

Université de Montréal

Mécanismes d'inhibition de l'apoptose par la procaspase-2S; effet sur la formation
des corps apoptotiques

par
Nicolas Parent

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en biologie moléculaire

décembre, 2004

© Nicolas Parent, 2004



QH

506

U54

2005

V.005

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Mécanismes d'inhibition de l'apoptose par la procaspase-2S; effet sur la formation
des corps apoptotiques

présenté par :
Nicolas Parent

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Yves Raymond, Ph. D.
président-rapporteur

Richard Bertrand, Ph. D.
directeur de recherche

Isabelle Royal, Ph. D.
membre du jury

3. RÉSUMÉ

Les caspases sont des protéases généralement associées à l'apoptose. L'épissage alternatif des gènes des caspases peut conduire à la production d'isoformes aux propriétés pro- ou anti-apoptotiques, contribuant à la régulation de la cascade apoptotique. La procaspase-2S, isoforme courte issue du gène de la caspase-2, a été décrit pour prévenir sélectivement le bourgeonnement membranaire et la formation des corps apoptotiques dans les cellules monocytaires U937 exposées à l'étoposide. Nos travaux montrent l'inhibition de la protéolyse et de l'activation de la procaspase-3 par la surexpression de la procaspase-2S dans les cellules Namalwa, ce qui prévient le clivage et l'activation de la protéine ROCK-1. L'inhibition de l'activation de ROCK-1 corrèle avec le retard prolongé du bourgeonnement membranaire et de la formation des corps apoptotiques. Des expériences d'immunoprécipitations réciproques indiquent que la procaspase-2S se lie spécifiquement à la procaspase-3 dans les cellules Namalwa, traitées ou non à l'étoposide, ce qui expliquerait certaines propriétés anti-apoptotiques associées à la procaspase-2S.

MOTS CLÉS : Apoptose, bourgeonnement membranaire, procaspase-2S, caspase-3, corps apoptotiques, étoposide, fragmentation de l'ADN, cellules Namalwa, ROCK-1.

4. ABSTRACT

Caspase are evolutionary conserved proteins often associated with programmed cell death. Alternative splicing of some caspase genes leads to production of pro- and anti-apoptotic isoforms that play a role in the in caspase cascade regulation. Procaspase-2S, a short isoform of the caspase-2 gene, has been recently reported to selectively prevent membrane blebbing and apoptotic body formation in human monocytic-like leukemia U937 cells after etoposide treatment. Here, we show that procaspase-2S overexpressed in human B lymphoma Namalwa cells inhibits procaspase-3 processing and activation, thus preventing cleavage and activation of the Rho GTPase-associated ROCK-1 kinase. Lack of ROCK-1 activation in Namalwa cells correlates with a sustained delay in the appearance of membrane blebbing and apoptotic body formation following etoposide treatment. Reciprocal coimmunoprecipitation experiments indicate that procaspase-2S specifically binds to procaspase-3 in untreated and etoposide-treated Namalwa cells. These data suggest that procaspase-2S-mediated anti-apoptotic effects are associated with the inhibition of caspase-3 processing and activation in etoposide-treated cells.

KEYWORDS: Apoptosis, apoptotic bodies, procaspase-2S, caspase-3, DNA fragmentation, etoposide, membrane blebbing, Namalwa cell line, ROCK-1.

5. TABLE DES MATIÈRES

1.	TITRE	ii
2.	IDENTIFICATION DU JURY	iii
3.	RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	iv
4.	ABSTRACT AND KEYWORDS	v
5.	TABLE DES MATIÈRES	vi
6.	Liste des figures	vii
7.	Liste des abréviations	ix
8.	REMERCIEMENTS	xii
9.	RECENSION DE LA LITTÉRATURE	1
	9.1 Les principales molécules de l'apoptose	2
	9.2 Les voies d'activation de l'apoptose	7
	9.3 La cascade des caspases	9
	9.4 Les changements morphologiques caractéristiques de la cellule apoptotique	10
	9.5 Le contrôle de l'activation des caspases	16
	9.6 La caspase-2	17
10.	PERTINENCE DU PROJET	23
11.	HYPOTHÈSE	25
12.	APPROCHES EXPÉRIMENTALES	26
13.	PROCASPASE-2S INHIBITS PROCASPASE-3 PROCESSING AND ACTIVATION, PREVENTING ROCK-1-MEDIATED APOPTOTIC BLEBBING AND BODY FORMATION IN HUMAN B LYMPHOMA NAMALWA CELLS	28
	13.1 Abstract	29
	13.2 Keywords and abbreviations	29

13.3	Introduction	30
13.4	Materials and methods	32
13.5	Results	36
13.6	Discussion	40
13.7	Acknowledgments	44
13.8	References	44
13.9	Figure legends	51
14.	DISCUSSION	58
15.	CONCLUSION	66
16.	PERSPECTIVES	69
17.	SOURCES DOCUMENTAIRES	73

6. LISTE DES FIGURES

- Section 9. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1: La machinerie apoptotique est conservée du nématode *Cænorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères. (Page 3)

Figure 2: Le destin d'une cellule en culture (Namalwa) exposée à l'étoposide. (Page 12)

Figure 3: Les voies de signalisation des protéines kinases ROCK-1 et PAK2. (Page 13)

Figure 4: La structure schématisée des quatre différentes isoformes de la caspase-2. (Page 19)

- Section 13. PROCASPASE-2S INHIBITS PROCASPASE-3 PROCESSING AND ACTIVATION, PREVENTING ROCK-1-MEDIATED APOPTOTIC BLEBBING AND BODY FORMATION IN HUMAN B LYMPHOMA NAMALWA CELLS

Figure 1: Effect of procaspase-2S overexpression on VP-16-mediated caspase activation and DNA fragmentation associated with apoptosis in Namalwa cells. (Page 54)

Figure 2: Morphological consequences of caspases-2S overexpression in Namalwa cells after VP-16 treatment. (Page 55)

Figure 3: Procaspase-2S-mediated effect on caspase-dependent PAK2 and ROCK-1 cleavage and activation in Namalwa cells. (Page 56)

Figure 4: Procaspase-2S interacts with procaspase-3 in Namalwa cells. (Page 57)

- Section 14. DISCUSSION

Figure 1: Schématisation des niveaux d'action de la procaspase-2S. (Page 67)

7. LISTE DES ABRÉVIATIONS

- Ac-DEVD-AMC: acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin
- ADN: acide désoxyribonucléique
- AIF: apoptosis-inducing factor
- Apaf-1: apoptosis protease activating factor 1
- ATPase: adénosine triphosphatase
- ARN: acide ribonucléique
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- ARNprém: acide ribonucléique pré messenger
- Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2
- BH: Bcl-2 homology domain
- BIR: Baculovirus IAP repeat
- CAD: caspase-activated deoxyribonuclease
- CaMKIV: calcium-/calmodulin-dependent protein kinase IV
- CARD: caspase-activating recruitment domain
- CAS: crk-associated substrate
- Caspase: cysteine aspartic acid-specific proteases
- Ced: cell death abnormal
- c-FLIP: c-FLICE [caspase-8/FADD-like IL-1beta-converting enzyme] inhibitory protein
- Da: dalton
- dATP: désoxy adénosine triphosphate
- DD: death domain
- DED: death effector domain
- DEFCAP: death effector filament-forming ced-4-like apoptosis protein
- DFF: DNA fragmentation factor

DISC: death-inducing signaling complex

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase

Egl-1: egg laying defective-1

FADD/MORT1: fas-associating death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity-1

FAK: focal adhesion kinase

GTPases: guanosine triphosphatases

IAP: inhibitor of apoptosis

ICE: interleukin-1 β converting enzyme

ISBP: Ich-1S-binding protein

LRR: motif répété leucine-arginine-arginine

mDia1: mammalian homolog of diaphanous 1

MLC: myosin light chain

MST1: mammalian ste20-like kinase1

NBD: nucleotide binding domain

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

p-38MAPK: p-38 mitogen activated protein kinase

PACAP: proapoptotic caspase adaptor protein

PAK2: p-21 associated kinase

PIDD: p53-induced protein with a death domain

PKN: protein kinase N

PRK2: protein kinase C-related kinase 2

siRNA: small interfering RNA

Smac/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI

RAIDD/CRADD: receptor-interacting protein RIP-associated/caspase and RIP adaptor with death domain

RIP: receptor interacting protein

ROCK-1: rho-associated kinase-1

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SLK: ste20-like kinase

TNFR: tumor necrosis factor receptor

TRADD: TNF-R1-associated death domain protein

VP-16: étoposide

WD: motif répété tryptophane-acide aspartique

XAF1: XIAP-associated factor 1

z-VDVAD-AFC: benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluorométhylcoumarin.

8. REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord les membres de notre équipe pour l'immense plaisir que j'ai eu à les côtoyer durant ces deux dernières années. Une remarquable complicité s'est installée entre nous et a contribué à rendre heureuse chacune des journées passées en votre compagnie. Je vous remercie pour votre soutien durant les moments creux, pour les discussions stimulantes et pour tout ce que vous m'avez généreusement transmis. Ce fût un honneur immense pour moi d'avoir pu partager un coin de paillasse avec vous.

J'ai aussi eu la chance d'être dirigé par un homme que j'admire beaucoup avec qui je n'hésiterais pas un seul instant à me relancer à l'aventure. Merci pour la confiance que tu as mise en moi en me confiant ce projet. Je tiens aussi à souligner l'aide précieuse que tu m'as apportée durant la rédaction de ce mémoire.

À mes amis, avec qui j'ai vécu mon lot d'émotions durant les dernières années et sur qui j'ai pu compter « sans compter ». Je connais votre intérêt pour l'apoptose, c'est pourquoi je vous « remercie » d'emblée avant de poursuivre dans le vif du sujet!

Évidemment, je ne serais rien sans ma famille. Les mots sont incapables de vous rendre juste honneur alors merci pour tout.

À vous tous, j'exprime une reconnaissance infinie.

9. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

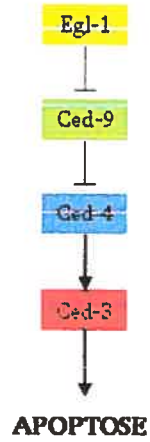
L'apoptose est un processus physiologique actif et contrôlé menant à la mort d'une cellule. Elle se distingue d'autres formes de mort cellulaire par la succession ordonnée d'événements morphologiques et biochimiques spécifiques : perte des complexes d'adhésion et détachement de la matrice cellulaire, fragmentation internucléosomale de l'ADN et condensation périnucléaire de celui-ci, contraction de la membrane cellulaire, externalisation de phosphatidylsérines, suivie par l'apparition de bourgeonnements (*blebs*) qui culminent avec la formation de corps apoptotiques renfermant le contenu cellulaire.¹ Tandis qu'une cellule mourant par nécrose libère son contenu dans l'environnement tissulaire adjacent engendrant une réponse inflammatoire, la cellule apoptotique va se morceler en une multitude de vésicules, dont les parois demeurent intactes, et qui seront « proprement » éliminées par phagocytose par les cellules adjacentes.¹⁻³ L'apoptose joue ainsi un rôle primordial dans de nombreux aspects de la vie des organismes pluricellulaires, les animaux en particulier. La mort cellulaire programmée est essentielle lors du développement embryonnaire en permettant l'assemblage cohérent de structures cellulaires complexes.⁴⁻⁸ L'apoptose assure ensuite à l'organisme mature la cohésion des cellules entre elles, contrôlant le renouvellement et l'intégrité cellulaire et tissulaire.⁹⁻¹³ Dans certaines situations physiologiques tel que le vieillissement, on constate une perturbation de la cascade signalétique apoptotique, consécutive à des mutations génétiques au sein des gènes régulant le processus apoptotique ou induite par des mécanismes de survie de certains virus, qui peut être au cœur d'une variété de pathologies humaines.¹⁴⁻¹⁷ Une perte de contrôle des mécanismes de régulation de l'apoptose, dans un contexte où celle-ci est insuffisante et que la mort ne compense pas l'augmentation de la prolifération cellulaire, est intimement liée au cancer.¹⁸⁻²³ De

même, on associe la diminution de la sensibilité cellulaire à l'apoptose aux maladies auto-immunitaires puisque l'apoptose serait requise pour une présentation adéquate des auto-antigènes, étape essentielle à la reconnaissance de l'organisme par le système immunitaire.^{13,24-27} À l'opposé, une augmentation de l'apoptose est évidente dans certaines maladies dégénératives aiguës et chroniques²⁸⁻³⁰, dans les syndromes d'immunodéficience³¹ et dans des cas d'infertilité.³²

9.1 Les principales molécules de l'apoptose

Les premières études génétiques sur la mort cellulaire programmée, réalisées sur le nématode *Cænorhabditis elegans*, ont conduit à la découverte des bases de la machinerie moléculaire apoptotique.^{33,34} Chez cet organisme, la voie de signalisation apoptotique implique fondamentalement la participation de quatre gènes codants pour les protéines egl-1, ced-3, ced-4 et ced-9.³⁵⁻³⁸ Parmi elles, ced-3 constitue la protéine initiatrice de l'apoptose. Ced-3 est activée par une protéine adaptatrice, ced-4. À son tour, l'activité pro-apoptotique de ced-4 est directement régulée par la protéine anti-apoptotique ced-9. Enfin, la régulation négative de ced-9 sur ced-4 peut être supprimée par l'action d'egl-1, qui aura pour effet de promouvoir l'apoptose³⁹⁻⁴² (Figure 1, page 3).

Au fil de l'évolution animale, la composition de la machinerie apoptotique s'est développée si bien que chez les mammifères, par exemple, il existe pour chacun des gènes identifiés chez *C. elegans* une famille de gènes correspondants (Figure 1, page 3). La protéine Ced-9 présente beaucoup d'homologie avec les protéines de la famille de l'oncogène *bcl-2*. Celles-ci

Caenorhabditis elegans

Mammifères

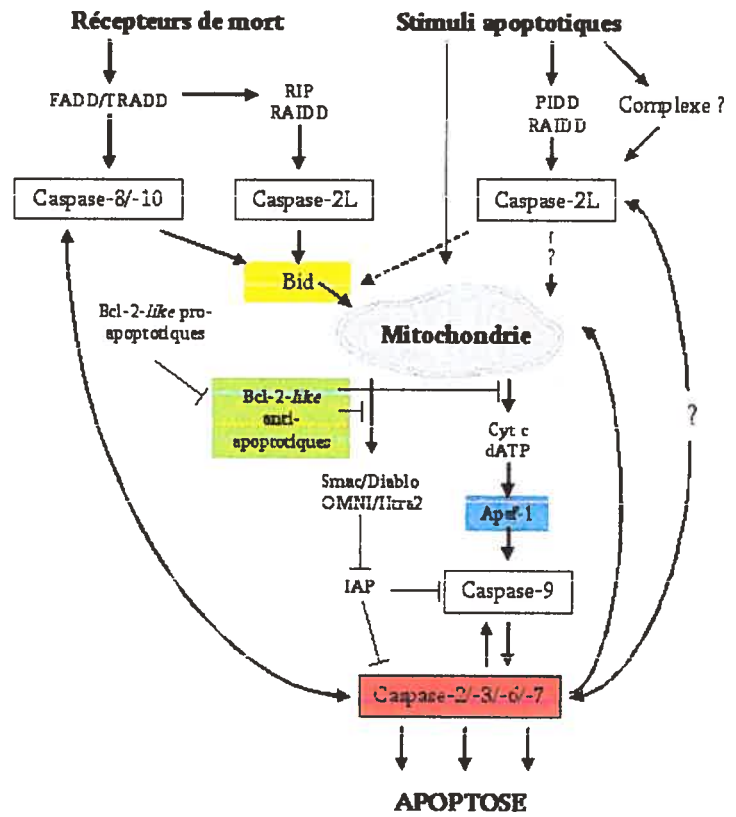


Figure 1 : La machinerie apoptotique est conservée du nématode *Caenorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères.

possèdent diverses combinaisons de domaines BH, classés de 1 à 4. On retrouve les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A-1/Bf-1/Grs, Bcl-w, Brag-1, Boo/Diva, Bcl-B/Bcl-2L-10 et Bcl-xES, constituées d'au moins un domaine BH1 et BH2 ou de tous les quatre domaines BH, et les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bcl-xS, Mtd/Bok/Bod, Bcl-rambo et Bcl-gL comportant des combinaisons de domaines BH1 à BH3 (revu dans ⁴³). Quant à elle, la protéine de *C. elegans* egl-1, contenant seulement le domaine BH3, est homologue aux activateurs de mort cellulaire des mammifères, membres eux aussi de la famille de Bcl-2, incluant Bik/Nbk, Bid, Hrk, Bad, Bim et BNip3, Nix, Puma/Bbc3, Noxa, etc (revu dans ⁴⁴). Les différents homologues de Bcl-2 exercent leur action, du moins en partie, en interagissant physiquement en fonction de l'environnement cellulaire et de leur localisation, formant ainsi un réseau complexe et dynamique d'homo- et d'hétéro-oligomères qui réguleront, entre autres, la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, une organelle jouant un rôle majeur dans la machinerie apoptotique (revu dans ⁴⁵).

L'homologue humain de la protéine ced-4 est la protéine adaptatrice Apaf-1, faisant elle aussi partie d'un groupe grandissant de protéines, les *Apaf-like*, dont les actions favorisent globalement l'apoptose.⁴⁶⁻⁵³ Ces molécules, par l'entremise d'un domaine d'interaction protéine-protéine spécifique CARD, recrutent certaines procaspases, entraînant subséquentement leur activation. Un autre type de domaine est retrouvé sur les *Apaf-like*, le domaine Walker ou NBD. Ce domaine est un site de liaison aux nucléotides qui agissent comme co-facteurs. Enfin, les *Apaf-like* portent également des séquences répétées riches en acides aminés spécifiques tels que tryptophane-acide aspartique (WD) ou leucine-arginine-arginine (LRR), qui jouent un rôle essentiel dans la structure de ces protéines (revu dans ⁵⁴).

La protéine Ced-3 du nématode est associée à la famille d'enzymes protéolytiques des caspases, anciennement nommées *ICE-like* à cause de l'homologie de certains membres de cette famille avec l'ICE.^{55,56} Ces protéines possèdent une fonction catalytique très spécifique dirigée contre une cystéine mais distincte des autres protéases spécifiques à la cystéine, par la nécessité d'un résidu d'acide aspartique précédant le site de protéolyse. Il s'agit d'une activité protéolytique pratiquement exclusive aux caspases. Une autre enzyme possède cette activité catalytique: il s'agit de la protéine granzyme B, une molécule sécrétée par des cellules du système immunitaire afin de provoquer la mort de cellules infectées par des virus. La granzyme B induit d'ailleurs l'activation de certaines caspases.⁵⁷ Quel que soit le type cellulaire ou la manière d'induire l'apoptose, une activité cystéine protéase spécifiquement associée aux caspases est généralement détectée. Les caspases sont donc au cœur du processus apoptotique (revu dans ⁵⁸).

Au moins quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères dont onze sont retrouvées chez l'homme. Les caspases ont été classées en trois groupes selon leurs substrats.^{58,59} Dans le premier groupe, on retrouve les caspases-1, -4, -5 et -13 dont la spécificité catalytique est plutôt associée à la transformation et la maturation des cytokines dans le processus inflammatoire. De plus, aucun des polypeptides clivés dans la cellule apoptotique ne contient les résidus hydrophobes nécessaires à l'activité des caspases du groupe I. Dans le deuxième groupe, composé des caspases-2, -3 et -7, on remarque une spécificité protéolytique presque indiscernable de celle de la protéine ced-3 de *C. elegans*. Le motif catalytique préférentiellement ciblé par les caspases du groupe II est retrouvé dans un très grand nombre de protéines clivées dans le processus apoptotique, ce qui est cohérent avec leur rôle d'effecteurs majeurs de l'apoptose.

Enfin, les caspases du troisième groupe, soit les caspases-6, -8, -9 et -10 auront pour cibles privilégiées des motifs protéiques qui sont surtout présents aux sites de maturation des caspases des groupe II et III, faisant d'elles des initiateurs idéaux de l'apoptose (revu dans ⁶⁰).

