

Université de Montréal

**Étude des mécanismes des voies mitochondriale et lysosomiale dans l'apoptose
p53-indépendante induite par les agents chimiothérapeutiques**

par
Claudie Paquet

Programmes de Biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Biologie moléculaire

octobre, 2004



© Claudie Paquet, 2004

QH

506

U54

2005

V. 018

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

Cette thèse intitulée :
**Étude des mécanismes des voies mitochondriale et lysosomiale dans l'apoptose
p53-indépendante induite par les agents chimiothérapeutiques**

présentée par:
Claudie Paquet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marie-Josée Hébert
président-rapporteur

Dr. Richard Bertrand
directeur de recherche

Dr. Anne-Marie Mes-Masson
membre du jury

Dr. Guy Poirier
examineur externe

Dr. Réjean Lapointe
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La protéine supresseur de tumeurs p53 est impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique et dans l'activation de l'apoptose. En réponse à divers traitements anti-cancéreux, la protéine p53 est activée et induit l'apoptose des cellules tumorales. La perte de fonction de p53 est associée à la tumorigenèse et la protéine p53 est effectivement mutée dans plus de la moitié des néoplasies humaines. Ces tumeurs p53-déficientes démontrent souvent une résistance envers les traitements anti-cancéreux et représentent des cibles difficiles pour les thérapies actuelles. Alors que l'apoptose médiée par p53 a fait l'objet de nombreuses études et est relativement bien caractérisée, les voies apoptotiques activées en l'absence de p53 sont actuellement peu connues. Mon projet de doctorat vise à mieux définir les voies apoptotiques p53-indépendantes, plus particulièrement à caractériser les voies lysosomiale et mitochondriale, des voies impliquées dans l'apoptose induite par un dommage génotoxique.

La méthodologie expérimentale consiste à induire l'apoptose dans des lignées cellulaire tumorales humaines p53-déficientes par un traitement avec l'agent anti-cancéreux inducteur de dommage génotoxique camptothecine (CPT), puis à étudier et à caractériser les mécanismes moléculaires de la mort apoptotique p53-indépendante. Nos travaux ont mis en évidence l'activation d'une nouvelle voie apoptotique impliquant les lysosomes, caractérisée par une perméabilisation de la membrane lysosomiale et par l'activation de la protéase lysosomiale cathepsine-B qui contribue à la propagation de l'apoptose. L'activation de la voie lysosomiale semble nécessiter au préalable la dysfonction mitochondriale. L'activation des caspases est essentielle pour que la CPT provoque la perméabilisation des mitochondries et des lysosomes et la caspase-2 semble jouer un rôle initiateur important dans l'activation de l'apoptose. L'accumulation intracellulaire de sphingosine suite au traitement de CPT pourrait être impliquée dans le mécanisme de rupture de la membrane lysosomiale.

La voie mitochondriale joue un rôle central dans l'apoptose induite par un dommage génotoxique et cette voie est modulée principalement par les protéines de la famille Bcl-2. Nos travaux démontrent que plusieurs protéines pro-apoptotiques Bcl-2-like se déplacent vers la mitochondrie après le traitement de CPT, où ces protéines s'oligomérisent pour former les complexes protéiques endogènes suivants: Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 et Bim/Bcl-2. Toutefois, ces protéines semblent

demeurer absentes du compartiment lysosomal pendant l'apoptose médiée par la CPT. Nous avons également recherché des facteurs de transcription impliqués dans l'apoptose p53-indépendante. Nos travaux suggèrent que p73 et p63, les deux autres membres de la famille p53, ont une fonction pro-apoptotique après l'induction du dommage à l'ADN.

Globalement, nos travaux démontrent l'activation d'une voie lysosomiale qui semble contribuer à la voie mitochondriale et à l'apoptose p53-indépendante. La relocalisation mitochondriale et l'oligomérisation des protéines Bcl-2-like contribuent de manière plausible à la dysfonction mitochondriale qui mène à l'apoptose p53-indépendante. Les facteurs p73 et p63 pourraient médier l'apoptose en l'absence de p53. L'ensemble de cette étude a donc permis de mieux caractériser les voies mitochondriale et lysosomiale de l'apoptose p53-indépendante induites par une lésion génotoxique. Une meilleure compréhension des voies apoptotiques en l'absence de p53 pourra permettre de développer de nouvelles thérapies ou d'améliorer les traitements existants pour cibler plus efficacement les tumeurs p53-déficientes.

Mots clés

apoptose

cancer

chimiothérapie

camptothecine

mitochondrie

lysosome

protéines de la famille Bcl-2

p53/p63/p73

caspase

sphingosine

SUMMARY

The p53 tumor suppressor protein regulates diverse cellular processes to prevent the accumulation of genetic alterations and is involved in the activation of apoptosis. In response to cancer chemotherapy and radiotherapy, p53 is normally activated and induces apoptosis in tumor cells. The loss of p53 function is associated with tumorigenesis and more than half of human tumors have mutations within the p53 gene or defects in their capacity to induce a functional p53 factor. These p53-deficient tumors often display drug resistance and represent difficult targets for current cancer therapies. While p53-mediated apoptosis has been the subject of extensive research and begins to be well elucidated, the p53-independent apoptotic pathways induced by genotoxic stress are rather poorly understood. My research project was undertaken to investigate and to better characterize p53-independent apoptosis, particularly the mitochondrial and lysosomal apoptotic pathways, which are involved in DNA damage-induced apoptosis.

