCL6 in lymphoma. *Oncoscience* **2**: 783-784

Bunting KL, Melnick AM (2013) New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **25**: 339-346

Cardenas MG, Oswald E, Yu W, Xue F, MacKerell AD, Jr., Melnick AM (2017) The Expanding Role of the BCL6 Oncoprotein as a Cancer Therapeutic Target. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **23**: 885-893

Cardenas MG, Yu W, Beguelin W, Teater MR, Geng H, Goldstein RL, Oswald E, Hatzi K, Yang SN, Cohen J, Shaknovich R, Vanommeslaeghe K, Cheng H, Liang D, Cho HJ, Abbott J, Tam W, Du W, Leonard JP, Elemento O, Cerchietti L, Cierpicki T, Xue F, MacKerell AD, Jr., Melnick AM (2016) Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma. *J Clin Invest* **126**: 3351-3362

Cerchietti LC, Yang SN, Shaknovich R, Hatzi K, Polo JM, Chadburn A, Dowdy SF, Melnick A (2009) A peptomimetic inhibitor of BCL6 with potent antilymphoma effects in vitro and in vivo. *Blood* **113**: 3397-3405

Ci W, Polo JM, Melnick A (2008) B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* **15**: 381-390

Cortiguera MG (2017) Epigenetic regulation of BCL6 in aggressive b cell lymphoma: role of CTCF chromatin regulator and effects of a histone deacetylase inhibitor. Dpt. Molecular Biology, Cantabria, dissertation

Dupont T, Yang SN, Patel J, Hatzi K, Malik A, Tam W, Martin P, Leonard J, Melnick A, Cerchietti L (2016) Selective targeting of BCL6 induces oncogene addiction switching to BCL2 in B-cell lymphoma. *Oncotarget* **7**: 3520-3532

Hatzi K, Melnick A (2014) Breaking bad in the germinal center: how deregulation of BCL6 contributes to lymphomagenesis. *Trends Mol Med* **20**: 343-352

Huang C, Melnick A (2015) Mechanisms of action of BCL6 during germinal center B cell development. *Sci China Life Sci* **58**: 1226-1232

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH (2008) Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*, IARC (ed), 8, p 158.

Moss P, Drayson M (2015) Normal lymphocytes and non-neoplastic lymphocytes disorders. In *Postgraduate Haematology*, 7th edn, p 278. Wiley Blackwell

Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, Juszczynski P, Lev P, Ranuncolo SM, Yin Y, Klein U, Cattoretti G, Dalla Favera R, Shipp MA, Melnick A (2007) BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* **110**: 2067-2074

Parekh S, Prive G, Melnick A (2008) Therapeutic targeting of the BCL6 oncogene for diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* **49**: 874-882

Ranuncolo SM, Polo JM, Melnick A (2008) BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis* **41**: 95-99

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**: 2375-2390

Wagner SD, Ahearne M, Ko Ferrigno P (2011) The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol* **152**: 3-12

Ye, B. H., Rao, P. H., Chaganti, R. S. and Dalla-Favera, R. (1993) Cloning of BCL6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res* **53**, 2732-5.