Les caspases sont exprimées sous forme de zymogène ou procaspase inactive nécessitant leur protéolyse afin de générer la forme active de l'enzyme, un hétérotétramère composé d'une longue et d'un courte sous-unité arrangées en hétérodimères.⁶¹⁻⁶³ En plus des régions qui constituent les deux sous-unités de l'enzyme active, les procaspases contiennent un prodomaine dans la région aminoterminal qui varie en longueur selon la fonction de la caspase. On regroupe ainsi les caspases impliquées dans le processus apoptotique en deux catégories, soit les caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9 et -10) ou effectrices (caspases-3, -6 et -7) de l'apoptose. Les caspases initiateuses sont caractérisées par un long prodomaine (>90 acides aminés) tandis que chez les caspases effectrices, le prodomaine est plus court (20-30 acides aminés) ou absent. On retrouve deux modules d'interaction protéine-protéine distincts sur les longs prodomaines, DED et CARD, qui permettront aux caspases initiateuses d'être recrutées et d'initier le processus moléculaire apoptotique (revu dans ⁵⁸).

Finalement, il existe un certain nombre de protéines apparues au cours de l'évolution animale qui interviennent de diverses manières dans la machinerie moléculaire apoptotique. Il y a les IAPs, une famille de protéines cytosoliques comptant au moins huit membres qui inhibent l'activation des caspases par l'entremise de motifs d'interaction BIR. Ces protéines permettraient d'éviter l'activation basale des caspases-3, -7 et -9 dans un contexte cellulaire normal (revu dans ⁶⁴). Cette inhibition peut toutefois être supprimée par la liaison des protéines

IAPs avec les protéines Smac/DIABLO^{65,66}, OMI/Htra2⁶⁷⁻⁶⁹ et XAF1⁷⁰, qui sont retrouvées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie en compagnie d'autres molécules pro-apoptotiques. Parmi celles-ci, signalons le cytochrome c^{71,72}, l'activateur de nucléase AIF⁷³, une endonucléase apoptotique EndoG⁷⁴ ainsi qu'une réserve de procaspases-2, -3, -8 et -9.⁷⁵⁻⁷⁸

9.2 Les voies d'activation de l'apoptose

Les procaspases possédant un long prodomaine sont reconnues comme les molécules initiatrices de l'apoptose. Dans la cellule humaine, il existe une famille de récepteurs membranaires pouvant induire la mort cellulaire par l'entremise des caspases initiatrices. Il s'agit des récepteurs de mort cellulaire de la famille des TNFR regroupant Fas/APO-1/CD95, TNF-R1, DR-3, DR-4, DR-5 et DR-6 (revu dans ⁷⁹). Des protéines adaptatrices spécifiques telles que FADD/MORT1 et TRADD pourront se lier aux récepteurs, stimulés par leurs ligands respectifs, via un module d'interaction commun à ceux-ci, le DD. À leur tour, FADD/MORT1 et TRADD vont lier les procaspases-8 et -10 par l'entremise de modules d'interaction protéine-protéine DED retrouvés sur leurs prodomaines⁸⁰⁻⁸² afin de former un large complexe d'activation, le DISC.^{79,83} Similairement, la procaspase-2L, via le module d'interaction CARD présent sur son prodomaine, pourra être recrutée par la protéine adaptatrice RAIDD/CRADD.^{84,85} Celle-ci se liera à TRADD par l'entremise de la protéine RIP afin de permettre le recrutement de la procaspase-2L au récepteur de mort TNFR1.⁸⁶ La proximité résultant de l'agrégation de plusieurs molécules de procaspases au niveau des récepteurs de mort permettra leur activation par auto-protéolyse. Cette première voie d'initiation de l'apoptose

par les caspases est la voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort cellulaire^{79,87,88} (Figure 1, page 3).

Une seconde voie d'initiation de l'apoptose requiert la participation de la mitochondrie, c'est la voie intrinsèque ou la voie mitochondriale. La perméabilisation de la membrane de celle-ci, pouvant être induite par une multitude d'insultes cellulaires incluant les dommages à l'ADN, les chocs thermiques et le stress oxydatif, va conduire à la relâche dans le cytoplasme de plusieurs facteurs apoptogéniques, dont le cytochrome c.^{71,72} Le cytochrome c, en présence de dATP, va s'associer avec la protéine adaptatrice Apaf-1 pour conduire à la formation d'un autre complexe d'initiation de l'apoptose, l'apoptosome, qui permettra l'activation de la caspase-9.^{47,89,90} Cette liaison entre la procaspase-9 et Apaf-1, à l'instar de la procaspase-2L, s'effectue par le module d'interaction CARD partagé par les deux molécules. Enfin, la protéine pro-apoptotique Bid, de la famille des Bcl-2, permet de lier la première et la seconde voie d'activation de l'apoptose. La protéine Bid pourra être protéolysée par les caspases-2, -8 ou -10 afin de générer un fragment actif, tBid, ayant la capacité d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et de provoquer la relâche du cytochrome c⁹¹⁻⁹³ (Figure 1, page 3).

Finalement, une autre voie d'initiation de l'apoptose a été mise en évidence dans des cellules déficientes en protéines Apaf-1 et procaspase-9. Cette voie implique la procaspase-2L et précède vraisemblablement la voie mitochondriale. Elle est initiée suite à des dommages à l'ADN causés par des drogues génotoxiques⁹³⁻⁹⁸ et n'engagerait pas la voie des récepteurs de mort cellulaire, du moins pas le récepteur Fas/APO-1/CD95.⁹⁹ D'ailleurs, un complexe stable, comprenant les protéines PIDD et RAIDD et conduisant à l'activation la caspase-

2L a été récemment décrit¹⁰⁰ (Figure 1, page 3). Cette voie d'initiation de l'apoptose pourrait alors reléguer la voie mitochondriale à un rôle secondaire, soit à une fonction d'amplification du signal apoptotique comme il a été suggéré par certains auteurs.^{54,101,102}

9.3 La cascade des caspases

Indépendamment de la voie d'activation empruntée, les zymogènes des caspases constituent des substrats des caspases initiatrices actives. Ceci permettra d'une part d'amplifier la réponse apoptotique en activant plus de caspases initiatrices (i.e. caspases-2, -8, -9 et -10) et, d'autre part, de poursuivre la cascade signalétique en activant les caspases effectrices (i.e. caspases-3, -6 et -7): c'est la cascade des caspases.¹⁰³ Ces dernières pourront alors cibler un large éventail de substrats cellulaires qui mèneront la cellule à sa destruction biochimique et morphologique. Des expériences d'électrophorèses à deux dimensions (*2-D gel electrophoresis*) comparant des cellules saines à des cellules apoptotiques indiquent qu'il y aurait plus de 200 polypeptides clivés durant ce processus.¹⁰⁴ Parmi les cibles des caspases, on retrouve l'inhibiteur DFF45/ICAD¹⁰⁵ dont l'inactivation par clivage permet l'activation de la nucléase DFF40/CAD¹⁰⁶, responsable de la dégradation internucléosomale de l'ADN, une caractéristique reconnue de la cellule apoptotique.¹⁰⁷ Plusieurs autres protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et dans l'organisation de la chromatine seront ciblées par les caspases. Mentionnons entre autres la protéine PARP¹⁰⁸, l'unité catalytique de la protéine DNA-PK¹⁰⁹, une composante de la petite ribonucléoprotéine U1¹¹⁰, la protéine RAD51¹¹¹, les topoisomérases I et II^{112,113}, la protéine de réplication de l'ADN RF-C 140¹¹⁴ et une protéine constituant la

matrice des chromosomes SAF-A.¹¹⁵ Les caspases effectrices vont aussi cliver quelques protéines impliquées dans la régulation du cycle et de la prolifération cellulaires telles que la protéine oncogénique pRB¹¹⁶ et les protéines du cycle cellulaire p21 et p27.¹¹⁷ Enfin, on retrouve parmi les substrats des caspases une panoplie de protéines qui participent à certaines voies de signalisation cellulaire. Par exemple des protéines kinases comprenant les isoformes α , β -1, δ , θ de la protéine kinase C ¹¹⁸⁻¹²¹, les protéines PRK2¹²², PKN¹²³, CaMKIV¹²⁴, Mst1 et Mst2¹²⁵, Raf1, Akt1¹²⁶, une kinase kinase de la voie des MAP, MEKK¹²⁷, pour ne mentionner que celles-ci. La protéolyse par les caspases de plusieurs protéines essentielles à l'homéostasie cellulaire va altérer les fonctions assurées par ces dernières et compromettre la cellule apoptotique dans un processus d'autodestruction biochimique irréversible et, ainsi, induire une série ordonnée de transformations morphologiques menant au démantèlement de la cellule sous la forme de corps apoptotiques (revu dans ^{128,129}).

9.4 Les changements morphologiques caractéristiques de la cellule apoptotique

Une première manifestation morphologique d'une cellule en apoptose est son détachement de la matrice extracellulaire. Plusieurs protéines composant les complexes focaux d'adhésion, qui assurent l'adhérence cellulaire à la matrice¹³⁰, sont aux nombres des cibles des caspases incluant ¹³¹ α -actinine, FAK, la taline, la plakoglobin et CAS.¹³¹⁻¹³³ De plus, les caspases clivent certaines protéines dont les fonctions sont liées à l'adhésion intercellulaire, par exemple la β -caténine¹³⁴, certaines cadhérines¹³⁵ et la plakoglobine.¹³³ La perte des sites focaux d'adhésion et des jonctions intercellulaires, résultant de la protéolyse des constituants cellulaires par les caspases, conduira d'une part au détachement des éléments structuraux

environnants la cellule et, d'autre part, à la diminution des jonctions entre la membrane et le cytosquelette. De plus, la perte des interactions de la cellule avec sa matrice va interrompre certains signaux de survie, poussant un peu plus la cellule vers son funeste destin.¹³⁶

Concomitamment, la cellule adoptera une morphologie arrondie et contractée, reflétant un réarrangement important du cytosquelette d'actine. Tout le dynamisme de ce processus implique nécessairement une participation active du réseau d'actine-myosine qui assure la génération de forces contractiles. La contraction du réseau d'actine, réorganisé en anneau cortical, va amener la cellule à adopter une morphologie circulaire contractée (Figure 2, page 12). Plusieurs effecteurs cellulaires sont responsables des ces changements morphologiques, la protéine ROCK-1, entre autres, y tient un rôle majeur (revu dans ¹³⁷).

ROCK-1 est une kinase spécifique aux résidus sérine/thréonine qui est activée lorsqu'elle se lie à la GTPase Rho, ce qui induit le déplacement de son domaine auto-inhibiteur et libère son site catalytique.¹³⁸ D'une part, ROCK-1 contribue à la stabilisation du filament d'actine par l'activation des kinases LIM-1 et -2^{139,140} qui vont inactiver à leur tour la cofiline, une protéine qui dégrade le filament d'actine. D'autre part, la protéine ROCK-1 active mDia1, une protéine de la famille des formines, qui favorise la polymérisation de l'actine.^{141,142} ROCK-1 peut aussi activer directement les MLC¹⁴³, inhiber les phosphatases des MLC¹⁴⁴, et supprimer l'inhibition de l'activité de la myosine induite par la calponine¹⁴⁵ et la protéine CPI-17¹⁴⁶. Globalement, ROCK-1 participe à la génération de forces contractiles par le réseau d'actine-myosine et, ainsi, soutient la régulation de processus de migration, d'adhésion et de phagocytose dans un contexte cellulaire non apoptotique (Figure 3, page 13).

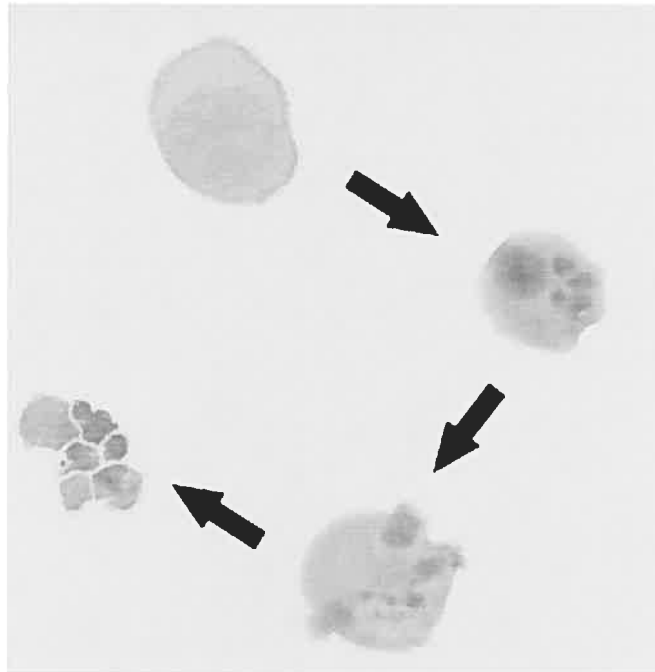


Figure 2 : Le destin d'une cellule en culture (Namalwa) exposée à l'étoposide. La cellule adopte une morphologie arrondie et contractée. La chromatine se condense et le noyau se fragmente. Suite à la dissolution de la cellule, le contenu intracellulaire se retrouve réparti dans de petites vésicules provenant des bourgeonnements (*blebs*) de la membrane : les corps apoptotiques.

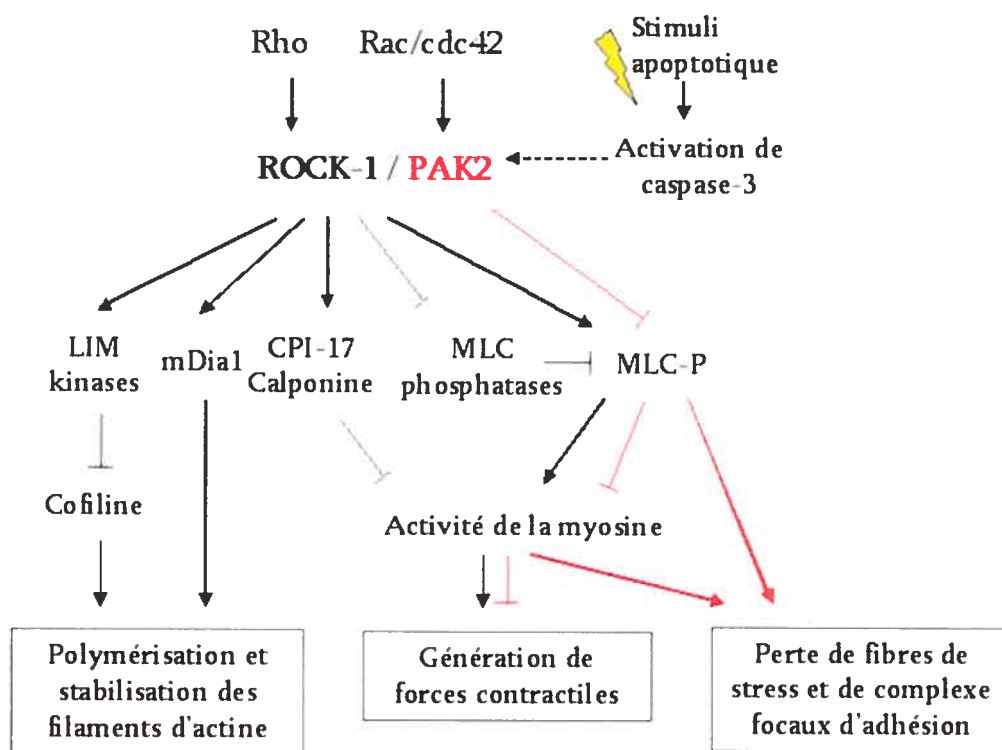


Figure 3 : Les voies de signalisation des protéines kinases ROCK-1 (en noir) et PAK2 (en rouge). Ces protéines kinases, bien qu'elles agissent globalement sur les mêmes cibles protéiques, prendront part à des processus cellulaires différents, hormis bien sûr l'apoptose.

Cependant, la protéine ROCK-1 est une cible de la caspase-3, qui pourra l'activer dans un contexte apoptotique. La caspase-3 va cliver le domaine auto-inhibiteur de ROCK-1 afin de générer une forme tronquée très active. Cette forme tronquée de ROCK-1 agit essentiellement sur les mêmes cibles que la forme entière mais les effets sur celles-ci seront plus importants et les conséquences, dramatiques pour la cellule.¹⁴⁷ À mesure que la contraction du réseau d'actine-myosine progresse, la pression intracellulaire croissante va créer des bourgeonnements (*blebbing*) au niveau des régions de la membrane cellulaire où les liens avec le cytosquelette sont moins solides. Ceux-ci constitueront les précurseurs des corps apoptotiques.¹⁴⁸ (Figure 2, page 12) De plus, il a été montré que ROCK-1, activée dans un contexte apoptotique, est essentielle et suffisante au processus de bourgeonnement caractéristique de la membrane de la cellule en apoptose et à la formation des corps apoptotiques.^{149,150}

D'autres effecteurs cellulaires peuvent être ainsi activés et contribuer aux changements morphologiques associés à l'apoptose. La protéine PAK2, une kinase du même type que ROCK-1, est stimulée par deux autres petites GTPases, Cdc42 et Rac, et participe à la formation de structures dynamiques périphériques telles que l'ondulation (*ruffle*) de la membrane et les structures de lamellipodia et de filopodia par l'entremise de cibles protéiques identiques pour la plupart à celles de ROCK-1, et ce, nonobstant l'activité kinase de PAK2 qui ne soit pas requise pour ces processus.^{151,152} (Figure 3, page 13). Cependant, ses actions sur le cytosquelette diffèrent de celles de ROCK-1 puisque la forte activité kinase de PAK2 induit une perte de fibres de stress et des complexes focaux d'adhésion, possiblement attribuable à la déstabilisation du complexe actine-myosine et par l'inhibition des kinases des MLC.^{153,154} Le clivage de PAK2 par la caspase-3, engendre une forme de 34 kDa constitutivement active qui provoque ces mêmes

modifications sur le cytosquelette.¹⁵³ Aussi, PAK2 semble être requise à la formation des corps apoptotique dans certains modèles puisque des cellules exprimant un forme dominante négative sont incapables de produire des corps apoptotiques.¹⁵⁵ Enfin, on associera à PAK2 activée par la caspase-3, une implication significative dans le démantèlement des fibres d'actine et des structures du cytosquelette.¹⁵⁵ D'autres effecteurs cellulaires sont aussi susceptibles de participer à ce processus, soit les protéines kinases SLK¹⁵⁶, MST1¹⁵⁷ et p38MAPK.¹⁵⁸

Un nombre considérable de protéines structurales du cytosquelette cytoplasmique et nucléaire seront victimes de la protéolyse par les caspases effectrices. On retrouve ainsi des protéines associées aux microfilaments d'actine telles que la gelsoline¹⁵⁹, Gas2¹⁶⁰, la fodrine, les α II- et β II-spectrines¹⁶¹ et la filamine¹⁶², des protéines constituant les filaments intermédiaires telles que la kératine-18¹⁶³ et la vimentine¹⁶⁴ et des protéines de la membrane nucléaire telles que la lamine A et B¹⁶⁵, LAP2¹⁶⁶, et Nup153¹⁶⁶. Le clivage par les caspases de ces constituants du cytosquelette provoquera la perte des jonctions avec la membrane et contribuera à la destruction de la cellule apoptotique. En outre, il a été montré que la désorganisation du cytosquelette permettait d'accélérer l'activation de la caspase-3, ce qui conduirait, en quelque sorte, à l'emballlement de la cascade apoptotique.¹⁶⁷

Finalement, la condensation cellulaire va se poursuivre jusqu'à ce que les contractions du réseau d'actine-myosine deviennent suffisantes pour séparer les bourgeonnements remplis du contenu intracellulaire de la membrane (Figure 2, page 12). Ainsi, la condensation cellulaire, combinée à la destruction du

cytosquelette conduira à la formation des corps apoptotiques qui seront éliminés de l'environnement adjacent en ne laissant pas ou peu de traces de la cellule.^{147,154}

9.5 Le contrôle de l'activation des caspases

Avec des conséquences aussi dramatiques sur la cellule, l'activation de la machinerie apoptotique nécessite une régulation fine et efficace. Globalement, le sort de la cellule dépendra de l'équilibre entre l'action des molécules pro-apoptotiques et celle des molécules anti-apoptotiques. Ainsi, la cellule possède de nombreuses ressources qui la protègent du recrutement spontané de caspases aux récepteurs de mort cellulaire, de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et de l'activation inopinée des caspases (revu dans ¹⁶⁸). Ces dernières vont être contrôlées par divers mécanismes tels que la régulation de leur transcription, un phénomène associé à la réponse cellulaire aux agents toxiques de la pharmacopée anti-cancéreuse et au développement de la résistance cellulaire à ceux-ci.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Les modifications post-traductionnelles contribuent aussi à la régulation des caspases. Par exemple, la phosphorylation de la caspase-9, opérée par Ras ou la kinase Akt, supprimera son activité protéolytique.¹⁷² La compartimentation sub-cellulaire, quant à elle, fait en sorte d'empêcher les protéines pro-apoptotiques d'interagir physiquement.¹⁷³⁻¹⁷⁶ La mitochondrie en est un bon exemple. On retrouve dans l'espace intermembranaire de cette organelle une panoplie de molécules pro-apoptotiques incluant le puissant inducteur apoptotique qu'est le cytochrome *c*^{71,72}, les protéines Smac/DIABLO^{65,66}, OMI/Htra2⁶⁷⁻⁶⁹, XAF1⁷⁰, AIF⁷³, EndoG⁷⁴ ainsi qu'une réserve de procaspases-2, -3, -8 et -9.⁷⁵⁻⁷⁸ Suite à l'activation de la voie mitochondriale (Figure 1, page 3), la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie va entraîner la relâche de ces facteurs dans le cytosol qui pourront interagir pour favoriser globalement la

cascade des caspases et l'induction de l'apoptose (revu dans ¹⁷⁷). Par ailleurs, les caspases sont sensibles à la dégradation protéosomale, ce qui confère à la voie de l'ubiquitine/protéasome un rôle de régulateur apoptotique (revu dans ¹⁷⁸). Enfin, il existe des isoformes issues de l'épissage alternatif des gènes de certaines caspases, incluant les caspases-2, -6, -7, -8, -9 et -10 (revu dans ¹⁷⁹) dont quelques-unes vont posséder des propriétés anti-apoptotiques. Par exemple, l'isoforme courte de la procaspase-9, la procaspase-9b, à laquelle il manque la portion correspondante au précurseur d'une sous-unité de l'enzyme active, interfère avec la formation de l'apoptosome et l'activation subséquente de la voie mitochondriale.^{180,181} Une isoforme de la caspase-8, la caspase-8 α 3, agit sensiblement de la même façon : celle-ci entrave l'activation de la voie des récepteurs de mort cellulaire Fas et TNFR1.¹⁸² Les isoformes issues de l'épissage alternatif constitueraient un moyen supplémentaire de régulation de l'activation de la cascade des caspases.