The experimental method consists of inducing apoptosis in p53-deficient human tumor cell lines with the DNA damage-inducing anticancer drug camptothecin (CPT) and to study the molecular mechanisms of p53-independent apoptotic death. Here we demonstrate the rapid activation of a new apoptotic pathway involving lysosomes, characterized by lysosomal membrane permeabilization and activation of the lysosomal protease cathepsin B, which actively contributes to apoptosis propagation after CPT treatment. Activation of this lysosomal pathway first necessitates mitochondrial dysfunction and caspase activities are required for both mitochondrial and lysosomal CPT-induced permeabilization. Moreover, our results suggest a crucial initiator role for caspase-2 in CPT-mediated death. The accumulation of intracellular sphingosine after CPT treatment could be involved in the mechanism of lysosomal membrane rupture induced by DNA damage.

The mitochondrial pathway is central in genotoxic stress-induced apoptosis and specially regulated by proteins of the Bcl-2 family. Our work shows that several pro-apoptotic members of the Bcl-2 family translocate to mitochondria shortly after CPT treatment, where they oligomerize to form the following endogenous protein complexes: Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 and Bim/Bcl-2. However, our results suggest that Bcl-2-like proteins do not target the lysosomal compartment during CPT-induced apoptosis. In parallel, we have initiated studies to identify transcription factors

involved in p53-independent cell death and preliminary work suggests a proapoptotic function for the p53 homologs p73 and p63 after DNA damage induction.

Overall, our study reports the activation of a new lysosomal pathway which likely contributes to the mitochondrial pathway and p53-independent apoptosis after DNA damage. The mitochondrial translocation and/or oligomerization of multiple Bcl-2-like proteins may contribute to mitochondrial dysfunction leading to p53-independent apoptosis. Finally, p73 and p63 factors are likely candidates to mediate apoptosis in the absence of p53. Therefore, this work allows a better characterization of the molecular mechanisms underlying the mitochondrial and lysosomal pathways of p53-independent apoptosis after genotoxic stress. A better understanding of the p53-independent apoptotic pathways activated by chemotherapeutic drugs will certainly help to design new therapeutic strategies or to improve existing therapies to target most efficiently p53-deficient human tumors.

Key words

apoptosis

cancer

chemotherapy

camptothecin

mitochondria

lysosome

proteins of the Bcl-2 family

p53/p63/p73

caspase

sphingosine

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Mots clés	ii
Summary	iii
Key words	iv
Table des matières	v
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xvi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 L'apoptose	1
1.1.1 L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée essentiel	1
1.1.2 Les caractéristiques de l'apoptose	1
1.1.3 L'apoptose et le cancer	2
1.2 Les bases moléculaires de l'apoptose	3
1.2.1 Les études génétiques chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
1.2.2 Les trois phases du processus apoptotique	5
1.2.3 La famille Bcl-2	6
1.2.3.1 Structure et classification	6
1.2.3.2 Oligomérisation	9
1.2.3.3 Localisation sous-cellulaire	10
1.2.3.4 Régulation	11
1.2.4 La famille des caspases	14
1.2.4.1 Les voies d'activation des caspases	14
1.2.4.2 Les inhibiteurs des caspases	19
1.3 Les principales voies apoptotiques	23
1.3.1 La voie mitochondriale	23

1.3.1.1	Définition et caractéristiques	23
1.3.1.2	Les principaux modèles de perméabilisation des mitochondries	24
1.3.1.3	La translocation mitochondriale et l'action des protéines de la famille Bcl-2	31
1.3.1.4	Les évènements en aval de la perméabilisation mitochondriale	35
1.3.2	La voie lysosomiale	37
1.3.2.1	Définition et caractéristiques	37
1.3.2.2	La rupture lysosomiale et les cathepsines dans l'apoptose	40
1.3.2.3	Les mécanismes de perméabilisation lysosomiale	41
1.3.3	L'implication des autres organites	43
1.3.3.1	Le réticulum endoplasmique	43
1.3.3.2	Le noyau	46
1.3.4	La voie des récepteurs de mort cellulaire	48
1.4	Le dommage à l'ADN	51
1.4.1	Les inhibiteurs de topoisomérases	51
1.4.2	Les facteurs de transcription activés par le dommage à l'ADN	53
1.4.2.1	Le facteur p53	53
1.4.2.2	L'apoptose p53-indépendante	55
1.4.2.3	Les facteurs p73 et p63	55
1.4.2.4	Le facteur NF- κ B	57
1.4.2.5	Autres facteurs de transcription	58
1.5	Les percées thérapeutiques dans le domaine de l'apoptose et du cancer	62
1.6	Objectif du projet de doctorat	64

CHAPITRE 2.	Caspase-, sphingosine- and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis (<i>article soumis à Oncogene, sept.2004</i>)	67
	Résumé	68
	Summary	69
	Introduction	70
	Materials and methods	74
	Results	82
	Discussion	89
	Abbreviations	95
	Acknowledgments	96
	References	97
	Figures	102
CHAPITRE 3.	Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells (<i>Apoptosis, vol.9(6): 815-31, 2004</i>)	114
	Résumé	115
	Summary	116
	Introduction	117
	Materials and methods	120
	Results	127
	Discussion	137
	Abbreviations	144
	Acknowledgments	145
	References	146
	Figures	156

CHAPITRE 4.	Étude des facteurs de transcription impliqués dans l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN	172
4.1	Résumé	172
4.2	Matériels et méthodes	173
4.3	Présentation et description des résultats	178
4.3.1	Une fonction anti-apoptotique pour les facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1	178
4.3.2	Une fonction pro-apoptotique pour les facteurs p73 et p63	181
	Figures	184
CHAPITRE 5.	DISCUSSION	191
5.1	Pertinence du projet de doctorat par rapport au domaine du cancer, de la chimiothérapie et de l'apoptose	191
5.2	Caractérisation d'une voie apoptotique lysosomiale	193
5.2.1	La camptothécine induit une perméabilisation lysosomiale et active la cathepsine-B	193
5.2.2	La rupture lysosomiale dépend de la perméabilisation des mitochondries	196
5.2.3	Les caspases sont essentielles aux voies mitochondriale et lysosomiale	199
5.2.4	L'implication des sphingosines dans le mécanisme de rupture de la membrane lysosomiale	201
5.3	Rôles des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la voie mitochondriale de l'apoptose p53-indépendante	204

5.3.1	Induction et/ou augmentation de l'expression des BH3-unique Bik et Bim après l'induction d'un dommage à l'ADN	204
5.3.2	Translocation mitochondriale et oligomérisation des protéines Bcl-2-like après l'induction d'un dommage à l'ADN	208
5.4	Un rôle pro-apoptotique pour les facteurs de transcription p73 et p63 dans l'apoptose p53-indépendante	213
5.5	Conclusions	220
5.6	Perspectives	222
CHAPITRE 6.	BIBLIOGRAPHIE	230
CHAPITRE 7.	ANNEXES	276
7.1	Annexe I Unique and multi-domain Bcl-2 family members: post-translational modifications and apoptosis regulation (In: <i>Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry, vol.3(pt I): 291-325, 2003</i>)	276
7.2	Annexe II Bcl-xES, a BH4- and BH3-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation (<i>Oncogene, vol.23(22): 3915-31, 2004</i>)	312
7.3	Annexe III Characterization of Bax- σ , a cell death-inducing isoform of Bax (<i>Biochem Biophys Res Commun, vol.270(3): 868-79, 2000</i>)	330

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1.

Fig.1	Les homologies entre la machinerie moléculaire de l'apoptose chez <i>C. elegans</i> et chez les mammifères	4
Fig.2	Les protéines de la famille Bcl-2	8
Fig.3	La famille des caspases	15
Fig.4	Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale	26
Fig.5	La voie apoptotique lysosomiale	39

CHAPITRE 2.

Fig.1	Parameters of CPT-induced apoptosis in U937 and Namalwa cells	102
Fig.2	Effect of mPTP and Bcl-xL on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL	104
Fig.3	Effect of caspase inhibition on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL in U937 and Namalwa cells	106
Fig.4	Effect of sphingosine levels on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL in U937 cells	108
Fig.5	Effect of cathepsin B inhibition on parameters of CPT-induced apoptosis in U937 cells	110
Fig.6	Kinetics of Bcl-2 family proteins expression after CPT treatment in U937 and Namalwa cells	112

CHAPITRE 3.

Fig.1	Kinetics of apoptosis after camptothecin (CPT) treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	156
Fig.2	Kinetics of Bcl-2 family member mRNA expression following CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	159
Fig.3	Kinetics of expression of pro-apoptotic Bcl-2 family member after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	162
Fig.4	Mitochondrial relocalization of pro-apoptotic Bcl-2 family members after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	164

Fig.5	FPLC elution profiles of high molecular weight protein complexes of Bax- α , Bak, Bik, Bim-EL, Bcl-2 and VDAC1 on Superose 6-HR 16/50 after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	166
Fig.6	Co-immunoprecipitation of mitochondrial Bax, Bak and Bim oligomers induced by CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells	168
Fig.7	Mitochondrial relocation of Bax- α after CPT treatment in p53-deficient human histiocytic lymphoma U-937 cells	170

CHAPITRE 4.

Fig.1	L'inhibition du facteur de transcription NF- κ B sensibilise les cellules Namalwa à la fragmentation de l'ADN induite par la CPT	184
Fig.2	L'inhibition du facteur de transcription c-Jun/AP1 sensibilise les cellules Namalwa à la fragmentation de l'ADN induite par la CPT	186
Fig.3	L'inhibition des facteurs de transcription p73 et p63 protège les cellules Namalwa de la fragmentation de l'ADN induite par la CPT	188

CHAPITRE 5.

Fig.6	Caractéristiques de la voie apoptotique lysosomiale induite par la CPT	203
Fig.7	La voie des sphingomyélines et des sphingosines	224

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- ADN: acide déoxyribonucléique
ADP: adénosine diphosphate
AIF: apoptosis-inducing factor
ANT: adenine nucleotide translocator
AP1: activating protein 1
Apaf-1: apoptosis-activating factor-1
ARF: alternative reading frame
ATM: ataxia teleangiectasia mutated
ATP: adénosine triphosphate
ATR: ataxia teleangiectasia Rad3 related
BASC: BRCA1-associated genome surveillance complex
Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2
BH: Bcl-2 homology
BIR: baculoviral IAP repeat
BkA: bongkrelic acid
bZIP: basic region leucine zipper
CAD: caspase-activated deoxyribonuclease
CARD: caspase recruitment domain
CCCP: cyanide *m*-chlorophenylhydrazone
Cdk: cyclin-dependent kinase
Ced: cell death abnormal
Ci: curie
CML: chronic myelogenous leukemia
CL: cardiolipine
CPT: camptothecin
CrmA: Cowpox virus product cytokine response modifier A
CsA: cyclosporin A
dATP: déoxyadénosine triphosphate
Da: dalton
DcR: decoy receptor
DD: death domain

DED: death effector domain
DFF: DNA fragmentation factor
DISC: death-inducing signaling complex
DMS: N,N-dimethylsphingosine
DNA: deoxyribonucleic acid
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase
DR: death receptor
ECL: enhanced chemiluminescence
Egl-1: egg laying defective
EMSA: electromobility shift assay
FADD: Fas-associated DD
Fas-L: Fas ligand
FB₁: fumonisin B₁
FBA: filter binding assay
Fig.: figure
FLICE: FADD-like ICE
FLIP: FLICE-inhibitory protein
FoxO: forkhead box-containing protein, O subfamily
g: gramme
G₁: gap 1
Gadd45: growth arrest- and DNA damage-inducible 45
G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GTP: guanine triphosphate
h: hour
HDAC: histone deacetylase
IAP: inhibitor of apoptosis protein
I^{CAD}: inhibitor of CAD
ICE: interleukine-1 β converting enzyme
Ig: immunoglobuline
I κ B: inhibitor of NF- κ B
IKK: I κ B kinase
IL: interleukine