9.6 La caspase-2

Le gène de la caspase-2, auparavant connue sous NEDD-2 ou Ich-1, a été décrit initialement en relation avec le développement neuronal chez les mammifères.¹⁸³ La suppression du gène de la caspase-2 dans les souris révéla une intrigante complexité dans les rôles joués par ce gène dans le processus apoptotique. D'abord, on retrouva chez les femelles une quantité anormalement élevée de cellules germinales dans les ovaires ainsi que des oocytes résistants à l'apoptose induite par des agents génotoxiques.¹⁸⁴ À l'opposé, les neurones du système nerveux sympathique présentaient une sensibilité accrue à l'apoptose suivant leur privation en facteurs de croissance, comparativement aux mêmes

cellules chez les animaux normaux.¹⁸⁴ Il apparaissait alors que ce gène pouvait accomplir des fonctions opposées dans la signalisation de l'apoptose.

Effectivement, l'épissage alternatif de l'ARNprém de la caspase-2 conduit à la production de quatre isoformes distinctes aux propriétés opposées: la procaspase-2L, longue de 435 acides aminés et homologue à ICE/Ced-3, provoque la mort cellulaire lorsqu'elle est surexprimée tandis que la procaspase-2S, amputée de 123 acides aminés, confère une protection contre l'apoptose^{185,186} (Figure 4, page 19). Les deux autres isoformes, soit les caspases-2L-Pro et -2S-Pro, qui ne possèdent que des portions incomplètes correspondant aux prodomaines des isoformes auxquelles elles sont associées, interfèrent avec l'activation de la cascade apoptotique¹⁸⁷ (Figure 4, page 19). Par ailleurs, l'augmentation de la transcription et de l'épissage de l'ARNprém du gène de la caspase-2, conduisant à l'accroissement de la présence de l'ARNm de la procaspase-2S, a été observée *in vitro* dans les lignées cellulaires U937, HL60 et HeLa exposées à des drogues endommageant l'ADN, suggérant que cette isoforme soutient un phénomène de résistance à la chimiothérapie associé à certains cancers, ou provoque certains effets secondaires dont l'inflammation.^{169,188,189} Enfin, l'augmentation de la production d'ARNm de la procaspase-2S a été aussi constatée *in vivo* dans les cellules mousseuses dérivées des macrophages (*macrophage-derived foam cells*) au niveau des plaques athérosclérotiques¹⁹⁰, attribuant à la procaspase-2S une fonction d'inhibiteur naturel de la cascade des caspases qui favorise la survie cellulaire, dans ce cas-ci des macrophages exposés à divers agents cytotoxiques produits par les plaques d'athéroscléroses.

La procaspase-2L, qui est pro-apoptotique, se distingue des autres procaspases par une structure unique. D'une part, elle possède un long

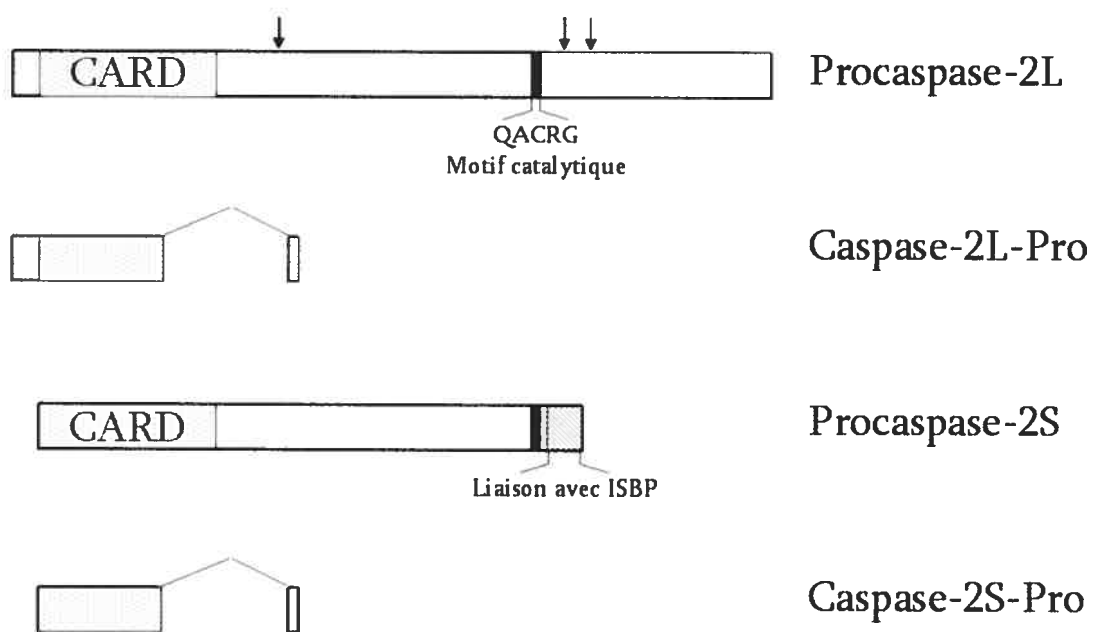


Figure 4 : La structure schématisée des quatre différentes isoformes de la caspase-2. Les flèches indiquent les sites de clivage qui mèneront à la formation de la caspase-2L active. Les sauts de lecture de l'épissage de l'ARNprém sont représentés pour les caspases-2L-Pro et -2S-Pro ainsi que les principaux motifs d'interaction protéine-protéine.

prodomaine contenant le module d'interaction protéine-protéine CARD lui permettant d'être recrutée par une protéine adaptatrice possédant le même module et d'initier potentiellement la cascade des caspases (Figure 4, page 19). D'autre part, elle présente une spécificité enzymatique très proche de celle des caspases effectrices⁵⁸ (Figure 4, page 19). Malgré le double rôle pressenti de cette caspase, ainsi que la démonstration de sa participation dans le processus apoptotique de types cellulaires et de stimulus variés^{186,191-195}, on lui attribuait difficilement jusqu'à récemment une action précise. De surcroît, le phénotype des souris déficientes pour le gène de la caspase-2 n'était pas aussi dramatique, puisque non létal, que celui des souris déficientes pour d'autres caspases¹⁸⁴, ce qui suggérait que les produits du gène de la caspase-2 devaient jouer des rôles de moindre importance au sein de la machinerie apoptotique ou encore des fonctions redondantes dans celle-ci, assumées par d'autres caspases dans les cellules de ces souris.¹⁹⁶

Certaines évidences confirmèrent son rôle de caspase effectrice. On peut observer l'activation de la caspase-2L suite à la protéolyse de son zymogène, requérant l'action de la caspase-3¹⁹⁷ ou de la protéine adaptatrice Apaf-1 et de la caspase-9^{198,199}, et on lui découvrit au moins un substrat privilégié, soit la golgin-160.¹⁷⁴ D'autres observations imputèrent un rôle à la caspase-2L dans l'initiation de la cascade apoptotique. Bien que la caspase-2L ne puisse pas activer d'autres procaspases sauf elle-même²⁰⁰, plusieurs études indiquent qu'elle peut induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et permettre la relâche dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques entraînant la mort de la cellule.^{93,97,98,201-204} Toutefois, le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à son activation demeure(nt) vague(s). D'abord, on reconnaît que deux molécules de procaspase-2L peuvent s'homodimériser par l'entremise de leurs prodomaines et s'activer mutuellement

par auto-protéolyse.^{205,206} De plus, la caspase-2L peut exercer son action sur la mitochondrie malgré l'absence d'activité enzymatique.²⁰⁷ Enfin, l'activation de la caspase-2L peut s'effectuer par oligomérisation dans un complexe indépendant d'Apaf-1.⁹⁴ Ainsi parmi plusieurs protéines adaptatrices proposées comme partenaires à la formation d'un tel complexe, citons les protéines RAIDD/CRADD⁸⁴, PACAP⁵⁰, DEFCAP⁵¹, et PIDD.¹⁰⁰ Cette dernière semble être une solide candidate depuis qu'il a été montré que PIDD pouvait former *in vivo* un complexe tri-moléculaire stable comprenant la protéine RAIDD/CRADD et la procaspase-2L et conduire à l'activation de la caspase-2L.¹⁰⁰ Toutefois, on s'interroge encore sur la signification physiologique de ce complexe puisqu'à lui seul, il est insuffisant pour induire l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires, malgré une fraction notable du réservoir de caspase-2L activée.¹⁰⁰ L'induction de l'apoptose dans ces cellules par le complexe procaspase-2L-RAIDD/CRADD-PIDD nécessiterait la contribution d'un second signal inconnu associé au stress cellulaire, ce qui relativise l'importance de ce complexe d'activation de la caspase-2L dans l'initiation de la cascade apoptotique induite par ce type de stimulus.¹⁰⁰ Par ailleurs, des interrogations demeurent quant à la localisation sub-cellulaire d'un tel complexe d'activation puisque la caspase-2L peut être recrutée au récepteur de mort cellulaire TNFR1 stimulé⁸⁵, dans le noyau¹⁷³, dans le réseau de Golgi¹⁷⁴ ou dans le cytoplasme¹⁹⁹ pour y former un complexe protéique.

Quant à elle, la procaspase-2S exerce des activités anti-apoptotiques complexes. Dans le laboratoire, il a été remarqué que la surexpression de la procaspase-2S dans la lignée monocyttaire U937 pouvait moduler l'apoptose induite par des dommages à l'ADN, notamment en inhibant sélectivement la condensation de la chromatine, l'externalisation de phosphatidylsérines à la membrane et la formation de corps apoptotiques.²⁰⁸ Un tel phénotype suggère que

la procaspase-2S pourrait avoir une contribution singulière à la cascade des caspases. Une interaction spécifique de la procaspase-2S avec la protéine ISBP a déjà été décrite.²⁰⁹ L'interaction de la procaspase-2S avec ISBP prévient partiellement la protéolyse et l'activation de la caspase-2L induite par l'activation du récepteur de mort cellulaire TNFR1.²⁰⁹ Cependant, l'inhibition partielle de l'activation de la caspase-2L peut difficilement expliquer à elle seule le phénotype complexe observé avec les cellules U937 surexprimant la procaspase-2S. D'abord, le motif catalytique de la caspase-2L, préservé sur la procaspase-2S (Figure 4, page 19) est essentiel pour provoquer les effets observés dans les cellules U937²⁰⁸, mais n'est pas requis pour l'interaction avec la protéine ISBP²⁰⁹ (Figure 4, page 19). Ensuite, on impute à la caspase-3 des rôles dominants dans la signalisation cellulaire conduisant à certaines modifications morphologiques associées à l'apoptose, dont celles retrouvées avec le phénotype complexe des cellules U937 surexprimant la procaspase-2S.²¹⁰⁻²¹² Finalement, le rôle de la caspase-2L dans la cascade des caspases est loin d'être élucidé.

10. PERTINENCE DU PROJET

La surexpression de la procaspase-2S, dans la lignée monocyttaire U937 exposée à des substances génotoxiques, conduit à l'inhibition sélective de la condensation de la chromatine, de l'externalisation de phosphatidylsérines à la membrane et de la formation de corps apoptotiques, soulignant ainsi la complexité des rôles anti-apoptotiques assumés par cette caspase.²⁰⁸ Les implications physiologiques de ces propriétés inhibitrices de la procaspase-2S sont considérables. L'exposition à la membrane de phosphatidylsérines est primordiale pour l'élimination rapide des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires environnantes.^{3,213} Ce processus permet aussi d'éviter une réponse inflammatoire de l'organisme au site de la mort de la cellule en diminuant l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires par les cellules phagocytaires professionnelles et en augmentant celle des gènes des cytokines anti-inflammatoires.²¹⁴ Ainsi, la phagocytose des corps apoptotiques permettrait aux cellules immunocompétentes d'entrer en contact avec les antigènes du soi dans un contexte où la modulation de l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires permet d'inhiber une éventuelle réaction immunitaire. Par conséquent, cela pourrait conférer vraisemblablement un rôle au processus apoptotique dans la reconnaissance du soi au cours du développement.²⁶

De plus, l'augmentation de l'ARNm de la procaspase-2S a été observée *in vitro* dans quelques lignées cellulaires exposées à des agents génotoxiques^{169,188,189}, ainsi qu'*in vivo* dans les cellules mousseuses dérivées des macrophages (*macrophage-derived foam cells*) retrouvées au niveau des plaques athérosclérotiques.¹⁹⁰ L'accroissement de la procaspase-2S anti-apoptotique pourrait, dans le premier cas, contribuer au développement de certains effets

secondaires associés aux traitements chimiothérapeutiques, dont la résistance de cellules cancéreuses aux substances toxiques utilisées. Dans le second cas, cette isoforme pourrait globalement favoriser la survie des cellules mousseuses dérivées des macrophages exposées à divers agents cytotoxiques produits dans l'environnement des plaques d'athéroscléroses. Il sera donc intéressant, dans ces contextes, de mieux comprendre le ou les mécanismes d'inhibition particuliers à la procaspase-2S.

Une étude a permis de mettre à jour un mécanisme par lequel la procaspase-2S exerce ses fonctions anti-apoptotiques, soit une inhibition partielle de l'activation de la caspase-2L.²⁰⁹ Cependant, il semble, au travers du phénotype complexe induit par la surexpression de la procaspase-2S dans les cellules U937, que les activités anti-apoptotiques de la procaspase-2S se déroulent aussi à d'autres niveaux. L'inhibition de l'activité de la caspase-3 et, conséquemment, de l'action de certaines protéines dont l'activation est dépendante de la caspase-3²¹⁰, apporterait une explication plausible aux transformations biochimiques et morphologiques associées à l'apoptose altérée dans les cellules U937 surexprimant la procaspase-2S.

Nos travaux présentés dans ce mémoire démontrent qu'il existe une interaction entre la procaspase-2S et la procaspase-3 dans les cellules Namalwa, d'origine monocytaire, lorsque la procaspase-2S est surexprimée. Cette interaction prévient l'activation de la caspase-3 et, conséquemment, empêche entre autres la formation des corps apoptotiques dans les cellules Namalwa exposées à un agent endommageant l'ADN. Ces résultats contribuent à mieux définir les cibles de la procaspase-2S et ses mécanismes inhibiteurs de la cascade apoptotique.

11. HYPOTHÈSE

La surexpression de l'isoforme de la procaspase-2S dans les cellules humaines leucémiques prévient la formation des corps apoptotiques par son interaction avec la procaspase-2L et/ou la procaspase-3, altérant l'activation dépendante des caspases de protéines kinases associées à la formation des corps apoptotiques.

12. APPROCHES EXPÉRIMENTALES

Nous utilisons comme modèle cellulaire, la lignée monocyttaire humaine Namalwa, originaire d'un lymphome de Burkitt. Cette lignée cellulaire est utilisée depuis longtemps dans le domaine de la cancérologie et dans le laboratoire^{215,216}, et constitue un modèle de choix pour les études sur l'apoptose. Cette lignée est transfectée à l'aide du vecteur d'expression épisomale pCEP4-HA-CASP-2S afin de surexprimer la protéine HA-procaspase-2S. L'épitope HA facilite l'immunodétection et l'immunoprécipitation de la procaspase-2S en raison de la faible immunoréactivité des anticorps dirigés contre cette protéine qui sont actuellement disponibles commercialement.

L'étoposide constitue l'agent inducteur de l'apoptose. Les épipodophyllotoxines, telles que l'étoposide, sont communément prescrites pour la chimiothérapie de certains cancers. Elles induisent des bris double brin dans la molécule d'ADN en stabilisant un intermédiaire transitoire d'une réaction enzymatique effectuée par la topoisomérase de type II au cours de laquelle l'enzyme est liée de manière covalente à l'extrémité 5' du duplex d'ADN. Par ailleurs, l'étoposide est utilisée depuis plusieurs années dans de nombreuses études sur l'apoptose (revu dans ²¹⁷).

Les effets de la procaspase-2S sur l'apoptose induite par l'étoposide dans notre modèle cellulaire sont d'abord analysés de *visu* en microscopie à fluorescence, ce qui nous permet de suivre les changements morphologiques typiques de la cellule apoptotique tels que la condensation cellulaire et de la chromatine, le bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation des corps apoptotiques. Ce dernier processus est quantifié dans le temps par

cytométrie de flux en comparant la taille et de la granulosité des cellules suivant leur exposition à l'étoposide.

Au niveau biochimique, les effets de la surexpression de la procaspase-2S dans les cellules Namalwa en apoptose induite par l'étoposide sont étudiés à l'aide de techniques d'immunobuvardage (*Western Blot*) destinées à apprécier l'activation par clivage de quelques procaspases impliquées dans la cascade apoptotique ainsi que des principales protéines kinases responsables des changements morphologiques. De plus, la fragmentation internucléosomale de l'ADN, une caractéristique apoptotique reconnue, est étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'apprécier la fragmentation, ainsi qu'à l'aide d'une technique sur filtre permettant de quantifier le phénomène.

13. Procaspase-2S inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing ROCK-1-mediated apoptotic blebbing and body formation in human B lymphoma Namalwa cells

Nicolas Parent¹, Alain-Théophile Sané¹, Nathalie Droin^{1,3} and Richard Bertrand^{1,2,4}

Centre de recherche, ⁽¹⁾Centre hospitalier de l'Université of Montréal (CHUM),
Hôpital Notre-Dame and Institut du cancer de Montréal, ⁽²⁾Département de
médecine, Université de Montréal, Montréal (Qué.) Canada.

Running title: Procaspase-2S prevents procaspase-3 activation

⁽³⁾ N.D. is now at the LaJolla Institute for Allergy and immunology, San Diego (CA). ⁽⁴⁾Correspondence to: Richard Bertrand, CR-CHUM, Hôpital Notre-Dame and Institut du cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke St. East (Room Y-5634), Montreal (Que.) Canada H2L 4M1

Phone: (514) 890 8000 ext 26615

Fax: (514) 412 7591



Manuscrit sous presse, *Apoptosis*, 15 novembre 2004

Contribution des auteurs:

N.P. est responsable des figures 1a, 1b, 1c, 1d, 2, 3 et 4a.