IP: immunoprécipitation
k: kilo
IP₃: inositol-1,4,5-triphosphate
JNK: c-Jun N-terminal protein kinase
l: litre
LPC: lysophosphatidylcholine
m: milli
M: molaire
MAC: mitochondrial apoptosis-induced channel
MAPK: mitogen-activated protein kinase
min: minute
mol: mole
mPTP: mitochondrial permeability transition pore
Nam: Namalwa
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NGF: neuronal growth factor
NHEJ: non-homologous end joining
NLS: nuclear localization signal
NK: natural killer
NOE: N-oleoylethanolamine
OPG: osteoprotegerin
PACAP: proapoptotic caspase adaptor protein
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PFD: pore-forming domain
PIDD: p53-induced protein with a DD
PIG: p53-inducible gene
PI3K: phosphatidylinositol-3'-OH kinase
PLA2: phospholipase A2
PML: promyelocytic leukemia
PS: phosphatidylserine
RNAi: RNA interference

RE: réticulum endoplasmique
RLO: radicaux libres de l'oxygène
RNA: ribonucleic acid
S: synthèse
SAPK: stress-activated protein kinase
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA-2: sarco(endo)-plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase
Serpine: serine protease inhibitor
siRNA: small interfering RNA
Spi2A: serine protease inhibitor 2A
ssALL: small scale lysosomal leakage
tBid: truncated Bid
TLC: thin layer chromatography
TNF: tumor necrosis factor
TNF-R1: tumor necrosis factor-receptor 1
TRAF: TNF receptor-associated factor
Trail: TNF-related apoptosis inducing ligand
 μ : micro
VDAC: voltage-dependent anion channel
VEGF: vascular endothelial growth factor
VP16: etoposide
XIAP: X-linked IAP
Z-VAD-FMK: benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(Ome)-fuloromethylketone
Z-FA-DMK: benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-diazomethylketone
 $^{\circ}\text{C}$: degré Celsius
%: pourcentage
 $\Delta\Psi\text{m}$: potentiel transmembranaire mitochondrial
 $\downarrow\Delta\Psi\text{m}$: chute du potentiel transmembranaire mitochondrial
17-AAG: 17-allylaminogeldanamycin

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Richard Bertrand, pour son support, sa patience, sa générosité et sa disponibilité. Je tiens à souligner l'encadrement exceptionnel dont j'ai bénéficié tout au long de mes études graduées dans son laboratoire.

Je remercie mes collègues de travail, Stéphane Bergeron, Myriam Beauchemin, Estelle Schmitt, Nicolas Parent, Alain-Théophile Sané et Nathalie Droin, pour leur support, leurs encouragements et pour tout le plaisir que nous avons eu à travailler ensemble. J'ai grandement apprécié leur compagnie et leur bonne humeur tout au long de ces années. Je remercie également tous les étudiants et le personnel de l'Institut du Cancer de Montréal, des Programmes de Biologie Moléculaire et du Centre de Recherche du CHUM, pour leurs encouragements et leurs conseils, ainsi que pour tous les efforts et l'énergie déployés dans le but de nous permettre d'accéder à une formation de qualité dans un environnement de recherche dynamique et sympathique.

Je remercie également les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), l'Institut du Cancer de Montréal, Candérel, le Centre de Recherche du CHUM et les Programmes de Biologie Moléculaire de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier.

Finalement, je remercie de tout coeur Eric pour m'avoir accompagnée tout au long de ce cheminement et d'avoir partagé avec moi les périodes difficiles tout comme les moments heureux. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur support et leurs encouragements que j'ai grandement appréciés pendant toutes ces années.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 L'apoptose

1.1.1 L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée essentiel

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée via lequel les cellules âgées, endommagées, mutées ou anormales sont éliminées sans endommager les cellules avoisinantes et sans éliciter de réponse inflammatoire [1]. En plus d'être impliquée dans de nombreux processus tels que le développement, la différenciation cellulaire et le vieillissement, l'apoptose joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, ce qui nécessite un équilibre précis entre les taux de prolifération et de mort cellulaire. En effet, dans le corps humain, trois millions de leucocytes meurent par apoptose et sont remplacés par de nouvelles cellules à chaque minute [2]. Lors du développement du cerveau, la moitié des neurones sont éliminés par apoptose [3] et jusqu'à 95 % des lymphocytes T meurent par le même processus pendant leur maturation dans le thymus [4]. La mort cellulaire par apoptose est donc un processus primordial qui intervient chaque jour tout au long de la vie d'un organisme multicellulaire.

1.1.2 Les caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose est définie par un ensemble de caractéristiques morphologiques et biochimiques particulières telles que la diminution du volume cellulaire, le rétrécissement de la cellule, l'apparition de circonvolutions de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine en périphérie du noyau, la fragmentation de l'ADN de façon internucléosomique et le démantèlement ultime de la cellule en une multitude de corps apoptotiques qui sont immédiatement phagocytés par les macrophages et les cellules avoisinantes [5, 6]. Parmi les altérations biochimiques, on observe certaines modifications dans la fonction mitochondriale comme la chute du $\Delta\Psi_m$ (*potentiel transmembranaire mitochondrial*) alors que la production d'ATP (*adénosine triphosphate*) demeure intacte, le relargage dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux tels que le cytochrome c et AIF (*apoptosis-inducing factor*), et finalement l'activation des caspases qui sont responsables du clivage protéolytique d'une multitude de substrats cellulaires

spécifiques [7-11]. Ce mode de mort cellulaire permet donc d'éliminer les cellules de façon naturelle, sans éliciter de réponse inflammatoire et sans endommager les tissus environnants. Au contraire, la mort cellulaire par nécrose survient surtout après un traumatisme cellulaire d'ordre pathologique et est caractérisée par un gonflement de la cellule, une perte de fonction des organites, une rupture de la membrane plasmique et le déversement dans l'espace extracellulaire des constituants de la cellule qui agissent comme médiateurs pro-inflammatoires [1]. L'apoptose et la nécrose sont donc deux processus distincts, le premier étant généralement considéré comme une mort cellulaire naturelle et discrète, alors que le second est plutôt associé à une mort cellulaire accidentelle ou pathologique. Toutefois, plusieurs stimuli de mort cellulaire peuvent induire soit l'apoptose ou la nécrose, dépendamment du type cellulaire et de l'intensité et de la gravité de l'insulte. Un dommage cellulaire sévère poussera plutôt la cellule vers une mort nécrotique [12-14]. La nécrose peut également survenir dans certaines conditions où l'apoptose est bloquée [15]. Il semble que la disponibilité en énergie cellulaire soit également un facteur déterminant dans le choix d'une cellule de mourir par apoptose ou par nécrose. En effet, une cellule commise à l'apoptose pourra être forcée de mourir par nécrose si les niveaux d'énergie cellulaire sont rapidement épuisés [15, 16].

1.1.3 L'apoptose et le cancer

L'apoptose est donc un processus de mort cellulaire essentiel qui est contrôlée de façon très précise. Des anomalies ou déficiences de l'apoptose ou de ses mécanismes de régulation peuvent conduire à de nombreux désordres pathologiques. C'est le cas notamment de certaines maladies auto-immunes et neurodégénératives dans lesquelles une stimulation anormale de l'apoptose cause un taux de mort cellulaire excessif et la perte non-désirée de nombreuses cellules [3]. D'autre part, un taux de mort cellulaire insuffisant dû à des défaillances dans le processus apoptotique joue un rôle central dans le développement de nombreuses néoplasies [3]. En effet, la tumorigenèse semble être associée à la perte de la capacité des cellules à contrôler leur prolifération et à mourir par apoptose [17-19]. Les cellules mutées ou anormales continuent donc de proliférer au lieu de mourir par apoptose, ce qui favorise le développement de tumeurs. En oncologie, l'intérêt porté à l'apoptose provient d'observations démontrant que les thérapies anticancéreuses comme les radiations ionisantes et les agents chimiothérapeutiques

déclenchent souvent le processus de mort apoptotique dans les cellules tumorales. L'efficacité de plusieurs agents anti-tumoraux dépend donc de leur habileté à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses humaines. Des anomalies dans le processus apoptotique ou des défaillances de ses mécanismes de contrôle peuvent donc être responsables de la résistance des tumeurs envers les traitements anti-cancéreux. [2, 20-29].

1.2 Les bases moléculaires de l'apoptose

1.2.1 Les études génétiques chez *Caenorhabditis elegans*

Les principes moléculaires de base de l'apoptose ont surtout été établis grâce aux études génétiques effectuées chez le nématode *C. elegans*, qui ont fourni les premières évidences que des gènes spécifiques codent pour des protéines activatrices, inhibitrices ou effectrices du processus apoptotique (voir Fig.1 - *Les homologues entre la machinerie moléculaire de l'apoptose chez C. elegans et chez les mammifères*) [30, 31]. La machinerie de mort cellulaire programmée décrite chez *C. elegans* implique 4 gènes centraux, *ced-9* (*cell death abnormal-9*), *ced-4*, *ced-3* et *egl-1* (*egg laying defective-1*) [32-35]. Les gènes *ced-4* et *ced-3* sont requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose, alors que *ced-9* agit en amont pour antagoniser les fonctions de *ced-4* et *ced-3* et protéger la cellule de la mort. Le gène *egl-1* code pour un régulateur négatif de l'activité de *ced-9*, favorisant ainsi la mort apoptotique. La découverte d'homologues de ces gènes chez les mammifères suivie par des analyses fonctionnelles qui ont révélé des similitudes dans leurs mécanismes d'action suggèrent fortement que l'apoptose est un processus spécifique et conservé au cours de l'évolution (voir Fig.1 - *Les homologues entre la machinerie moléculaire de l'apoptose chez C. elegans et chez les mammifères*). La protéine Ced-9 présente plusieurs similarités de séquence avec les membres de la famille Bcl-2 chez les mammifères qui sont des protéines régulatrices du processus apoptotique [36]. La protéine Egl-1 est l'homologue d'une sous-catégorie de la famille Bcl-2 appelée les BH3-unique qui sont des régulateurs positifs de l'apoptose [37, 38]. La protéine Ced-3 est apparentée à l'enzyme ICE (*interleukine-1 β converting enzyme*), membre de la famille des caspases, les protéases à cystéine qui sont les effecteurs de l'apoptose [34, 39-41]. Finalement, la protéine Apaf-1 (*apoptosis-activating factor-1*) est le premier homologue humain identifié de Ced-4 et fait