A.-T. S. est responsable des figures 1e et 1f.

N.D. est responsable de la figure 4b

R.B. a supervisé le travail

13.1 ABSTRACT

Procaspase-2S has been reported to selectively prevent membrane blebbing and apoptotic body formation in human monocytic-like leukemic U937 cells after etoposide (VP-16) treatment (Droin et al., *Oncogene* 20, 260-269, 2001). Here, we show that procaspase-2S overexpressed in human B lymphoma Namalwa cells inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing cleavage and activation of Rho GTPase-associated ROCK-1 kinase. Failure of ROCK-1 activation in Namalwa cells correlates with a sustained delay in the appearance of membrane blebbing and apoptotic body formation after VP-16 treatment. Reciprocal coimmunoprecipitation experiments indicate that procaspase-2S binds to procaspase-3, but not procaspase-2L and -9 in untreated and VP-16-treated Namalwa cells. These data suggest that procaspase-2S-mediated anti-apoptotic effects are associated with inhibition of the processing and activation of procaspase-3 in VP-16-treated cells.

13.2 KEYWORDS

VP-16; Caspase; ROCK-1; Apoptosis

ABBREVIATIONS

Ac-DEVD-AMC, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin; Ha-tag, hemagglutinin epitope Tag sequences; His-tag, histidine Tag sequences; PAK2, p21-activated kinase; ROCK-1, Rho-associated kinase 1; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; VP-16, etoposide; z-VDVAD-AFC, benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin.

13.3 INTRODUCTION

Programmed cell death or apoptosis is a well-known process that plays an essential role in development and tissue homeostasis, while its dysregulation is associated with various diseases, including cancer (1). Apoptosis is also a cell death mechanism triggered in cancer cells by cytotoxic drugs currently used in cancer chemotherapy (2-4). Apoptotic cells show stereotypical morphologic changes, including cell shrinkage, the convolution of plasma and nuclear membranes into blebs ultimately producing apoptotic bodies, chromatin condensation, and DNA digestion into high molecular weight and oligonucleosome-sized DNA fragments (5, 6).

This death process usually requires the activation of a series of cysteine aspartate-specific proteases referred to as caspases (7). The caspases are produced as zymogens, known as procaspases, that require proteolytic cleavage and assembly to generate an active endopeptidase. A schematic view of the proteolytic cascade activated during apoptosis involves caspases with a long prodomain (caspase-2, -8, -9, -10) as initiator enzymes that cleave and activate effector caspases with a short prodomain (caspase-3, -6, -7). In turn, these effector caspases can cleave and activate initiator caspases, provoking feedback amplification loops. Activation of the caspase proteolytic cascade ends with the cleavage of various cytosolic, cytoskeletal, nuclear and other cellular compartment proteins, resulting in systemic and orderly morphological changes with the eradication of cells undergoing apoptosis (8-12).

Essential features of apoptosis are the formation of membrane blebs and cell dismantling, evoking the release of apoptotic bodies. These membrane-bound apoptotic bodies package cell remains, cellular organelles and fragments of

condensed chromatin that will be recognized and engulfed by neighbouring and specialized cells. Caspase inhibition has been shown to inhibit apoptotic body release (13), and further studies have revealed that membrane blebbing and apoptotic body formation require important cytoskeleton remodeling (14, 15). Upon cleavage by caspase-3, protein kinases associated to the Rho GTPase family, including ROCK-1 (Rho-associated kinase 1) and PAK2 (p21-activated kinase), acquired a new function that leads to actin stress fibre remodeling, provoking actin-myosin contractile force and disassembly (16-19).

Recently, by analyzing the protective effect mediated by the short isoform of CASP-2 gene, referred as procaspase-2S, we reported that its overexpression selectively prevented some phenotypic aspects of apoptosis, including membrane blebbing and apoptotic body formation in human monocytic-like leukemic U937 cells after etoposide (VP-16) treatment (20). To better understand the mechanisms by which procaspase-2S mediates its protective effect on membrane blebbing and apoptotic body formation, in this study we have derived an additional cell line expressing procaspase-2S bearing an hemagglutinin (HA)-epitope tag to facilitate its detection and immunoprecipitation. We show that HA-procaspase-2S, overexpressed in human B lymphoma Namalwa cells, binds to and inhibits endogenous procaspase-3 processing and activation, preventing ROCK-1 cleavage and activation. Our data suggest that inhibition of ROCK-1 activation provokes a sustained delay of membrane blebbing and apoptotic body formation after VP-16 treatment.

13.4 MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The radioactive precursor [2-¹⁴C]-thymidine (59 mCi/mmol) was obtained from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). VP-16 and Hoescht 33342 were procured from the Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO). The fluorogenic peptide derivatives acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (z-VDVAD-AFC) were acquired from Calbiochem-Novobiochem Corporation (San Diego, CA). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from the Sigma-Aldrich Company, ICN BioMedicals or other local sources.

Cell culture, transfection, drug treatment and DNA labeling. The human B lymphoma Namalwa cell line obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) was grown in suspension at 37°C under 5% CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY). Human procaspase-2S cDNA was amplified from pTarget-ProCasp-2S vector (20), using specific adapter primers containing *NotI* sequences at the ATG start codon and TAA stop codon. The amplified fragment was first cloned in pCR2.1-Topo vector (TA cloning system; Invitrogen, San Diego, CA), sequenced, and then subcloned at the *NotI* restriction site in the eucaryotic expression vector pCEP4 (Invitrogen) that had been modified to include hemagglutinin epitope Tag sequences (HA-tag) and Kosak consensus sequences (21). Purified pCEP4 (mock vector) and pCEP4-HA-ProCasp-2S vectors were transfected in cells by electroporation at 0.27 kVolts (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA) and grown under hygromycin selection at 1.5 mg/ml for 2 to 3

months to obtain stable lines prior to performing the experiments. Exponentially-growing cells were used in all experiments at a concentration of 5×10^5 cells/ml. They were treated with VP-16 at a concentration of 50 μ M. For DNA labeling, the cells were grown with [14 C]-thymidine (0.02 μ Ci/ml) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to drug treatment (4).

Analysis of DNA fragmentation. The kinetics of DNA fragmentation were monitored and quantitated by DNA filter elution assays (4). The results are expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in untreated cells, according to the formula $(F-F_0/1-F_0) \times 100$, where F and F_0 represent DNA fragmentation in treated and untreated cells, respectively (4). To visualize oligonucleosome-sized DNA fragmentation, cellular DNA was extracted and DNA electrophoresis was performed on 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0) prior to ethidium bromide staining (4).

Caspase activities. Control and drug-treated cells were homogenized at 4°C for 30 min in lysis buffer containing 100 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol and 0.1% NP-40. The samples were centrifuged (10,000 g for 10 min at 4°C), and supernatants collected. Caspase activity was measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence LS 50B fluorometer (Perkin-Elmer) at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm for the substrate Ac-DEVD-AMC, and at an excitation wavelength of 400 nm and an emission wavelength of 505 nm for the substrate z-VDVAD-AFC. Reactions were conducted in cuvettes, and temperature was maintained at 37°C with a water-jacketed sample compartment. DEVDase and VDVADase activities were studied in reaction buffers containing 100 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 200 μ M fluorogenic

peptide substrates and 200 μ g cell extracts, and 100 mM MES (pH 6.3) 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 200 μ M fluorogenic peptide substrates and 200 μ g cell extracts, respectively. Enzyme activities were determined as initial velocities (relative intensity $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$).

Morphologic analysis. Nuclear chromatin was stained with Hoechst 33342 for 30 min at 37°C to identify morphologic changes by fluorescence microscopy. Images were generated with a Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a thermoelectrically-cooled CCD camera (Model DC330E, DageMTI Inc., Michigan City, IN) and Clemex Vision software (Version 3.0.036, Clemex, Longueuil, QC, Canada). Flow cytometry monitoring of granularity and size was performed on a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer.

Western blots and immunoprecipitation experiments. To prepare total protein extracts, cells were washed twice in PBS and homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5mM EGTA, 4 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate and a cocktail of protease inhibitors (Complete™, Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada) at 4°C for 30 min, centrifuged, and the supernatants collected. For coimmunoprecipitation experiments, 5% BSA (w/v) was added to lysis buffer, and the supernatants were incubated overnight with primary antibodies (10 μ g/ml) at 4°C. Immunocomplexes were captured with a protein A- and G-Sepharose mixture followed by several washes prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The primary antibodies included anti-HA mouse monoclonal antibody (clone 12CA5, Roche Molecular Biochemicals), anti-His peptide-tag polyclonal antibodies (H-15, Santa-Cruz Biotechnology), anti-caspase-2 mouse monoclonal (clone G310-148, BD

Biosciences) and rabbit polyclonal antibodies (GA-325, Biomol Research Laboratory), anti-caspase-3 rabbit polyclonal (556425, BD Biosciences) and mouse monoclonal antibodies (C92-605, BD Biosciences), anti-caspase-7 mouse monoclonal antibody (556541, BD Biosciences), anti-caspase-6 mouse monoclonal antibody (68041A, BD Biosciences), anti-caspase-9 mouse monoclonal antibody (551246, BD Biosciences), anti-PAK1/PAK2 rabbit polyclonal antibody (557053, BD Biosciences), anti-ROCK-1 mouse monoclonal antibody (clone 46, BD Biosciences), anti- β -actin mouse monoclonal antibody (clone AC-40, Sigma), and nonspecific normal rabbit and mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) as controls. The secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse Ig and donkey anti-rabbit Ig detected by enhanced chemiluminescence using reagents from Amersham Life Science.

Recombinant His-procaspase-2S protein and *in vitro* cell-free assay. *EcoRI* and *XhoI* linker sequences were added to the human procaspase-2S cDNA by PCR, at the ATG start codon and the TAA stop codon, respectively. The PCR products were first inserted in the pCR-Topo1 vector (In Vitrogen) and then subcloned in the bacterial expression vector pET-30a (+)-His8-Tag (Novagen). Proteins were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3) induced for 15 h at 100 μ M IPTG at room temperature. Bacteria were collected by centrifugation and resuspended in 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9) and samples were sonicated on ice. Following centrifugation (12 000 X g, 20 min) bacterial lysates were applied to a charged and equilibrated Chelating Sepharose chromatography column (Amersham-Pharmacia Biotech). Columns were washed with 10 vol of 5 mM imidazole, 0.5 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 vol of 50 mM imidazole, 0.5 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), and the bound protein eluted with 6 vol of 1.0 M imidazole, 0.5 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9). Proteins were

concentrated and dialyzed several times using Centricon^R Plus-20 centrifugal device (Millipore) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie Blue R-250 staining (not shown) determined purity of purified proteins.

For the *in vitro* cell-free assay, cell extracts were generated from U-937 cells as described elsewhere (22-24). Briefly, 2×10^8 cells were swelled for 20 min on ice, in a cell extraction buffer containing 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 100 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin and 2 µg/ml aprotinin prior to dounce-type cell homogenization. After centrifugation at 15,000 x g for 15 min at 4°C, the supernatants were collected. These extracts (200 µg cell-free extract per assay) were incubated in the presence or absence of 50 µg/ml cytochrome c and 1.0 mM dATP (to promote caspase activation), in the absence or presence of 1.0 µg recombinant His-procaspase-2S protein. Immunoprecipitation experiments were performed incubating the extracts with anti-His peptide-tag polyclonal antibodies at 4°C for 15 h. Immunocomplexes were captured with a protein A- and G-Sepharose mixture followed by several washes prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

13.5 RESULTS

Stable procaspase-2S overexpression in Namalwa cells inhibits caspase activation and DNA fragmentation induced by VP-16. Human B lymphoma Namalwa cells are highly sensitive to DNA damage and rapidly die by apoptosis after short treatment with DNA-damaging agents like VP-16, a DNA topoisomerase II inhibitor. The apoptotic death of these cells is associated with rapid activation of

the proteolytic caspase cascade, DNA fragmentation, and the typical morphological changes of apoptotic cell death (24, 25). To further study the role of the short isoform of CASP-2 gene, stable transfected Namalwa cells expressing HA-procaspase-2S were derived (Fig. 1a). After VP-16 treatment, procaspase-2S overexpression weakly delayed procaspase-2L activation (Fig. 1b), measured by disappearance of the precursor protein, but surely slowed procaspase-3 activation (Fig. 1c), measured by disappearance of the precursor protein at 32 kDa and the appearance of the active p17 cleavage fragment (26, 27), compared to control empty vector-transfected cells. Similarly, the kinetics of both caspase-2L-like (VDVADase) and caspase-3-like (DEVDase) activities were retarded in Namalwa cells overexpressing procaspase-2S compared to control cells after VP-16 treatment (Fig. 1d). The kinetics of DNA fragmentation, visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining (Fig. 1e), and quantitated by DNA elution assay (Fig. 1f), were negligible for the first 8 h after VP-16 treatment in cells overexpressing procaspase-2S compared to control cells, suggesting that caspase-3 like activation is required for DNA fragmentation in Namalwa cells.

Procaspase-2S overexpression prevents membrane blebbing and apoptotic body formation in Namalwa cells. It has been reported previously that procaspase-2S overexpression selectively delays chromatin condensation, membrane blebbing and apoptotic body formation in U937 cells after VP-16 treatment (20). To explore the effect of procaspase-2S overexpression in Namalwa cells, the kinetics of chromatin condensation and the appearance of membrane blebbing and apoptotic body formation were first investigated by Hoescht 33342 staining and microscopy analysis. Stereotypical morphologic modifications, including global cellular shrinkage, membrane blebbing, nuclear condensation and cell breakdown into apoptotic bodies, were observed in Namalwa cells rapidly after VP-16 treatment

(Fig. 2a; left panels). In contrast, these events were heavily retarded in cells overexpressing procaspase-2S (Fig. 2a; right panels). Flow cytometry was then used to monitor granularity and size of the cells after VP-16 treatment. Both granularity and size scatters decreased more rapidly in Namalwa compared to Namalwa overexpressing procaspase-2S (Fig. 2b). These experiments confirmed that apoptotic body formation was significantly delayed in procaspase-2S-overexpressing Namalwa cells, in accordance with previous observations in U937 cells (20).

ROCK-1 kinase activation is inhibited in procaspase-2S-transfected Namalwa cells. Several protein kinases linked to the Rho GTPase family associated with cytoskeleton remodeling participate in membrane blebbing and apoptotic body formation during apoptosis, including PAK2 and ROCK-1 (16-19). Active fragments of these kinases acquire new functions upon activation mediated by caspase-3 cleavage during apoptosis. To examine the procaspase-2S-mediated effect on PAK2 and ROCK-1 activation, the kinetics of their cleavage were monitored in empty vector-transfected and procaspase-2S-Namalwa cells after VP-16 treatment (Fig. 3). PAK2 cleavage was indirectly measured by the disappearance of native 62-kDa protein (Fig. 3a), while ROCK-1 activation was observed by cleavage of native 160-kDa protein into the active 131-kDa fragment (Fig. 3b). PAK2 was weakly processed in control Namalwa cells and procaspase-2S overexpression granted weak protection from PAK2 cleavage 30-h after VP-16 treatment (Fig. 3a). In contrast, ROCK-1 cleavage was observed as soon as 4-h in control Namalwa cells after VP-16 treatment and protection was much more pronounced for ROCK-1 cleavage in procaspase-2S-Namalwa cells (Fig. 3b). These results pinpointed the procaspase-2S-mediated effect on ROCK-1 cleavage and activation that correlates with membrane blebbing and apoptotic body formation

in Namalwa cells. In turn, cleavage and activation of PAK2 that occur only 30-h post treatment, did not seem as an early event for membrane blebbing and apoptotic body formation in Namalwa cells.

Procaspase-2S interacts with procaspase-3 in Namalwa cells. To determine how procaspase-2S exerts its inhibiting properties in the apoptotic molecular cascade, a series of reciprocal coimmunoprecipitation experiments were performed. Coimmunoprecipitation in cell extracts obtained from untreated and VP-16-treated HA-procaspase-2S-Namalwa cells with anti-HA revealed the presence of procaspase-3 within the immune complex (Fig. 4a, upper panels). To confirm these results, reciprocal experiments were conducted in which procaspase-3 was immunoprecipitated from the cell extracts. Analysis of the immune complexes showed the presence of HA-procaspase-2S co-precipitated with procaspase-3 (Fig. 4a, lower panels). Similar coimmunoprecipitation experiments with anti-HA were undertaken to detect other caspases, including procaspase-2L and -9 (data not shown). With the antibodies deployed in these experiments, procaspase-2S interacted preferentially with procaspase-3 compared to procaspase-2L and -9 in untreated and VP-16-treated Namalwa cells. To further confirm interaction between procaspase-2S and procaspase-3, an *in vitro* cell-free system was deployed. First, recombinant His-procaspase-2S protein was generated, and purified protein was added or not, into cell-free extracts in which procaspases could be activated by the addition of cytochrome c and dATP (22-24). Coimmunoprecipitation performed in cell-free extracts with anti-His revealed the presence of procaspase-3 within the immune complex in unstimulated (minus cytochrome c/dATP) and stimulated (+ cytochrome c/dATP) cell-free extracts (Fig. 4b). Moreover procaspase-2S interacted preferentially with procaspase-3 compared to procaspase-9, -7 and -6 in those cell-free extracts (Fig. 4b).

13.6 DISCUSSION

The importance of caspase activation during apoptosis has become apparent in the last few years. The caspases participate in a proteolytic cascade that is activated in response to various stimuli including anticancer drugs, and results in systematic and orderly eradication of the cell (8-12). Several regulatory mechanisms of the caspase cascade have been identified, including the induced-proximity model (9), proteolytic activation of inactive zymogens and inhibition by conserved inhibitors of apoptosis (28), transcriptional regulation and alternative splicing (29-33), post-translational modifications (34-36), ubiquitination-mediated proteasome degradation (37, 38) and subcellular compartmentalization (39-42).

CASP-2 gene generates 4 distinct mRNA isoforms, including procaspase-2L that provokes cell death, and 3 anti-apoptotic isoforms, procaspase-2S, caspase-2L-Pro and caspase-2S-Pro (23, 29). While caspase-2L-Pro and caspase-2S-Pro, which possess only the prodomain of their related isoforms, may act as decoy proteins that antagonize caspase activation (23), the mechanisms of the procaspase-2S-mediated anti-apoptotic effect are still unclear. Interactions between procaspase-2S and a specific binding protein, named ISBP, has been proposed to mediate the survival function of procaspase-2S by preventing procaspase-2L processing and activation (43). In addition, in monocytic-like leukemia U937 cells, procaspase-2S selectively prevents chromatin condensation, membrane blebbing, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization after VP-16 treatment (20). In this study, we have derived an additional cell line expressing procaspase-2S bearing an HA-epitope tag, facilitating its detection and immunoprecipitation, to further elucidate the mechanisms by which procaspase-2S prevents membrane blebbing and apoptotic body formation after VP-16 treatment.

Membrane blebbing and apoptotic body formation require important cytoskeleton remodeling that is under the control of several protein kinases associated to the Rho GTPase family, including PAK2 and ROCK-1 (16-19). PAK2 mediates cdc42/Rac signals by regulating the formation of dynamic peripheral structures, including focal complexes, membrane ruffles, lamellipodia, and filopodia (44). In turn, ROCK-1, activated by Rho, regulates cell migration, adhesion and phagocytosis processes (45). Upon caspase-3 cleavage during apoptosis, PAK2 and ROCK-1 activities are drastically modified and intensified. PAK2 cleavage product generates a constitutively-active fragment that leads actin stress fibre disassembly (18), possibly by promoting actin-myosin destabilization and myosin light chain kinase inhibition (46, 47). Therefore, PAK2 was proposed to be required for final breakdown of apoptotic cells into apoptotic bodies (19). In Namalwa cells treated with VP-16, cleavage and activation of PAK2 occurred only 30-h post treatment, suggesting that it is not an early and essential event for membrane blebbing and apoptotic body formation in these cells. Cleavage of the auto-inhibitory domain of ROCK-1 by caspase-3 generates a constitutively-active, Rho-independent form of ROCK-1. Thus, activated ROCK-1 induces cell contraction and membrane blebbing through enhanced myosin light chain phosphorylation, actin filamentous structure stabilization, and promotion of actin-myosin contractile force (18). ROCK-1 activation is also required during apoptosis for the redistribution of fragmented DNA from the nuclear region to membrane blebs and apoptotic bodies (18).