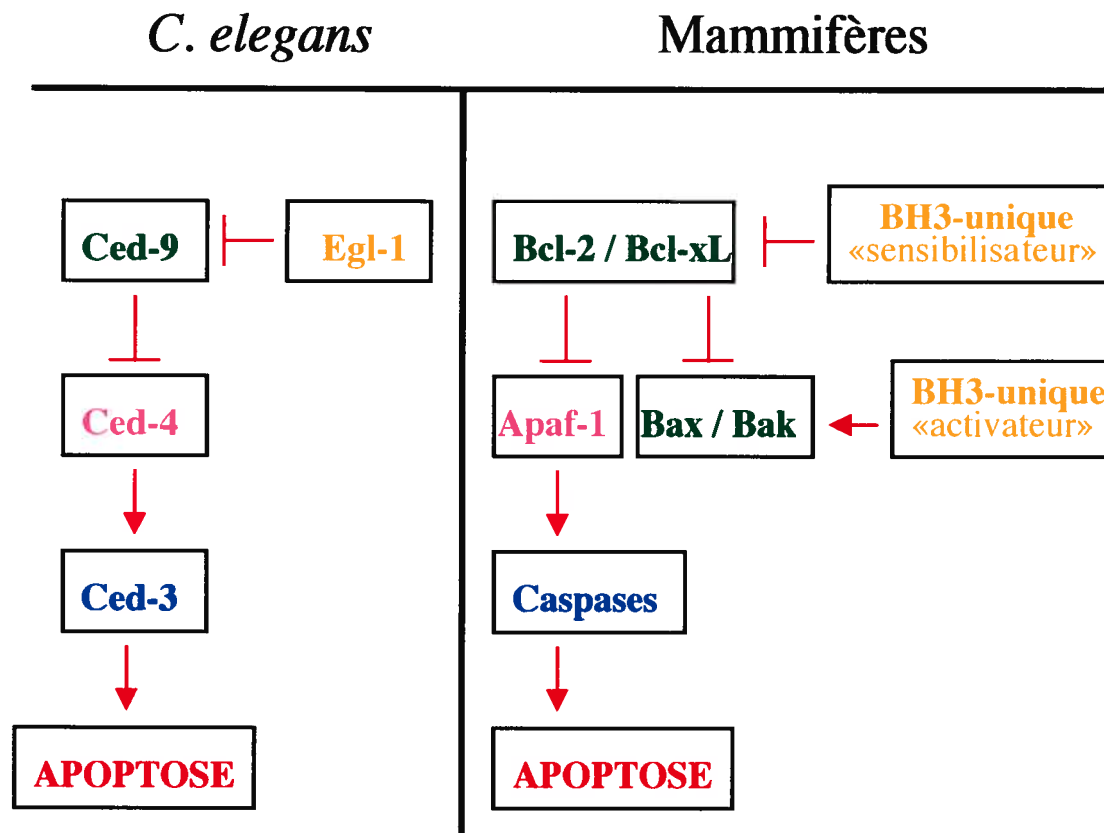


Fig.1 Les homologues entre la machinerie moléculaire de l'apoptose chez *C. elegans* et chez les mammifères.

Chez le nématode *C. elegans*, les protéines Ced-4 et Ced-3 sont requises pour l'initiation et l'exécution du programme apoptotique. Ced-9 agit en amont pour antagoniser les fonctions de Ced-4 et Ced-3, alors que Egl-1 est un régulateur négatif de l'activité de Ced-9.

Chez les mammifères, les protéines de la famille Bcl-2 sont homologues à Ced-9 et sont des régulateurs du processus apoptotique. Les protéines pro-apoptotiques BH3-unique, une sous-catégorie de la famille Bcl-2, sont homologues à Egl-1 et modulent positivement l'apoptose. Apaf-1 est une molécule adaptatrice homologue à Ced-4 et les caspases sont apparentées à Ced-3 et constituent les effecteurs de l'apoptose.

partie d'une famille de protéines adaptatrices en expansion qui promouvoit l'activation des caspases [42-46].

1.2.2 Les trois phases du processus apoptotique

La mort cellulaire par apoptose peut se diviser en trois phases distinctes: l'initiation, l'exécution et la dégradation. Au cours de la phase d'initiation, les cellules reçoivent des signaux de mort cellulaire qui vont enclencher le programme d'apoptose [3, 47, 48]. Parmi les principaux stimuli apoptotiques on retrouve le dommage à l'ADN, généré entre autres par les thérapies anti-cancéreuses, la ligation de certains récepteurs à la surface de la cellule tels que les récepteurs de mort cellulaire Fas et TNF-R1 (*tumor necrosis factor-receptor 1*), des conditions sous-optimales de croissance dues à une carence en facteurs nutritifs ou à l'hypoxie, l'action d'une panoplie de toxines intracellulaires comme les radicaux libres de l'oxygène (RLO) et l'oxyde nitrique, la surabondance de seconds messagers cellulaires tels que le calcium et les céramides, l'activation de certaines kinases et l'action d'une multitude d'agents cytotoxiques exogènes [49-51]. La phase d'initiation est donc très hétérogène de par sa nature et elle est succédée par la phase effectrice ou d'exécution au cours de laquelle des voies communes d'apoptose sont activées, particulièrement la voie mitochondriale. En effet, la majorité des signaux apoptotiques convergent vers la mitochondrie qui joue un rôle central dans la décision d'une cellule de survivre ou de mourir par apoptose. Plusieurs facteurs apoptogéniques dont le cytochrome c, une molécule cruciale pour l'activation des caspases [8, 9], AIF, un activateur de nucléases [52], Diablo/Smac, un facteur qui promouvoit l'activation des caspases via son effet inhibiteur sur les IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) [53, 54], Endo G, une DNase apoptotique [55, 56], Omi/HtrA2, un inhibiteur des IAPs possédant une activité sérine protéase pro-apoptotique [57] et certaines pro-caspases [58-61] sont localisés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et sont relargués dans le cytosol en cours d'apoptose suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La perméabilisation des mitochondries est généralement suivie par l'activation des caspases et l'engagement irréversible vers une mort apoptotique. Cette phase cruciale de dysfonction mitochondriale est contrôlée de façon extrêmement précise principalement par les protéines de la famille Bcl-2 [62-65]. Une fois que la cellule est commise à l'apoptose, la phase ultime de dégradation s'enclenche au cours de laquelle surviennent des