In Namalwa cells, procaspase-2S overexpression prevented procaspase-3 processing and activation, subsequent ROCK-1 cleavage and delayed significantly membrane blebbing and the appearance of apoptotic bodies after VP-16 treatment. To investigate the mechanisms by which procaspase-2S prevented

procaspase-3 activation, a series of coimmunoprecipitation experiments were performed and revealed that procaspase-2S binds to procaspase-3, most likely preventing its processing and activation. No interaction between procaspase-2S and procaspase-2L or -9 was detected in Namalwa cells by the antibodies used in this study.

Caspase-3 is known as a central player in the proteolytic caspase cascade, activating other caspases and targeting several substrates, including ROCK-1 (16, 17, 48). Thus, our data suggest that procaspase-2S-mediated anti-apoptotic effects on membrane blebbing and apoptotic body formation are associated with inhibition of the processing and activation of procaspase-3 that, in turn, prevent ROCK-1 activation in VP-16-treated Namalwa cells. Caspase-3 inhibition is also most likely responsible for other effects mediated by procaspase-2S overexpression in Namalwa cells, including delayed DNA fragmentation. Indeed, caspase-3 was reported to cleave the inhibitory subunit DFF-45/ICAD, allowing activation of DFF-40/CAD, a nuclease associated with oligonucleosome-sized DNA fragmentation during apoptosis (49-51). Although not characterized in this study, the effect of procaspase-2S on DNA fragmentation in VP-16-treated Namalwa cells probably resulted from caspase-3 inhibition. In contrast, in U937 cells, procaspase-2S did not prevent DNA fragmentation after VP-16 treatment (20). These observations suggest that the DNA fragmentation process in Namalwa cells is dependent on caspase activation, while in U937 cells, the process could be caspase-independent. Several studies have reported the presence of N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethylketone-, N-tosyl-L-lysinyll-chloromethylketone- and benzyloxy-carbonyl-sensitive serine protease activities in a DNA fragmentation pathway during apoptosis in a series of cell lines, including U937 cells (52-58), and a 24-kDa protease that promotes DNA fragmentation has been also purified and

characterized from U937 cells (59). Alternatively, other endonucleases, including L-DNase II, AN34 or EndoG could be activated in U937 cells and are most likely unaffected by procaspase-2S (60-62).

In Namalwa cells overexpressing procaspase-2S, procaspase-2L cleavage was slightly inhibited, revealing that procaspase-2S has only weak inhibitory effects on procaspase-2L cleavage. However, caspase-2L activity was much inhibited in procaspase-2S-Namalwa cells compared to control Namalwa cells after VP-16 treatment, suggesting that procaspase-2S could interfere with caspase-2L activity. So far, 3 routes for caspase-2L processing and activation have been described, a tumor necrosis factor receptor-dependent activation complex involving TRADD-RIP-RAIDD (63, 64), a caspase-3-independent activation complex involving PIDD-RAIDD (65-67), and a caspase-3-dependent proteolytic cleavage and activation pathway (22). In this study, no evidence was obtained that procaspase-2S binds to procaspase-2L and, thus, possibly interferes with the novel activation complex involving PIDD-RAIDD. However, our results do not permit to eliminate the possibility that procaspase-2S binds to cleaved fragments of caspase-2L and, thus, interferes with its activity. In addition, our data suggest that the slight inhibition of procaspase-2L processing could result from caspase-3 inhibition in Namalwa cells. The potential role of ISBP in mediating a survival function of procaspase-2S by interfering with procaspase-2L processing (43) after VP-16 treatment was not addressed in this study.

In conclusion, procaspase-2S overexpressed in human B lymphoma Namalwa cells binds to and inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing cleavage and activation of ROCK-1. In turn, failure of ROCK-1

activation correlates with the sustained delay of membrane blebbing and apoptotic body formation in Namalwa cells after VP-16 treatment.

13.7 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to R.B. R.B is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. The authors thank Mr. Ovid Da Silva (Research Support Office, Research Centre, CHUM) for the editorial work on this manuscript.

13.8 REFERENCES

1. Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267: 1456-1462.
2. Kaufmann, S. H. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res*. 49: 5870-5878.
3. Barry, M. A., Behnke, C. A., and Eastman, A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol*. 40: 2353-2362.
4. Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D., and Pommier, Y. (1991) Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res*. 51: 6280-6285.
5. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257.

6. Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 142: 67-77.
7. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87: 171.
8. Cryns, V. and Yuan, J. Y. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551-1570.
9. Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 10964-10967.
10. Nicholson, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6: 1028-1042.
11. Schmitt, E., Sane, A. T., and Bertrand, R. (1999) Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug Resist Updates.* 2: 21-29.
12. Earnshaw, W. C., Martin, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68: 383-424.
13. Zhang, J. D., Reedy, M. C., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (1999) Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 145: 99-108.
14. Cotter, T. G., Lennon, S. V., Glynn, J. M., and Green, D. R. (1992) Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 52: 997-1005.
15. Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J. E., and Robaye, B. (2000) Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J Cell Physiol.* 184: 239-245.

16. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M. F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 3: 339-345.
17. Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., and Breard, J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 3: 346-352.
18. Coleman, M. L. and Olson, M. F. (2002) Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 9: 493-504.
19. Rudel, T. and Bokoch, G. M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of Pak2. *Science.* 276: 1571-1574.
20. Droin, N., Rebe, C., Bichat, F., Hammann, A., Bertrand, R., and Solary, E. (2001) Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. *Oncogene.* 20: 260-269.
21. Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A., and Bertrand, R. (1998) Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp Cell Res.* 240: 107-121.
22. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., and Martin, S. J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144: 281-292.
23. Droin, N., Beauchemin, M., Solary, E., and Bertrand, R. (2000) Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res.* 60: 7039-7047.
24. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2004) Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase 9 activation. *Oncogene.* 23: 3915-3931.

25. Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G., and Bertrand, R. (1998) Bax-alpha promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death Differ.* 5: 506-516.
26. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 269: 30761-30764.
27. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., and Lazebnik, Y. A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376: 37-43.
28. Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 9: 459-470.
29. Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell.* 78: 739-750.
30. Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., and Reed, J. C. (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 57: 1605-1613.
31. Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimancheboitrel, M. T., and Solary, E. (1998) Upregulation of Casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene.* 16: 2885-2894.
32. Logette, E., Wotawa, A., Solier, S., Desoche, L., Solary, E., and Carcos, L. (2003) The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene.* 22: 935-946.
33. Soller, S., Lansiaux, A., Logette, E., Wu, J., Soret, J., Tazi, J., Bailly, C., Desoche, L., Solary, E., and Corcos, L. (2004) Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol Cancer Res.* 2: 53-61.

34. Martins, L. M., Kottke, T. J., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1998) Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood*. 92: 3042-3049.
35. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282: 1318-1321.
36. Mannick, J. B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K., and Gaston, B. (2001) S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol*. 154: 1111-1116.
37. Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Leverson, J. D., and Hunter, T. (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem*. 275: 26661-26664.
38. Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001) Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 8662-8667.
39. Colussi, P. A., Harvey, N. L., and Kumar, S. (1998) Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor: a novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem*. 273: 24535-24542.
40. Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciolarosen, L. A., and Rosen, A. (1998) The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*. 140: 1485-1495.
41. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*. 189: 381-393.
42. Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol*. 149: 603-612.

43. Ito, A., Uehara, T., and Nomura, Y. (2000) Isolation of Ich-1S (caspase-2S)-binding protein that partially inhibits caspase activity. *FEBS Lett.* 470: 360-364.
44. Daniels, H. and Bokoch, G. (1999) p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci.* 24: 350-355.
45. Leverrier, Y. and Ridley, A. J. (2001) Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat Cell Biol.* 3: E91-E92.
46. Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M., and De Lanerolle, P. (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21 activated kinase. *Science.* 283: 2083-2085.
47. Goeckeler, Z. M., Masaracchia, R. A., Zeng, Q., Chew, T. L., Gallagher, P., and Wysolmerski, R. B. (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem.* 275: 18366-18374.
48. Porter, A. and Janicke, R. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Diff.* 6: 99-104.
49. Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 89: 175-184.
50. Liu, X. S., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., and Wang, X. D. (1998) The 40-Kda subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 8461-8466.
51. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391: 43-50.
52. Bruno, S., DelBino, G., Lassota, P., Giaretti, W., and Darynkiewicz, Z. (1992) Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia.* 6: 1113-1120.
53. Weaver, V. M., Lach, B., Walker, P. R., and Sikorska, M. (1993) Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in

internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem Cell Biol.* 71: 488-500.

54. Yoshida, A., Takauji, R., Inuzuka, M., Ueda, T., and Nakamura, T. (1996) Role of serine and Ice-like proteases in induction of apoptosis by etoposide in human leukemia HL-60 cells. *Leukemia.* 10: 821-824.
55. Hara, S. S., Halicka, H. D., Bruno, S., Gong, J. P., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1996) Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp Cell Res.* 223: 372-384.
56. Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S., and Gualandi, G. (1995) Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages: a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Lett.* 377: 9-14.
57. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996) Bcl-2 expression prevents activation of the Ice protease cascade. *Oncogene.* 12: 2251-2257.
58. Sané, A. T. and Bertrand, R. (1998) Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities. *Cancer Res.* 58: 3066-3072.
59. Wright, S. C., Wei, Q. S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D. H., and Larrick, J. W. (1994) Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J Exp Med.* 180: 2113-2123.
60. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y., and Counis, M. F. (1998) L-Dnase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol.* 18: 3612-3619.
61. Yoshida, A., Pourquier, P., and Pommier, Y. (1998) Purification and characterization of a Mg²⁺-dependent endonuclease (AN34) from etoposide-treated human leukemia HL-60 cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 58: 2576-2582.
62. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412: 95-99.

63. Duan, H. and Dixit, V. M. (1997) Raidd is a new death adaptor molecule. *Nature*. 385: 86-89.
64. Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L. J., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1997) Cradd, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and Fas/Tumor necrosis factor receptor-interacting protein Rip. *Cancer Res*. 57: 615-619.
65. Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. 297: 1352-1354.
66. Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L., and Kumar, S. (2002) A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol*. 159: 739-745.
67. Tinel, A. and Tschopp, J. (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 304: 843-846.

13.9 FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Effect of procaspase-2S overexpression on VP-16-mediated caspase activation and DNA fragmentation associated with apoptosis in Namalwa cells. a) Expression of HA-Casp-2S (36-kDa) in wild-type (Nam) and Namalwa cells transfected with CEP4 (Nam-mock) and CEP4-HA-ProCASP-2S vectors (Nam-HA-Casp-2S). b) Kinetics of procaspase-2L (48-kDa) disappearance, and c) Procaspase-3 (32-kDa) cleavage into 17-kDa fragment after VP-16 (50 μ M) treatment. HA-Casp-2S migrated as a 36-kDa protein in the Nam-HA-Casp-2S cells. Representative of 4 independent experiments. d) Kinetics of caspase-2L (VDVADase activity; upper panel) and caspase-3 (DEVDase activity: lower panel) after VP-16 (50 μ M) treatment. Open (Nam-mock) and filled (Nam HA-Casp-2S) bars represent the means \pm SE of at least 3 independent experiments. e) Kinetics

of DNA fragmentation visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and f) quantitated by DNA filter elution assay after VP-16 (50 μ M) treatment. Points and bars represent the means \pm SE of 3 independent experiments. Symbols are: (\square) Nam-mock; (\blacksquare) Nam-HA-Casp-2S.

Fig. 2 Morphological consequences of procaspase-2S overexpression in Namalwa cells after VP-16 treatment. a) The kinetics of morphological changes were assessed by Hoescht 33342 staining (magnification X400), and b) the kinetics of cell size and granularity were monitored by flow cytometry at various times after VP-16 (50 μ M) treatment. In b), the percentage of cells in the upper (N: normal sized cells) and lower (A: apoptotic cells) panels are indicated.

Fig. 3 Procaspase-2S-mediated effect on caspase-dependent PAK2 and ROCK-1 cleavage and activation in Namalwa cells. a) Kinetics of PAK2 (62-kDa) disappearance, and b) ROCK-1 (160-kDa) cleavage into 131-kDa fragment after VP-16 (50 μ M) treatment in Nam-mock and Nam-HA-Casp-2S cells. In a) β -actin expression (45-kDa) is shown as the control. Representative of 3 independent experiments.

Fig. 4 Procaspase-2S interacts with procaspase-3 in Namalwa cells. a) Reciprocal coimmunoprecipitation (IP: HA; IP: casp-3) experiments on untreated (0) and VP-16-treated (50 μ M; 5 h) Nam-HA-Procaspase-2S cells. Western blots (WB) were revealed with anti-HA and anti-caspase-3 antibodies and enhanced chemiluminescence reaction. Nonspecific normal mouse and rabbit IgG were used for immunoprecipitation as controls, and total cellular extracts were run on SDS-PAGE to position HA-Casp-2S (36-kDa) and procaspase-3 (32-kDa). Representative of 3 independent experiments. b) Recombinant His-procaspase-2S

protein interacts with procaspase-3 in a cell-free assay. U-937 cell-free extracts were incubated in the absence or presence of purified recombinant His-procaspase-2S protein with or without cytochrome c/dATP. Immunoprecipitations (IP) were performed using anti-His and Westerns blots (WB) were revealed with anti-caspase-3, -7, -6 and -9 antibodies and enhanced chemiluminescence reaction.