manifestations classiques de l'apoptose telles que la fragmentation de l'ADN, l'apparition de boursoflures au niveau de la membrane cellulaire appelée « *blebbing* » et le démantèlement de la cellule sous forme de corps apoptotiques. Cette phase de dégradation est gouvernée principalement par l'activité protéolytique des caspases envers une pléiade de substrats cellulaires ainsi que par l'action de DNases spécifiques, et culmine avec la phagocytose et la dégradation complète des corps apoptotiques à l'intérieur de la cellule phagocyte [66]. Le rôle crucial joué par les protéines de la famille Bcl-2 et les caspases est abordé de manière plus détaillée dans les sections suivantes.

1.2.3 La famille Bcl-2

1.2.3.1 Structure et classification

Le gène *bcl-2* (*B cell lymphoma/leukemia-2*) a été localisé pour la première fois au point de cassure chromosomique d'une translocation t(14;18) retrouvée dans les lymphomes à cellules B, provoquant une expression dérégulée de *bcl-2* [67, 68]. Des translocations chromosomiques activent *bcl-2* dans environ 85% des lymphomes folliculaires à cellules B non-Hodgkiniens [69]. Suite à ces observations, *bcl-2* fut considéré comme le fondateur d'une nouvelle classe d'oncogènes qui agissent en empêchant la mort des cellules tumorales par apoptose au lieu de promouvoir la prolifération cellulaire comme un oncogène classique [70-72]. L'inhibition de l'apoptose comme étape cruciale de la tumorigenèse est aujourd'hui un concept bien établi. Chez les mammifères, la grande famille des protéines Bcl-2, aussi appelée les « *Bcl-2-like* », comporte actuellement une trentaine de membres qui sont répartis en deux catégories principales: les anti-apoptotiques qui favorisent la survie cellulaire et les pro-apoptotiques qui promouvoient l'apoptose. Ces protéines sont considérées comme des régulateurs cruciaux du processus de mort cellulaire programmée. Le niveau d'expression d'une faction versus l'autre influence grandement la sensibilité des cellules envers un signal apoptotique [73, 74]. Les protéines de la famille Bcl-2 sont caractérisées par la présence de domaines d'homologie de séquence appelés les domaines BH (*Bcl-2 homology*). Quatre de ces domaines ont été décrits jusqu'à maintenant, BH1, BH2, BH3 et BH4, et chaque membre de la famille Bcl-2 est constitué d'une combinaison variable de ces 4 domaines d'homologie (*voir Fig.2 - Les protéines de la famille Bcl-2*) [65]. Les protéines anti-

apoptotiques protègent les cellules de la mort cellulaire après une variété d'insultes et la surexpression de certaines de ces protéines a été observée dans de nombreuses néoplasies [17, 75, 76]. Dans la catégorie des anti-apoptotiques, on retrouve principalement les protéines suivantes: Bcl-2 [67, 68], Bcl-xL [77], Bcl-xES [78], Bcl-w [79], Mcl-1 [80], A1/Bfl-1 [81, 82], Brag-1 [83], Boo/Diva [84, 85], Bcl-B [86] et Bcl-2L-10 [87]. Ces protéines de survie sont des protéines multi-domaines qui contiennent au moins les domaines BH1 et BH2; celles qui s'apparentent le plus à Bcl-2 possèdent les 4 domaines BH. Des niveaux anormalement élevés de Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 et A1 ont été reportés dans plusieurs néoplasmes [88]. À l'opposé, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent se retrouver mutées ou sous-exprimées dans certaines tumeurs [76]. Selon leur structure et leur fonction biochimique, les protéines pro-apoptotiques se subdivisent en deux catégories: les protéines multi-domaines constituées des domaines BH1, BH2 et BH3 telles que Bax [73] et ses nombreux isoformes [89-94], Bak [95-97], Bcl-xS [77], Bok/Mtd [98, 99], Bcl-rambo [100] et Bcl-gL [101], et les protéines de type BH3-unique qui sont construites d'un seul, ou parfois de deux domaines BH3. Parmi les BH3-unique on retrouve les protéines suivantes: Bad [102], Bid [103], Bik/Nbk/mBlk [104-106], Bim/Bod et ses isoformes [107-111], Harakiri/Dp5 [112, 113], BNip1, BNip3 [114] et leurs variants BNip1b [115], BNip3L/Nix/BNip3 α [116-118], Puma/Bcb3 [119, 120], Noxa [121], Bcl-gS [101], Mcl-1S [122, 123], Bmf [124], Map-1 [125], Itm2Bs [126] et Spike [127]. Une perte de fonction de certaines protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak et Bim semble accélérer le processus de tumorigenèse [88]. Outre les domaines BH, certaines protéines des Bcl-2 contiennent un domaine PFD (*pore-forming domain*) qui semble procurer aux protéines la capacité de former des canaux ioniques dans les membranes, ainsi qu'une extrémité hydrophobique en position C-terminale qui serait impliquée dans l'ancrage des protéines dans la membrane de certains organites cytoplasmiques. La structure de certains anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL contient également une longue boucle flexible riche en proline qui pourrait servir de domaine de modulation de l'activité anti-apoptotique, tout en conférant une meilleure stabilité à la protéine [128-132].