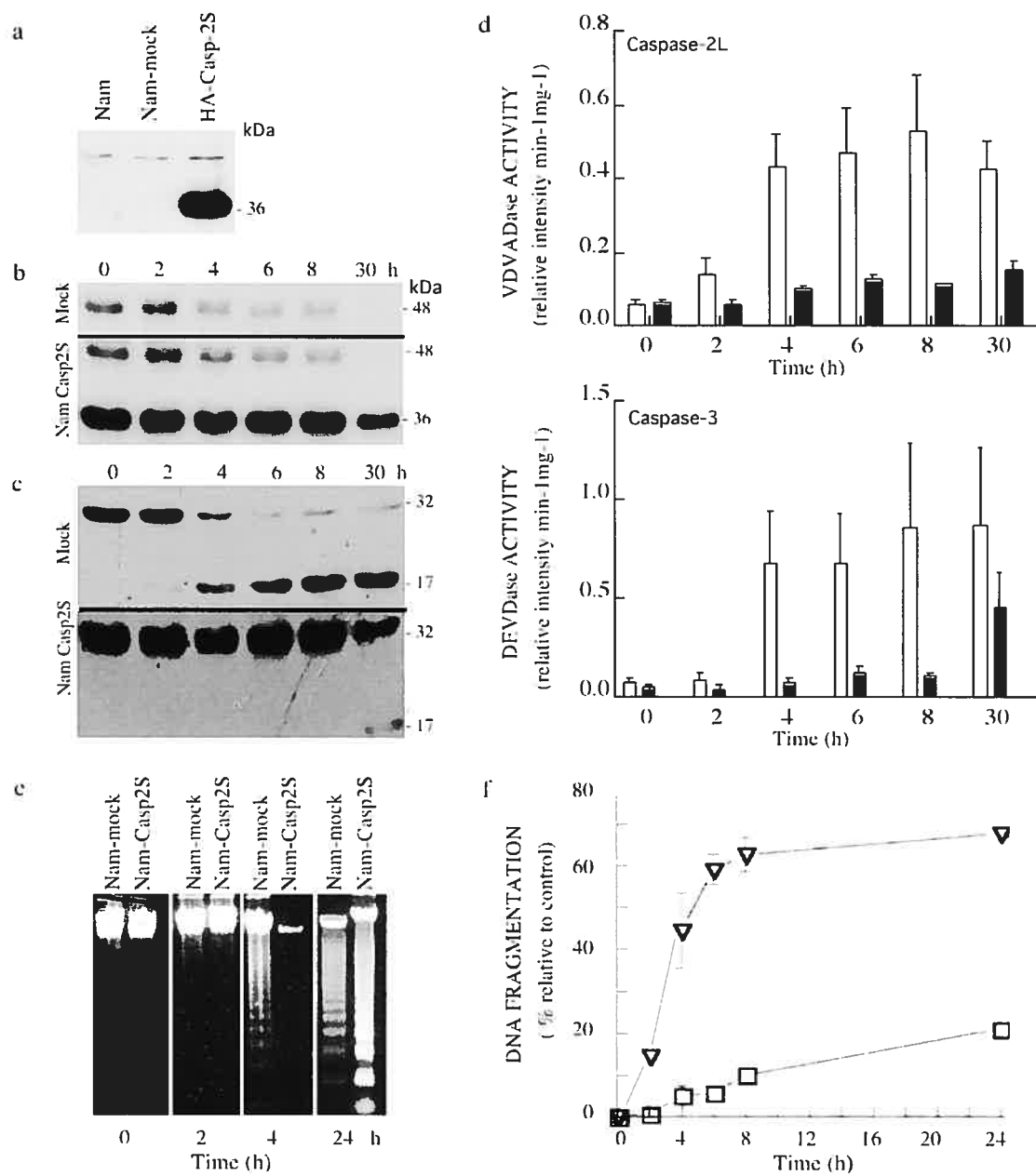


Fig. 1

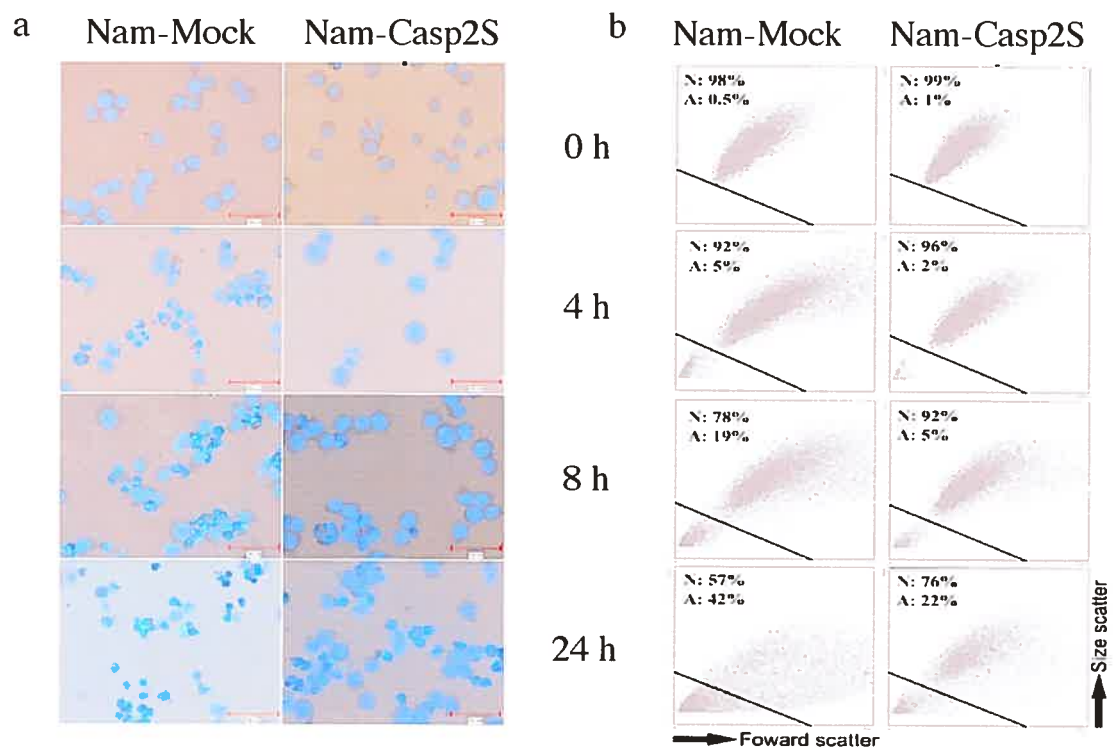


Fig. 2

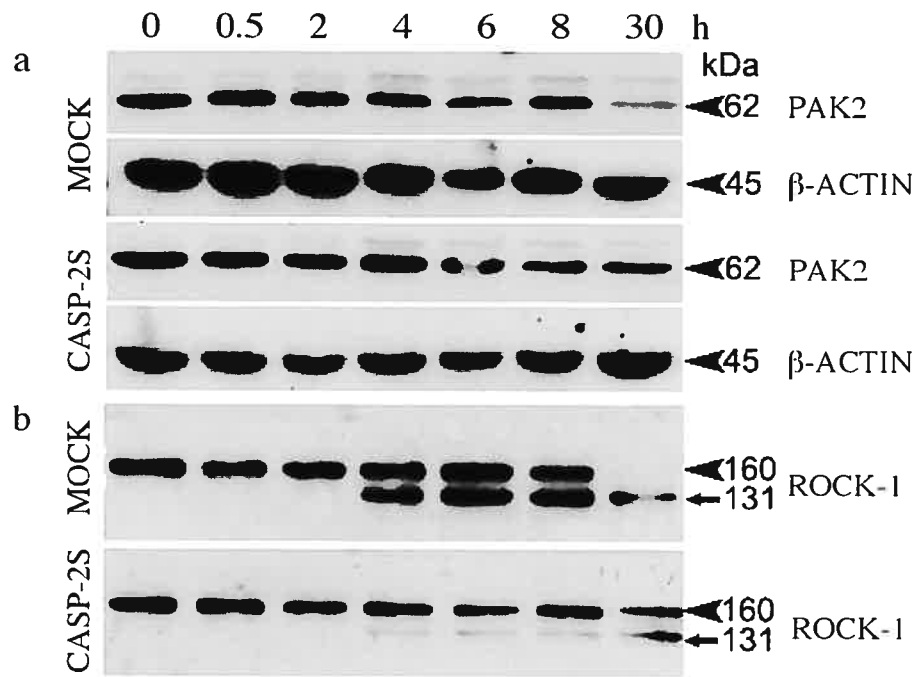


Fig. 3

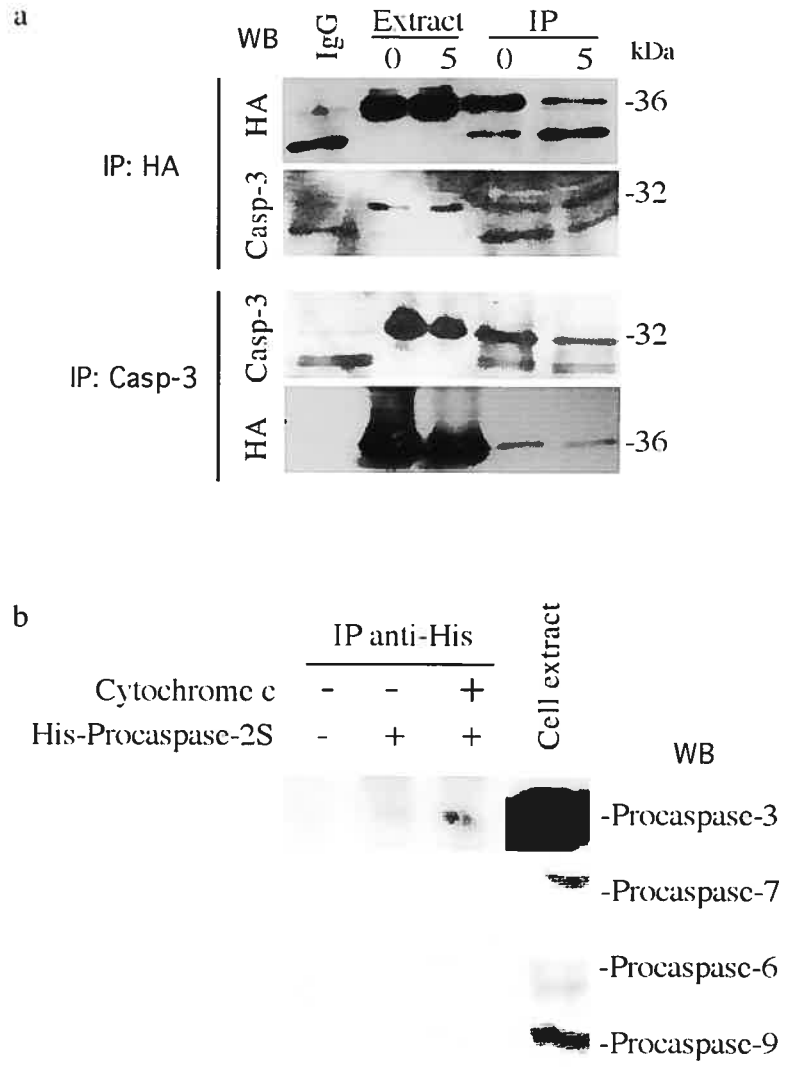


fig. 4

14. DISCUSSION

Les caspases sont généralement associées au processus de mort cellulaire programmée chez les organismes multicellulaires, incluant les animaux; elles participent à une cascade protéolytique initiée à la suite de plusieurs stimuli, incluant les drogues utilisées dans la chimiothérapie du cancer, qui conduira globalement à l'élimination de la cellule compromise dans cette voie signalétique.^{58,223,224} Actuellement, la moitié des procaspases identifiées, soit les procaspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10, tiennent un rôle actif reconnu dans le processus apoptotique. Les caspases sont exprimées sous forme de zymogène, ou procaspase, inactif nécessitant leur protéolyse afin de générer la forme active de l'enzyme.⁶² Plusieurs mécanismes de régulation intrinsèques à la machinerie apoptotique contrôlent la cascade des caspases et préviennent l'activation fortuite de celle-ci: l'activation induite par la proximité des procaspases résultant du recrutement de celles-ci à des protéines adaptatrices par l'entremise des motifs d'interaction protéine-protéine CARD ou DED⁸⁷, l'activation protéolytique des procaspases ayant une spécificité catalytique plus large (effectrices) par des caspases à l'action plus restreinte (initiatrices)¹⁰³ et l'inhibition par des inhibiteurs naturels des caspases, conservés au fil de l'évolution.²³² Ceux-ci incluent les protéines IAPs, caractérisées par une structure contenant au moins un motif BIR permettant d'interagir avec les caspases et d'inhiber leurs activités (revu dans ⁶⁴) ainsi qu'une protéine homologue inactive des caspases-8 et -10, c-FLIP, qui agirait comme un inhibiteur compétitif empêchant le recrutement et l'activation de ces caspases aux domaines cytosoliques des récepteurs de mort cellulaire.²⁴² D'autres mécanismes, ceux-ci plus généraux, comme les modifications post-traductionnelles^{172,243}, la compartimentation sub-cellulaire^{76,78,173-176} et la

dégradation protéosomale¹⁷⁸ contribuent aussi à garantir une réponse apoptotique adéquate.

Des mécanismes encore plus complexes interviennent en réponse aux multiples situations physiologiques rencontrées par l'organisme multicellulaire durant son existence. La régulation de la transcription des gènes de certaines procaspases est essentielle au cours du développement des mammifères.⁷ Par exemple, l'expression du gène de la caspase-2 dans les cellules de la rétine du rat va grandement varier temporellement pour arborer un patron d'expression spécifique au type cellulaire et au niveau de différenciation de celles-ci.¹⁷¹ Par ailleurs, on pourra observer une augmentation de la transcription des gènes des caspases-2 et -3 dans certaines cellules tumorales exposées à des substances cytotoxiques, une caractéristique qui permettra de prédire la sensibilité cellulaire à ces substances.¹⁶⁹ Enfin, l'épissage alternatif de l'ARNprém de plusieurs caspases va mener, dans certains cas, à la production d'isoformes qui interviendront de façon différentes dans la cascade apoptotique, ce qui constitue un autre niveau de régulation de l'apoptose.¹⁷⁹ L'épissage de l'ARNprém de la caspase-9, par exemple, produira une courte isoforme, la procaspase-9b, qui va concurrencer l'isoforme pro-apoptotique, la procaspase-9, pour la molécule adaptatrice Apaf-1 et ainsi compromettre l'activation de la procaspase-9.^{180,181} Plus encore, l'expression d'isoformes issues de l'épissage alternatif peut dépendre du tissu ou du type cellulaire examiné. Ainsi, l'isoforme procaspase-9b est principalement retrouvée dans les muscles squelettiques tandis que la procaspase-9 est ubiquitaire.^{180,181}

Le gène de la caspase-2 produit quatre isoformes d'ARNm distinctes incluant la procaspase-2L qui provoque la mort cellulaire ainsi que trois isoformes aux propriétés anti-apoptotiques, la procaspase-2S, la caspase-2L-Pro et la caspase-

2S-Pro.^{187,235} Les caspases-2L-Pro et -2S-Pro, qui ne possèdent que les portions correspondant aux prodomaines des isoformes auxquelles elles sont associées, interfèrent, à l'instar de la procaspase-9b, avec le recrutement et l'activation subséquente de la procaspase-2L.¹⁸⁷ Toutefois, le ou les mécanismes par lesquels la procaspase-2S intervient afin de protéger la cellule de l'apoptose demeurent peu compris. Une interaction spécifique entre la procaspase-2S et la protéine ISBP (*Ich-1S-binding protein*), qui a pour effet d'inhiber partiellement l'activation de la procaspase-2L, constitue un premier mécanisme.²⁰⁹ Par ailleurs, la surexpression de la procaspase-2S, dans la lignée cellulaire monocyttaire humaine U937, inhibe sélectivement certaines transformations typiques de la cellule en apoptose soit la condensation de la chromatine, la formation des corps apoptotiques et l'externalisation des phosphatidylsérines à la membrane.²⁰⁸ Contrairement aux isoformes caspase-2L-Pro et caspase-2S-Pro, le domaine catalytique QACRG est préservé sur la procaspase-2S et celui-ci est essentiel aux effets observés dans les cellules U937.²⁰⁸ De plus, cette portion de la protéine n'est pas requise pour l'interaction de la procaspase-2S avec la protéine ISBP²⁰⁸, ce qui suggère l'existence d'au moins un autre mécanisme d'inhibition pour la procaspase-2S.

Les effets morphologiques de la surexpression de la procaspase-2S dans la lignée cellulaire Namalwa, exposée à des doses d'étoposide induisant l'apoptose, sont sensiblement identiques à ceux observés dans le même contexte dans les cellules U937, c'est-à-dire une inhibition du bourgeonnement de la membrane cellulaire et de la formation des corps apoptotiques. Ces deux processus requièrent une participation active et dynamique du réseau d'actine, de la myosine qui va générer les forces contractiles essentielles au remodelage du cytosquelette d'actine, le tout sous le contrôle de cascades signalétiques impliquant particulièrement les protéines kinases PAK2 et ROCK-1. Ces kinases sont deux

effecteurs guanosine triphosphatases (GTPases) de la famille de la protéine Rho, jouant des rôles importants dans la régulation du réarrangement du cytosquelette d'actine associé à certains processus cellulaires normaux. Par exemple, la protéine PAK2, dont l'activation dépend de la protéine Rac/Cdc42, va soutenir la formation de structures périphériques dynamiques telles que les complexes focaux d'adhésion cellulaire ainsi que les structures membranaires d'ondulation (*ruffles*), de lamellipodia et de filopodia, un rôle qui ne semble toutefois pas dépendre de l'activité kinase de PAK2.¹⁵¹ Quant à elle, la protéine ROCK-1 est activée par la protéine Rho et associée aux processus de migration, d'adhésion cellulaire et de phagocytose.¹⁴⁷ Or, dans un contexte apoptotique, les protéines ROCK-1 et PAK2, suivant leur activation par la caspase-3, sont impliquées dans des processus cellulaires différents.¹⁶⁷ La protéine ROCK-1, suite au clivage de son domaine auto-inhibiteur par la caspase-3, va générer une forme plus active, indépendante de l'influence de Rho.¹⁴⁹ Celle-ci va ainsi promouvoir la génération d'importantes forces contractiles par le réseau d'actine-myosine qui conduira à la formation du bourgeonnement membranaire et des corps apoptotiques.^{149,150} De plus, la protéine ROCK-1, clivée par la caspase-3, sera nécessaire à la relocalisation de l'ADN fragmenté de la région nucléaire aux bourgeonnements de la membrane et aux corps apoptotiques.¹⁴⁹ De la même manière, la protéine PAK2, clivée par la caspase-3, va conduire à la production d'un fragment catalytique constitutivement actif et indépendant du contrôle de Cdc42/Rac pouvant induire la perte des fibres de stress et des complexes focaux d'adhésion suivant la déstabilisation du réseau d'actine-myosine et l'inhibition des forces contractiles.^{153,244,245} Puisqu'il a été montré que l'actine n'était pas une cible précoce des caspases durant l'apoptose²⁴⁶, on attribue à la protéine PAK2, activée par clivage, un rôle important dans le désassemblage initial des filaments d'actine conduisant à la désorganisation du cytosquelette en vue de la maturation complète des corps apoptotiques.^{154,167}

La surexpression de la procaspase-2S dans les cellules Namalwa exposées à l'étoposide inhibe l'activation de la caspase-3 et, ainsi, compromet les activités de l'enzyme active. Conséquemment, l'activation de la protéine kinase ROCK-1, suivant son clivage par la caspase-3, se trouve retardée. L'inhibition soutenue dans l'activation de ROCK-1 dans un contexte apoptotique, fournit une explication plausible du retard dans le bourgeonnement de la membrane et de la formation des corps apoptotiques observé dans notre modèle, ce qui est en accord avec une série d'études sur le sujet.^{147,149,150} Quant à elle, la protéine kinase PAK2 ne semble pas être impliquée dans les changements morphologiques dans les cellules Namalwa exposées à l'étoposide, en dépit des rôles joués par cette protéine dans le processus apoptotique de plusieurs autres lignées cellulaires.^{154,167}

Une autre observation faite dans notre modèle cellulaire appuie l'implication de la caspase-3 dans le phénotype de celui-ci, soit l'inhibition de la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Dans de nombreux types cellulaires, celle-ci serait principalement due à l'inactivation de la protéine DFF45/ICAD effectuée par la caspase-3¹⁰⁵, ce qui permet l'activation de la nucléase DFF40/CAD¹⁰⁶ qui, à son tour, viendrait hydrolyser les liens phosphodiester des acides nucléiques au niveau des nucléosomes. Ainsi, la surexpression de la procaspase-2S dans les cellules Namalwa prévient l'activation de la caspase-3 et par le fait même empêche le processus de fragmentation de l'ADN, possiblement en ne permettant pas l'activation de la nucléase DFF40/CAD. Il est toutefois essentiel de souligner la présence de mécanismes alternatifs permettant la fragmentation de l'ADN. L'un d'eux impliquerait des protéases à résidu sérine aux activités sensibles aux N-tosyl-L-phénylalanine-chlorométhylketone (TPCK)-, N-tosyl-L-lysiny-chlorométhylketone (TLCK)- et benzyloxycarbonyl.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Ce mécanisme, indépendant de la caspase-3, est retrouvé dans certaines lignées

cellulaires, dont les cellules U937, et assure probablement la fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose de celles-ci. D'ailleurs, on observe dans la lignée U937 surexprimant la procaspase-2S et exposée à l'étoposide, une fragmentation de l'ADN identique à celle retrouvée dans les cellules contrôles malgré l'inhibition du bourgeonnement membranaire et la formation des corps apoptotiques.²⁰⁸ Il est possible que ce type de mécanisme prévale aussi dans les cellules MCF-7 apoptotiques traitées avec un inhibiteur chimique spécifique à la caspase-3 où l'on observe le même phénotype que dans les cellules U937.²¹¹ Enfin, il existe d'autres nucléases dans la cellule qui pourraient participer à la fragmentation de l'ADN de manière dépendante ou non de la caspase-3, incluant les L-DNase II, AN34 ou EndoG.^{74,239,240,250} Il semble cependant que ces dernières ne puissent pas compenser l'inhibition probable de l'activation DFF40/CAD dans les cellules Namalwa.

Des expériences d'immunoprécipitations réciproques montrent que la procaspase-2S et la procaspase-3 interagissent. Des expériences similaires ont été tentées avec la procaspase-2L et -9, sans succès. Par conséquent, l'interaction de la procaspase-2S avec la procaspase-3 pourrait être spécifique. En somme, il apparaît que l'interaction spécifique de la procaspase-2S avec la procaspase-3 soit responsable de l'inhibition de l'activation de la caspase-3 dans les cellules Namalwa exposées à des doses d'étoposide induisant l'apoptose. Du coup, la diminution de la participation de la caspase-3 dans la cascade apoptotique serait cohérente avec le phénotype obtenu dans notre modèle cellulaire surexprimant la procaspase-2S. D'une part, la caspase-3 est à l'origine de certaines transformations apoptotiques dans les cellules Namalwa telles que la fragmentation internucléosomale de l'ADN ainsi que le bourgeonnement de la membrane et la formation des corps apoptotiques. D'autre part, la caspase-3 conduit à

l'amplification de la cascade protéolytique des caspases puisqu'elle clive et active directement les autres procaspases.²⁴¹ Alors, il est vraisemblable que l'inhibition de la caspase-3, en plus d'inhiber certains aspects du processus apoptotique, retarde l'emballement de la cascade signalétique de l'apoptose requis pour mener la cellule vers l'apoptose. Par ailleurs, la caspase-7 partage une spécificité catalytique similaire à la caspase-3 et pourrait intervenir sur les mêmes cibles qu'elle.²⁵¹ Il semble toutefois que l'activation de la caspase-7 nécessite l'activation préalable de la caspase-3, ce qui appuie le rôle central de la caspase-3 dans la cascade apoptotique, du moins dans notre modèle cellulaire.²⁵²

La surexpression de la procaspase-2S, suite à l'induction de l'apoptose par l'étoposide, inhibe aussi l'activité protéolytique de la caspase-2L malgré un clivage de la procaspase comparable à celui observé dans les cellules normales. Le clivage de la procaspase-2L peut s'effectuer par la caspase-3¹⁹⁷, dont l'activité est inhibée dans notre modèle cellulaire surexprimant la procaspase-2S. Puisque l'inhibition du clivage de la procaspase-2L n'est pas observée dans les cellules Namalwa exposées à l'étoposide, il semble donc que le clivage de la procaspase-2L soit en partie indépendant de la caspase-3 dans les cellules Namalwa.

La caspase-2L peut aussi être activée en amont de la cascade des caspases, donc indépendamment de la caspase-3, dans un complexe au niveau du récepteur de mort TNFR1 impliquant la procaspase-2L avec les protéines TRADD, RIP et RAIDD^{84,85}, ou dans un autre complexe avec les protéines PIDD et RAIDD.¹⁰⁰ L'importance d'un complexe d'activation de la procaspase-2L en amont de la caspase-3 a par ailleurs été explorée dans le laboratoire avec les cellules Namalwa exposées à des agents génotoxiques. Dans cette étude, où l'expression du gène de la caspase-2 est bloquée par une technique de siRNA, nous avons observé une

inhibition de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, une étape-clé dans l'initiation de la cascade des caspases et une inhibition de l'activité de la caspase-3.²⁵³ Ces résultats suggèrent que l'activation de la caspase-2L précéderait l'activation de la voie mitochondriale induite par des agents génotoxiques, en accord avec les observations faites par d'autres groupes utilisant différentes lignées cellulaires et stimuli apoptotiques.^{93,97,98,201-203} Comme il nous a été impossible d'observer une interaction directe de la procaspase-2S avec la procaspase-2L *in vivo*, et puisque la procaspase-2L subit un clivage comparable à celui observé dans les cellules normales, la surexpression de la procaspase-2S ne semble donc pas interférer avec la formation des complexes d'initiation de l'apoptose impliquant la procaspase-2L.

Il existe une possibilité d'interaction de la procaspase-2S avec la protéine ISBP qui inhibe partiellement l'activation de la caspase-2L.²⁰⁹ Cependant, la protéine ISBP ne peut se lier à la procaspase-2L et rien n'indique que ce mécanisme se produise *in vivo*, ce qui laisse plusieurs interrogations concernant la manière par laquelle la procaspase-2S inhibe l'activité de la caspase-2L. Nous postulons que la procaspase-2S pourrait détourner les sous-unités clivées de la caspase-2L et empêcher la formation complète de l'enzyme active, ce qui permettrait de concilier nos observations dans les cellules Namalwa, soit la forte inhibition de l'activité protéolytique de la caspase-2L malgré un clivage de la procaspase relativement considérable. Malheureusement, les anticorps dirigés contre la procaspase-2L dont nous disposons ne reconnaissent pas les sous-unités de la caspase-2L, ce qui ne nous permet pas de confirmer ces interactions *in vivo*.

15. CONCLUSION

La surexpression de la procaspase-2S dans les lignées cellulaires humaines U937 et Namalwa exposées à l'étoposide nous dévoile toute la complexité de l'activité anti-apoptotique de celle-ci. En effet la procaspase-2S prévient sélectivement certains événements caractéristiques d'une cellule compromise dans la voie apoptotique de se produire, ce qui implique une inhibition spécifique par la procaspase-2S de l'activation et de l'activité d'autres caspases. Une schématisation des niveaux d'action de la procaspase-2S est présentée (Figure 7, page 67).

L'inhibition de la caspase-3, conduit à de lourdes conséquences pour la cellule en processus de mort. En effet, la caspase-3 est un effecteur central dans la cascade des caspases.^{254,255} Premièrement, la caspase-3 peut cliver le zymogène des autres caspases et ainsi les activer, ce qui permettra d'amplifier la cascade des caspases et de mener la cellule vers l'apoptose. Deuxièmement, la caspase-3 est instigatrice de certains changements morphologiques typiques de la cellule apoptotique. Son action protéolytique sur la protéine kinase ROCK-1 permet d'induire la contraction de la membrane cellulaire, son bourgeonnement ainsi que la formation et la maturation des corps apoptotiques. De plus, on reconnaît à la caspase-3 la capacité d'activer la nucléase DFF40/CAD responsable de la fragmentation internucléosomale de l'ADN, une autre caractéristique propre de la cellule en apoptose. Or, si l'activation par protéolyse de ces protéines n'a pas lieu, alors les modifications cellulaires mentionnées seront absentes, ce qui correspond au phénotype des cellules Namalwa surexprimant la procaspase-2S et exposée à des doses d'étoposide.

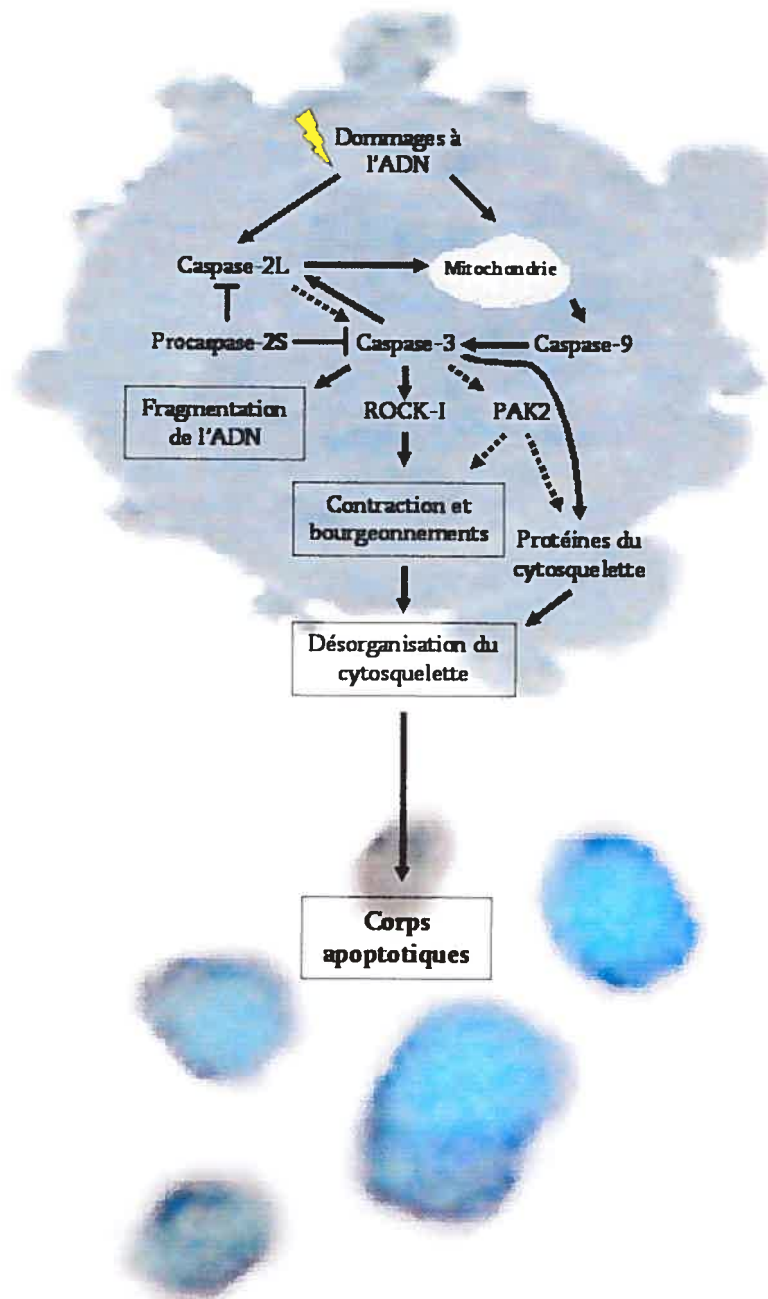


Figure 7: Schématisation des niveaux d'action de la procaspase-2S.

L'investigation de ce phénomène a permis de suggérer un mécanisme d'inhibition consistant en l'interaction spécifique de la procaspase-2S avec la procaspase-3 qui, selon nous, expliquerait l'inhibition de l'activation de la caspase-3 et, conséquemment, de son activité enzymatique. Par ailleurs, la procaspase-2S inhibe aussi l'activité protéolytique de la caspase-2L. Cependant, l'étude effectuée ici ne nous permet pas d'entrevoir un mécanisme inhibiteur similaire à celui de la caspase-3 puisque nos résultats ne montrent pas de liens physiques entre la procaspase-2S et la procaspase-2L. De plus, le rôle de la caspase-2L dans la cascade des caspases ne fait pas encore l'unanimité, bien que de nombreuses observations, faites par nous et d'autres, imputent à la caspase-2L une fonction initiatrice.

Néanmoins, le mécanisme d'inhibition de l'activation de la caspase-3 par la procaspase-2S décrit dans cet ouvrage s'inscrit dans une démarche menant à une compréhension accrue des propriétés anti-apoptotiques complexes de cette isoforme et de son rôle d'inhibiteur naturel de la cascade des caspases. Plusieurs aspects des activités anti-apoptotiques de la procaspase-2S nous incitent à envisager une participation considérable de celle-ci à diverses fonctions biologiques, incluant le développement du système immunitaire, l'inflammation ainsi que la résistance aux drogues acquise par certains cancers.

16. PERSPECTIVES

À court terme:

- La caspase-2S, surexprimée dans les cellules Namalwa exposée à des doses d'étoposide permettant d'induire l'apoptose, inhibe l'activité protéolytique de la caspase-2L bien que le clivage de son zymogène se produise normalement. Il serait intéressant d'explorer l'hypothèse selon laquelle la caspase-2S se lie aux sous-unités de la caspase-2L afin de prévenir la formation de la caspase active. Dans un premier temps, cette étude nécessitera la génération d'anticorps dirigés spécifiquement contre les deux sous-unités de la caspase-2L. Dans un deuxième temps, des expériences d'immunoprécipitations réciproques réalisées avec nos cellules Namalwa surexprimant la caspase-2S-HA permettraient de confirmer ou non si une interaction existe *in vivo* de la caspase-2S avec les sous-unités de la caspase-2L. Dans un troisième temps, on pourrait produire les sous-unités de la caspase-2L en protéines recombinantes afin de développer un essai *in vitro* pour définir les conséquences d'une possible interaction de la caspase-2S avec les sous-unités de la caspase-2L sur la formation de la caspase-2L active.
- La surexpression de la caspase-2S altère l'activation et/ou l'activité des caspases-2L et -3. Il serait intéressant d'évaluer l'effet de la caspase-2S sur d'autres caspases telles les caspases-7 et -9. La caspase-7 possède une spécificité enzymatique similaire à celle de la caspase-3, ce qui lui confère un rôle d'effecteur dans la cascade apoptotique et pourrait vraisemblablement contribuer au phénotype des cellules Namalwa surexprimant la caspase-2S lorsque celles-ci sont exposées à l'étoposide. Il serait donc utile dans cette optique de réaliser les cinétiques de clivage de la procaspase-7 et de mesurer

l'activité protéolytique de la caspase-7. Par ailleurs, la caspase-9 est une caspase de premier ordre dans l'initiation de la cascade apoptotique puisqu'elle est impliquée dans la voie mitochondriale.²⁴¹ D'une part, son étude dans notre modèle permettrait de trancher quant à la nature de la caspase-2L, si elle initie ou non la voie mitochondriale dans les cellules Namalwa exposées à l'étoposide. D'autre part, la possibilité que la caspase-2S puisse interagir avec cette caspase demeure et pourrait donc être, elle aussi, étudiée par des expériences d'immunoprécipitations réciproques.

- La protéine kinase PAK2 contribue à plusieurs modifications morphologiques dans divers types de cellules en apoptose, notamment en favorisant la contraction de la membrane, la désorganisation du cytosquelette ainsi que la formation des corps apoptotiques.¹⁵⁴ Elle ne semble cependant pas être impliquée dans le phénotype de notre modèle cellulaire. L'utilisation d'un dominant négatif de PAK2 par le groupe de Rudel a permis de mettre en évidence l'importance de PAK2 dans certains changements morphologiques caractéristiques de cellules Jurkat en apoptose¹⁵⁴; ce dominant négatif permettrait aussi d'évaluer les effets de PAK2 dans les cellules Namalwa.

À moyen terme:

- Le modèle cellulaire que nous avons développé constitue un modèle qui convient aussi à l'étude de la protéine kinase ROCK-1 dont le retard d'activation, par le clivage dépendant des caspases, corrèle avec le phénotype de notre modèle. L'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique à ROCK-1, Y-27632²⁵⁶, permettrait de valider l'importance de la protéine ROCK-1 dans les changements morphologiques des cellules Namalwa exposées à l'étoposide,

notamment sur le bourgeonnement de la membrane et sur la formation des corps apoptotiques. L'étude approfondie des évènements en aval de cette protéine permettrait de comprendre davantage le rôle des cibles impliquées dans les changements morphologiques qui lui sont associés. Une approche consisterait en l'étude des cinétiques de phosphorylation de certaines protéines du cytosquelette susceptibles d'être des substrats de ROCK-1 telles que l'actine, les cadhérines, la cofiline, la gelsoline, mDia1, la MLCK et les spectrines pour ne nommer que celles-ci, suite à l'induction de l'apoptose à l'aide de l'étoposide dans des cellules Namalwa normales concomitamment avec l'utilisation de l'inhibiteur Y27632 et des cellules surexprimant la caspase-2S.

À long terme:

- La caspase-2S subit des variations d'expression suivant certaines conditions physiologiques particulières.^{169,188-190} À partir de ces données, on pourrait déterminer des conditions physiologiques où les stimuli conduiraient à une expression optimale de la caspase-2S en évitant l'étape de transfection et de sélection. Les conséquences possibles qu'entraînerait cette surexpression de la caspase-2S seraient étudiées du point de vue :
 - 1- De la sensibilité et la résistance aux agents chimiothérapeutiques.
 - 2- Au niveau des effets secondaires qui pourraient être associés à l'inhibition de la formation des corps apoptotiques, tels l'inflammation, dans un modèle de tumeur chez la souris.
- À ce jour, il n'existe pas de modèles murins présentant un défaut global dans la formation des corps apoptotiques et de leur phagocytose. Il serait donc

intéressant de développer un modèle de souris transgéniques surexprimant la caspase-2S et d'en étudier les conséquences sur le développement, notamment sur le développement du système immunitaire et des maladies auto-immunes.

17. SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257 (1972).
2. Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. & Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* **142**, 67-77 (1984).
3. Ren, Y. & Savill, J. Apoptosis: The importance of being eaten. *Cell Death Differ* **5**, 563-568 (1998).
4. Chen, Y. P. & Zhao, X. Shaping limbs by apoptosis. *J Exp Zoology* **282**, 691-702 (1998).
5. Gu, Y., Jow, G. M., Moulton, B. C., Lee, C., Sensibar, J. A., Park-Sarge, O. K., Chen, T. J. & Gibori, G. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* **135**, 1272-1279 (1994).
6. Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
7. Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254 (1999).
8. Zakeri, Z. & Lockshin, R. A. Cell death during development. *J Immunol Methods* **265**, 3-20 (2002).
9. Domen, J., Cheshier, S. H. & Weissman, I. L. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells. Overexpression of bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med* **191**, 253-264 (2000).
10. Allen, P. D., Bustin, S. A. & Newland, A. C. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood* **7**, 63-73 (1993).
11. Han, D. K., Haudenschild, C. C., Hong, M. K., Tinkle, B. T., Leon, M. B. & Liau, G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* **147**, 267-277 (1995).

12. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425-1428 (1997).
13. Rathmell, J. C. & Thompson, C. B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109**, S97-S107 (2002).
14. Joaquin, A. M. & Gollapudi, S. Functional decline in aging and disease: a role for apoptosis. *J Am Geriatr Soc* **49**, 1234-1240 (2001).
15. Rudin, C. M. & Thompson, C. B. Apoptosis and disease. Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med* **48**, 267-281 (1997).
16. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
17. Shen, Y. & Shenk, T. E. Viruses and apoptosis. *Curr Op Genet Dev* **5**, 105-111 (1995).
18. Bedi, A., Pasricha, P. J., Akhtar, A. J., Barber, J. P., Bedi, G. C., Giardiello, F. M., Zehnbauser, B. A., Hamilton, S. R. & Jones, R. J. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* **55**, 1811-1816 (1995).
19. Kaufmann, S. H. & Gores, G. J. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* **22**, 1007-1017 (2000).
20. Martin, S. J. & Green, D. R. Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Curr Op Oncology* **6**, 616-621 (1994).
21. Townson, J. L., Naumov, G. N. & Chambers, A. F. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med* **3**, 631-642 (2003).
22. Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-348 (2001).
23. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. & Lowe, S. W. Apoptosis. A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164 (2002).
24. Fadok, V. A. & Chimini, G. The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* **13**, 365-372 (2001).
25. Viret, C. & Janeway, C. A. MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* **1**, 91-104 (1999).

26. O'Reilly, L. A. & Strasser, A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflammation Res* **48**, 5-21 (1999).
27. Aguilar, L. K., Aguilar-Cordova, E., Cartwright, J., Jr. & Belmont, J. W. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *J Immunol* **152**, 2645-2651 (1994).
28. Nijhawan, D., Honarpour, N. & Wang, X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* **23**, 73-87 (2000).
29. Portera-Cailliau, C., Hedreen, J. C., Price, D. L. & Koliatsos, V. E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* **15**, 3775-3787 (1995).
30. Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129 (2000).
31. Estaquier, J., Idziorek, T., de Bels, F., Barre-Sinoussi, F., Hurtrel, B., Aubertin, A. M., Venet, A., Mehtali, M., Muchmore, E., Michel, P., Mouton, Y., Girard, M. & Ameisen, J. C. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **91**, 9431-9435 (1994).
32. Morita, Y. & Tilly, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* **213**, 1-17 (1999).
33. Brenner, S. The genetic of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
34. Sulston, J. E. Post-embryonic development in ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**, 287-297 (1976).
35. Ellis, H. E. & Horvitz, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **44**, 817-829 (1986).
36. Hengartner, M. O., Ellis, R. E. & Horvitz, H. R. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-496 (1992).
37. Yang, X. L., Chang, H. Y. & Baltimore, D. Essential role of *ced-4* oligomerization in *ced-3* activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-1357 (1998).

38. Conradt, B. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* protein egl-1 is required for programmed cell death and interacts with the bcl-2-like protein ced-9. *Cell* **93**, 519-529 (1998).
39. Wu, D. Y., Wallen, H. D. & Nunez, G. Interaction and regulation of subcellular localization of ced-4 by ced-9. *Science* **275**, 1126-1129 (1997).
40. Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J. & Hengartner, M. O. Interaction between the *C. elegans* cell death regulators ced-9 and ced-4. *Nature* **385**, 653-656 (1997).
41. Chinnaiyan, A. M., Orourke, K., Lane, B. R. & Dixit, V. M. Interaction of ced-4 with ced-3 and ced-9; a molecular framework for cell death. *Science* **275**, 1122-1126 (1997).
42. Wu, D. Y., Wallen, H. D., Inohara, N. & Nunez, G. Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease ced-3 by ced-4 and ced-9. *J Biol Chem* **272**, 21449-21454 (1997).
43. Cory, S. & Adams, J. M. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656 (2002).
44. Bouillet, P. & Strasser, A. BH3-only proteins: evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-1574 (2002).
45. Paquet, C. & Bertrand, R. in *Recent Development in Biophysics and Biochemistry* 291-325 (Research Signpost Publisher, Trivandrum, 2003).
46. Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. & Nunez, G. Arc, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5156-5160 (1998).
47. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A. & Wang, X. D. Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413 (1997).
48. Cecconi, F. Apaf1 is no longer single. *Cell Death Differ* **8**, 773-775 (2001).
49. Bouchier-Hayes, L. & Martin, S. J. CARD games in apoptosis and immunity. *Embo Rep* **3**, 616-621 (2002).

50. Bonfoco, E., Li, E., Kolbinger, F. & Copper, N. R. Characterization of a novel proapoptotic caspase-2 and caspase-9 binding protein. *J Biol Chem* **276**, 29242-29250 (2001).
51. Hlaing, T., Guo, R. F., Dilley, K. A., Loussia, J. M., Morrish, T. A., Shi, M. M., Vincenz, C. & Ward, P. A. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **276**, 9230-9238 (2001).
52. Hahn, C., Hirsch, B., Jahnke, D., H, D. & Stein, H. Three new types of Apaf-1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 746-749 (1999).
53. Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K. & Yonehara, S. The ced-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* **398**, 777-785 (1999).
54. Adams, J. M. & Cory, S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 715-720 (2002).
55. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukine-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652 (1993).
56. Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
57. Yang, X. H., Stennicke, H. R., Wang, B. K., Green, D. R., Janicke, R. U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G. S. & Froelich, C. J. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* **273**, 34278-34283 (1998).
58. Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042 (1999).
59. Thornberry, N. A., Ranon, T. A., Pieterston, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcialcalvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. & Nicholson, D. W. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional, relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-17911 (1997).

60. Degtarev, A., Boyce, M. & Yuan, J. A decade of caspases. *Oncogene* **22**, 8543-8567 (2003).
61. Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A. & Becker, J. W. The three-dimensional structure of apoppain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* **3**, 619-625 (1996).
62. Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. Caspases; controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 299-306 (2000).
63. Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C. & Hammill, L. D. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-52 (1994).
64. Deveraux, Q. L. & Reed, T. C. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252 (1999).
65. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
66. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. & Vaux, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53 (2000).
67. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. & Takahashi, R. A serine protease, Htra2, is released from the mitochondria and interacts with Xiap, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-621 (2001).
68. Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**, 432-8 (2002).
69. Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L. & Du, C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly

inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* **17**, 1487-1496 (2003).

70. Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W. & Korneluk, R. G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**, 128-133 (2001).
71. Kluck, R. M., Martin, S. J., Hoffman, B. M., Zhou, J. S., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. Cytochrome C activation of Cpp32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* **16**, 4639-4649 (1997).
72. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. & Wang, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132 (1997).
73. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446 (1999).
74. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
75. Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z. H., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G. & Reed, J. C. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **96**, 5752-5757 (1999).
76. Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciolarosen, L. A. & Rosen, A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* **140**, 1485-1495 (1998).
77. Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N. & DiFiglia, M. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* **276**, 8079-8086 (2001).

78. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. & Kroemer, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**, 381-393 (1999).
79. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
80. Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. & Wallach, D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**, 7795-7798 (1995).
81. Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).
82. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
83. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/Cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (Disc) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588 (1995).
84. Duan, H. & Dixit, V. M. Raidd is a new death adaptor molecule. *Nature* **385**, 86-89 (1997).
85. Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L. J., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and Fas/Tumor necrosis factor receptor-interacting protein Rip. *Cancer Res* **57**, 615-619 (1997).
86. Droin, N., Bichat, F., Rebe, C., Wotawa, A., Sordet, O., Hammann, A., Bertrand, R. & Solary, E. Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. *Blood* **97**, 1835-1844 (2001).
87. Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **96**, 10964-10967 (1999).
88. Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. & Salvesen, G. S. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 8359-8362 (1999).

89. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
90. Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. & Cohen, G. M. Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* **274**, 22686-22692 (1999).
91. Li, H. L., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Y. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
92. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. D. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
93. Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* **277**, 13430-13437 (2002).
94. Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L. & Kumar, S. A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* **159**, 739-745 (2002).
95. Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D. W., Lazebnik, Y. & Flavell, R. A. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* **6**, 1241-1247 (2000).
96. Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., Huang, D. C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K. J., Roy, S., Nicholson, D. W., Vaux, D. L., Bouillet, P., Adams, J. M. & Strasser, A. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* **419**, 634-637 (2002).
97. Lassus, P., Opitz-Araya, X. & Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**, 1352-1354 (2002).

98. Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2002).
99. Perchellet, E. M., Wang, Y., Weber, R. L., Sperflage, B. J., Lou, K., Crossland, J., Hua, D. H. & Perchellet, P. Synthetic 1,4-anthracenedione analogs induce cytochrome c release, caspase-9, -3, and -8 activities, poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage and internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells by a mechanism which involves caspase-2 activation but not Fas signaling. *Biochem Pharmacol* **67**, 523-537 (2004).
100. Tinel, A. & Tschopp, J. The PIDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**, 843-846 (2004).
101. Troy, C. M. & Shelanski, M. L. Caspase-2 redux. *Cell Death Differ* **10**, 101-107 (2003).
102. Kumar, S. & Vaux, D. L. Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage. *Science* **297**, 1290-1291 (2002).
103. Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 1067-1074 (1999).
104. Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A., Dorken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K. & Otto, A. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem* **273**, 28057-28064 (1998).
105. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of Caspase inhibitor in Caspase activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99 (1998).
106. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
107. Compton, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast Rev* **11**, 105-119 (1992).

108. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG & WC, E. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like Ice. *Nature* **371**, 346-347 (1994).
109. Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G. J. & Rosen, A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* **182**, 1625-1634 (1995).
110. Casciola-Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhalt, G. J. & Rosen, A. Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* **269**, 30757-30760 (1994).
111. Flygare, J., Armstrong, R. C., Wennborg, A., Orsan, S. & Hellgren, D. Proteolytic cleavage of Hsrad51 during apoptosis. *FEBS Letters* **427**, 247-251 (1998).
112. Nakajima, T., Morita, K., Ohi, N., Arai, T., Nozaki, N., Kikuchi, A., Osaka, F., Yamao, F. & Oda, K. Degradation of topoisomerase II-alpha during adenovirus Ela-induced apoptosis is mediated by the activation of the ubiquitin proteolysis system. *J Biol Chem* **271**, 24842-24849 (1996).
113. Samejima, K., Svingen, P. A., Basi, G. S., Kottke, T., Mesner, P. W., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G. G., Alnemri, E. S., Champoux, J. J., Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W. C. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 4335-4340 (1999).
114. Ubeda, M. & Habener, J. F. The large subunit of the DNA replication complex c (Dseb/Rf-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (Cpp32/Yama) during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 19562-19568 (1997).
115. Gohring, F., Schwab, B. L., Nicotera, P., Leist, M. & Fackelmayer, F. O. The novel Sar-binding domain of scaffold attachment factor a (Saf-a) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J* **16**, 7361-7371 (1997).
116. Janicke, R. U., Walker, P. A., Lin, X. Y. & Porter, A. G. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* **15**, 6969-6978 (1996).
117. Levkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J. M. & Ross, R. Cleavage of p21(Cip1/Waf1) and p27(Kip1)

mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* **1**, 553-563 (1998).

118. Voelkel-Johnson, C., Entingh, A. J., Wold, W. S., Gooding, L. R. & Laster, S. M. Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* **154**, 1707-1716 (1995).
119. Shao, R. G., Cao, C. X. & Pommier, Y. Activation of PKC-alpha downstream from caspases during apoptosis induced by 7-hydroxystaurosporine or the topoisomerase inhibitors, camptothecin and etoposide, in human myeloid leukemia HL60 cells. *J Biol Chem* **272**, 31321-31325 (1997).
120. Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y. Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. & Kufe, D. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an Ice/Ced 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* **184**, 2399-2404 (1996).
121. Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K. & Kufe, D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 20317-20320 (1997).
122. Cryns, V. L., Byun, Y., Rana, A., Mellor, H., Lustig, K. D., Ghanem, L., Parker, P. J., Kirschner, M. W. & Yuan, J. Y. Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis; identification by a novel, small pool expression cloning strategy. *J Biol Chem* **272**, 29449-29453 (1997).
123. Takahashi, M., Mukai, H., Toshimori, M., Mlyamoto, M. & Ono, Y. Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **95**, 11566-11571 (1998).
124. McGinnis, K. M., Whitton, M. M., Gnegy, M. E. & Wang, K. K. W. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is cleaved by caspase-3 and calpain in Sh-Sy5y human neuroblastoma cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 19993-20000 (1998).
125. Graves, J. D., Gotoh, Y., Draves, K. E., Ambrose, D., Han, D. K. M., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E. A. & Krebs, E. G. Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J* **17**, 2224-2234 (1998).

126. Widmann, C., Gibson, S. & Johnson, G. L. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis; a turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* **273**, 7141-7147 (1998).
127. Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, L., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mekk kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 2416-2429 (1998).
128. Earnshaw, W. C., Martin, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424 (1999).
129. Strohl, C. & Schulze-Osthoff, K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Diff* **4**, 997-1001 (1998).
130. Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K. & Rosen, G. D. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 26056-26061 (1997).
131. Gervais, F. G., Thornberry, N. A., Ruffolo, S. C., Nicholson, D. W. & Roy, S. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a Frnk-like polypeptide. *J Biol Chem* **273**, 17102-17108 (1998).
132. Bannerman, D. D., Sathyamoorthy, M. & Goldblum, S. E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J Biol Chem* **273**, 35371-80 (1998).
133. Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J. & Schneider, C. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol* **139**, 759-771 (1997).
134. Browne, S. J., Williams, A. C., Hague, A., Butt, A. J. & Paraskeva, C. Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a specific low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* **59**, 56-64 (1994).
135. Schmeiser, K. & Grand, R. The fate of E- and P-cadherin during the early stage of apoptosis. *Cell Death Diff* **6**, 377-386 (1999).
136. Meredith, J. E., Jr., Fazeli, B. & Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* **4**, 953-961 (1993).

137. Burridge, K. & Wennerberg, K. Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179 (2004).
138. Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y. & Narumiya, S. p160, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* **404**, 118-124 (1997).
139. Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. LIM-kinase 2 induces formation of stress fibers, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* **354**, 149-159 (2001).
140. Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine-508 within the activation loop. *J Biol Chem* **275**, 3577-3582 (2000).
141. Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S. Cooperation between mDial1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* **1** (1999).
142. Li, F. & Higgs, H. N. The mouse formin mDial1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* **13**, 1335-1340 (2003).
143. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chichara, K., Nakato, T., Matsuura, Y. & Kaibuchi, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-20249 (1996).
144. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakato, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248 (1996).
145. Kaneko, T., Amano, M., Maeda, A., Goto, H., Takahashi, K., Ito, M. & Kaibuchi, K. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 110-116 (2000).
146. Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shikari, K., Takase, K., Hartshorne, D. J. & Nakano, T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett* **475**, 197-200 (2000).

147. Leverrier, Y. & Ridley, A. J. Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat Cell Biol* **3**, E91-E92 (2001).
148. Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. & Pittman, R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* **140**, 627-636 (1998).
149. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M. F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-345 (2001).
150. Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. & Breard, J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**, 346-352 (2001).
151. Daniels, H. & Bokoch, G. p21-Activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* **24**, 350-355 (1999).
152. Bisson, N., Islam, N., Poitras, L., Jean, S., Bresnick, A. & Moss, T. The catalytic domain of xPAK1 is sufficient to induce myosin II dependent in vivo cell fragmentation independently of other apoptotic events. *Dev Biol* **263**, 264-281 (2003).
153. Manser, E., Huang, H. Y., Loo, T. H., Chen, X. Q., Dong, J. M., Leung, T. & Lim, L. Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* **17**, 1129-1143 (1997).
154. Rudel, T. & Bokoch, G. M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of Pak2. *Science* **276**, 1571-1574 (1997).
155. Sabourin, L. A., Seale, P., Wagner, J. & Rudnicki, M. A. Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin- disassembling region. *Mol Cell Biol* **20**, 684-696 (2000).
156. Lee, K. K., Murakawa, M., Nishida, E., Tsubuki, S., Kawashima, S., Sakamaki, K. & Yonehara, S. Proteolytic activation of Mst/Krs, Ste20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. *Oncogene* **16**, 3029-3037 (1998).

157. Huot, J., Houle, F., Marceau, F. & Landry, J. Oxydative stress-induced actin reorganization mediated by p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* **80**, 383-392 (1997).
158. Geng, Y. J., Azuma, T., Tang, J. X., Hartwig, J. H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P. & Kwiatkowski, D. J. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol* **77**, 294-302 (1998).
159. Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C. & Brancolini, C. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci* **112**, 4475-4482 (1999).
160. Wang, K. K. W., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R. V., Glantz, S. B. & Morrow, J. S. Simultaneous degradation of alpha-II- and beta-II-spectrin by caspase 3 (Cpp32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* **273**, 22490-22497 (1998).
161. Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A. & Trapani, J. A. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 39262-39266 (2000).
162. Caulin, C., Salvesen, G. S. & Oshima, R. G. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* **138**, 1379-1394 (1997).
163. Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 7320-7326 (2001).
164. Rao, L., Perez, D. & White, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455 (1996).
165. Buendia, B., Santa-Maria, A. & Courvalin, J. C. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* **112**, 1743-1753 (1999).

166. Yamazaki, Y., Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K. & Oka, S. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **259**, 64-78 (2000).
167. Coleman, M. L. & Olson, M. F. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ* **9**, 493-504 (2002).
168. Bortner, C. D. & Cidlowski, J. A. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 259-81 (2002).
169. Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimancheboitrel, M. T. & Solary, E. Upregulation of Casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* **16**, 2885-2894 (1998).
170. Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y. & Wu, J. Y. Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9155-9160 (1998).
171. Kojima, M., Asahi, M., Kikuchi, H., Hashimoto, N., Noda, M. & Hoshimaru, M. Expression of Nedd2/Ich-1 (Caspase-2) in the developing rat retina. *Neuros Res* **31**, 211-217 (1998).
172. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321 (1998).
173. Colussi, P. A., Harvey, N. L. & Kumar, S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor, a novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem* **273**, 24535-24542 (1998).
174. Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A. & Rosen, A. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* **149**, 603-612 (2000).
175. Shikama, Y. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp Cell Res* **264**, 315-325 (2001).

176. Chandler, J. M., Cohen, G. M. & Macfarlane, M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* **273**, 10815-10818 (1998).
177. van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 487-497 (2003).
178. Jesenberger, V. & Jentsch, S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 112-121 (2002).
179. Jiang, Z. H. & WU, J. Y. Alternative splicing and programmed cell death. *Proc Soc Exp Biol Med* **220**, 64-72 (1999).
180. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Guo, Y., Zhan, Y., Lazebnik, Y., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res* **59**, 999-1002 (1999).
181. Seol, D. W. & Billiar, T. R. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 2072-2076 (1999).
182. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. & Wallach, D. Involvement of Mach, a novel Mort1/Fadd-interacting protease, in Fas/Apo-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815 (1996).
183. Kumar, S., Tomooka, Y. & Noda, M. Identification of a set of gene with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 1155-1161 (1992).
184. Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L. F., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C. M., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L. & Yuan, J. Y. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* **12**, 1304-1314 (1998).
185. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian Il-1-B-converting enzyme. *Gene Dev* **8**, 1613-1626 (1994).

186. Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. & Yuan, J. Ich-1, an Ice/ced3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**, 739-750 (1994).
187. Droin, N., Beauchemin, M., Solary, E. & Bertrand, R. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res* **60**, 7039-7047 (2000).
188. Wotawa, A., Solier, S., Logette, E., Solary, E. & Corcos, L. Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett* **185**, 181-189 (2002).
189. Solier, S., Lansiaux, A., Logette, E., Wu, J., Soret, J., Tazi, J., Bailly, C., Desoche, L., Solary, E. & Corcos, L. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol Cancer Res* **2**, 53-61 (2004).
190. Martinet, W., Knaapen, M. W., De Meyer, G. R., Herman, A. G. & Kockx, M. M. Overexpression of the anti-apoptotic caspase-2 short isoform in macrophage-derived foam cells of human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **162**, 731-736 (2003).
191. Kumar, S. Inhibition of apoptosis by the expression of antisense Nedd2. *FEBS Letters* **368**, 69-72 (1995).
192. Troy, C. M., Stefanis, L., Greene, L. A. & Shelanski, M. L. Nedd2 is required for apoptosis after a trophic factor withdrawal, but not superoxide dismutase (SOD1) downregulation, in sympathetic neurons and PC12 cells. *J Neurosci* **17**, 1911-1918 (1997).
193. Allet, B., Hochmann, A., Martinou, I., Berger, A., Missotten, M., Antonsson, B., Sadoul, R., Martinou, J. C. & Bernasconi, L. Dissecting processing and apoptotic activity of a cysteine protease by mutant analysis. *J Cell Biol* **135**, 479-486 (1996).
194. Jesenberger, V., Procyk, K. J., Yuan, J., Reipert, S. & Baccarini, M. Salmonella-induced Caspase-2 Activation in Macrophages. A novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* **192**, 1035-1046 (2000).
195. Jin, K., Nagayama, T., Mao, X., Kawaguchi, H., Hickey, R. W., Greenberg, D. A., Simon, R. P. & Graham, S. H. Two caspase-2 transcripts are

- expressed in rat hippocampus after global ischemia. *J Neurochem* **81**, 25-35 (2002).
196. Colussi, P. A. & Kumar, S. Targeted disruption of caspase genes in mice: What they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis. *Immunol Cell Biol* **77**, 58-63 (1999).
 197. Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C. & Brancolini, C. Caspase-2-induced apoptosis dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J Biol Chem* **276**, 21907-21915 (2001).
 198. Li, H. L., Bergeron, L., Cryns, V., Pasternack, M. S., Zhu, H., Shi, L. F., Greenberg, A. & Yuan, J. Y. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 21010-21017 (1997).
 199. O'Reilly, L. A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D. L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D. C. & Kumar, S. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ* **9**, 832-841 (2002).
 200. Van de Craen, M., Declercq, W., Van den Brande, I., Fiers, W. & Vandenamele, P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* **6**, 1117-1124 (1999).
 201. Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C. & Brancolini, C. Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem* **277**, 29803-29809 (2002).
 202. Li, D., Das, S., Yamada, T. & Samuels, H. H. The NRIF3 family of transcriptional coregulators induces rapid and profound apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **24**, 3838-3848 (2004).
 203. Ceruti, S., Beltrami, E., Matarrese, P., Mazzola, A., Cattabeni, F., Malorni, W. & Abbracchio, M. P. A key role for caspase-2 and caspase-3 in the apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine (cladribine) and 2-chloro-adenosine in human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* **63**, 1437-1447 (2003).
 204. Harvey, N. L., Butt, A. J. & Kumar, S. Functional activation of Nedd2/Ich-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 13134-13139 (1997).

205. Butt, A. J., Harvey, N. L., Parasivam, G. & Kumar, S. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (Caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem* **273**, 6763-6768 (1998).
206. Colussi, P. A., Harvey, N. L., Shearwinwhyatt, L. M. & Kumar, S. Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *J Biol Chem* **273**, 26566-26570 (1998).
207. Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* **6**, 643-648 (2004).
208. Droin, N., Rebe, C., Bichat, F., Hammann, A., Bertrand, R. & Solary, E. Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. *Oncogene* **20**, 260-269 (2001).
209. Ito, A., Uehara, T. & Nomura, Y. Isolation of Ich-1S (caspase-2S)-binding protein that partially inhibits caspase activity. *FEBS Lett* **470**, 360-364 (2000).
210. Porter, A. G. & Janicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **2**, 99-104 (1999).
211. Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. & Porter, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 9357-9360 (1998).
212. Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L. & Flavell, R. A. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **95**, 13618-13623 (1998).
213. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. & Henson, P. M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90 (2000).
214. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2**, 965-975 (2002).

215. Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G. & Bertrand, R. Bax- α promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death Differ* **5**, 506-516 (1998).
216. Paquet, C., Schmitt, E., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells. *Apoptosis* **9**, 815-831 (2004).
217. Sordet, O., Khan, Q. A., Kohn, K. W. & Pommier, Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **3**, 271-290 (2003).
218. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
219. Kaufmann, S. H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* **49**, 5870-5878 (1989).
220. Barry, M. A., Behnke, C. A. & Eastman, A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* **40**, 2353-2362 (1990).
221. Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D. & Pommier, Y. Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res* **51**, 6280-6285 (1991).
222. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171 (1996).
223. Cryns, V. & Yuan, J. Y. Proteases to die for. *Genes Dev* **12**, 1551-1570 (1998).
224. Schmitt, E., Sane, A. T. & Bertrand, R. Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug Resist Updates* **2**, 21-29 (1999).
225. Zhang, J. D., Reedy, M. C., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the

- initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol* **145**, 99-108 (1999).
226. Cotter, T. G., Lennon, S. V., Glynn, J. M. & Green, D. R. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Research* **52**, 997-1005 (1992).
227. Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J. E. & Robaye, B. Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J Cell Physiol* **184**, 239-245 (2000).
228. Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A. & Bertrand, R. Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp Cell Res* **240**, 107-121 (1998).
229. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase 9 activation. *Oncogene* **23**, 3915-3931 (2004).
230. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E. S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* **269**, 30761-30764 (1994).
231. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M. & Lazebnik, Y. A. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43 (1995).
232. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**, 459-470 (2002).
233. Martins, L. M., Kottke, T. J., Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W. C. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood* **92**, 3042-3049 (1998).
234. Mannick, J. B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K. & Gaston, B. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* **154**, 1111-1116 (2001).

235. Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. & Yuan, J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**, 739-750 (1994).
236. Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. D. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184 (1997).
237. Liu, X. S., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T. & Wang, X. D. The 40-Kda subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8461-8466 (1998).
238. Wright, S. C., Wei, Q. S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D. H. & Larrick, J. W. Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J Exp Med* **180**, 2113-2123 (1994).
239. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y. & Counis, M. F. L-Dnase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol* **18**, 3612-3619 (1998).
240. Yoshida, A., Pourquier, P. & Pommier, Y. Purification and characterization of a Mg²⁺-dependent endonuclease (An34) from etoposide-treated human leukemia HL-60 cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* **58**, 2576-2582 (1998).
241. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. & Martin, S. J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**, 281-292 (1999).
242. Tschopp, J., Irmeler, M. & Thome, M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**, 552-558 (1998).
243. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. & Zeiher, A. M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* **185**, 601-607. (1997).

244. Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M. & de Lanerolle, P. Inhibition of myosine light chain kinase by p21 activated kinase. *Science* **283**, 2083-2085 (1999).
245. Goeckeler, Z. M., Masaracchia, R. A., Zeng, Q., Chew, T. L., Gallagher, P. J. & Wysolmersky, R. B. Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* **275**, 18366-18374 (2000).
246. Song, Q., Wei, T., Lees-Miller, S., Alnemri, E., Watters, D. & Lavin, M. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 157-162. (1997).
247. Weaver, V. M., Lach, B., Walker, P. R. & Sikorska, M. Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem Cell Biol* **71**, 488-500 (1993).
248. Sané, A. T. & Bertrand, R. Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities. *Cancer Res* **58**, 3066-3072 (1998).
249. Xanthoudakis, S. & Curran, T. Identification and characterization of Ref-1, an nuclear protein that facilitates AP-1 DNA binding activity. *Embo J* **11**, 653-655 (1992).
250. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F. & Youle, R. J. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**, 4385-4399 (2003).
251. Wei, Y., Fox, T., Chambers, S. P., Sintchak, J., Coll, J. T., Golec, J. M., Swenson, L., Wilson, K. P. & Charifson, P. S. The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol Interact* **7**, 423-432 (2000).
252. Denault, J. B. & Salvesen, G. S. Human caspase-7 activity and regulation by its N-terminal peptide. *J Biol Chem* **278**, 34042-34050 (2003).
253. Paquet, C., Sané, A.-T., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Caspase-, sphingosine- and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene submit MS#01587* (2004).

254. Polverino, A. J. & Patterson, S. D. Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 cells. *J Biol Chem* **272**, 7013-7021 (1997).
255. Porter, A. & Janicke, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **Feb 6**, 99-104 (1999).
256. Lai, J. M., Hsieh, C. L. & Chang, Z. F. Caspase activation during phorbol ester-induced apoptosis requires ROCK-dependent myosin-mediated contraction. *J Cell Sci* **116**, 3491-3501 (2003).