ANTI-APOPTOTIQUES	PRO-APOPTOTIQUES	
multi-domaines	multi-domaines	BH3-unique
Bcl-2	Bax	Bad
Bcl-xL	Bak	Bid
Bcl-xES	Bcl-xS	Bik/Nbk/mBlk
Bcl-w	Bok/Mtd	Bim/Bod
Mcl-1	Bcl-rambo	Harakiri/Dp5
A1/Bfl-1	Bcl-gL	BNip1
Brag-1		BNip1b
Boo/Diva		BNip3
Bcl-B		BNip3L/Nix/BNip3α
Bcl-2L-10		Puma/Bcb3
		Noxa
		Bcl-gS
		Mcl-1S
		Bmf
		Map-1
		Itm2Bs
		Spike

Fig.2 Les protéines de la famille Bcl-2.

Chez les mammifères, la grande famille des protéines Bcl-2 est répartie en deux catégories principales: les anti-apoptotiques qui favorisent la survie cellulaire et les pro-apoptotiques qui promouvoient l'apoptose. Ces protéines sont constituées de combinaisons variables des 4 domaines d'homologie de séquence BH1, BH2, BH3 et BH4. Les protéines de type BH3-unique sont une sous-catégorie des pro-apoptotiques et sont généralement constituées d'un seul, ou parfois de deux domaines BH3.

1.2.3.2 Oligomérisation

L'oligomérisation entre les différents membres des Bcl-2 est le mode d'action principal de cette famille de protéines. C'est la combinaison particulière de domaines BH qui détermine le potentiel de dimérisation d'une protéine Bcl-2-like [133-135]. L'hétérodimérisation entre un membre pro-apoptotique et un membre anti-apoptotique peut neutraliser leur fonction respective, suggérant que l'abondance relative d'un clan par rapport à l'autre joue un rôle important dans l'habileté d'une cellule à mourir par apoptose [73, 74]. Ce sont les domaines structuraux BH qui permettent de telles interactions protéiques via le modèle suivant: les domaines BH1, BH2 et BH3 d'une première protéine se replient pour créer une pochette hydrophobe dans laquelle l'hélice- α du domaine BH3 d'une seconde protéine peut se nicher, formant ainsi un dimère gouverné par des forces hydrophobes et électrostatiques [136-138]. Le domaine BH3, qui permet la dimérisation des protéines Bcl-2-like, est souvent uniquement nécessaire pour qu'une cellule meure par apoptose et des peptides composés uniquement du domaine BH3 sont suffisants pour tuer une cellule [133, 139, 140]. Par conséquent, les protéines BH3-unique sont des médiateurs efficaces de l'apoptose. Selon les modèles actuels, les BH3-unique promouvoient l'apoptose de deux façons. Certains BH3-unique peuvent se lier aux anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL, ce qui inhibe leur fonction pro-survie, possiblement via la libération d'une protéine pro-apoptotique multi-domaines (ex: Bax, Bak) qui était séquestrée par l'anti-apoptotique. Les BH3-unique qui neutralisent ainsi leurs homologues anti-apoptotiques sont de type « sensibilisateur ». Bik, Bad et Noxa font apparemment partie de cette catégorie. Le second mode d'action des BH3-unique est de dimériser avec les protéines pro-apoptotiques multi-domaines telles que Bax et Bak, ce qui stimule le changement de conformation nécessaire pour que Bax et Bak s'insèrent et s'activent au niveau de la membrane mitochondriale. Ces BH3-unique sont de type « activateur » et Bid, plus précisément un fragment tronqué de Bid, nommé tBid (*truncated Bid*) est le seul membre officiel de cette catégorie pour l'instant [134, 139, 141-145]. Les protéines de la famille Bcl-2 forment donc un réseau dynamique complexe d'homo- et d'hétéro-oligomères qui module la réponse apoptotique après un signal de mort cellulaire.

1.2.3.3 Localisation sous-cellulaire

Les protéines de la famille Bcl-2 résident à des endroits particuliers dans la cellule. La localisation sous-cellulaire de ces protéines serait étroitement reliée à leur fonction. Les anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL sont généralement ancrés dans ou attachés faiblement à la membrane mitochondriale externe, la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et celle du noyau, où ils semblent exercer diverses fonctions pour promouvoir la survie de la cellule [70, 146-149], alors que la localisation des pro-apoptotiques semble varier en fonction de l'état de la cellule. Par exemple, la majorité (environ 60 %) de la protéine pro-apoptotique Bax se retrouve sous forme soluble dans le cytosol en l'absence de stimulus de mort cellulaire. Suite à un signal apoptotique, Bax change de conformation ce qui stimule son déplacement vers la mitochondrie et son insertion dans la membrane mitochondriale externe [150-152]. Bax a également été localisé au niveau du RE où il pourrait exercer certaines fonctions pro-apoptotiques [153-155]. La protéine Bak semble résider de façon constitutive au niveau de la membrane mitochondriale externe, sous une forme inactive dans une cellule saine. Bak changerait de conformation et deviendrait actif après un signal apoptotique [156]. De petites quantités de Bak ont également été détectées au RE [153-155]. Des études ont démontré que les protéines Bax et Bak agissent de façon redondante dans plusieurs modèles d'apoptose. La présence d'une protéine semble pouvoir compenser pour l'absence de l'autre, et la perte de fonction des deux protéines est souvent nécessaire pour préserver l'intégrité mitochondriale et empêcher la mort cellulaire après une multitude de signaux apoptotiques [142, 157, 158]. Les protéines de type BH3-unique sont retrouvées soit au niveau cytosolique comme Bid [103] et Bad [159], où elles peuvent être libres ou liées à d'autres protéines, soit elles sont reliées à des éléments du cytosquelette comme Bim et Bmf, qui sont attachés au gros complexe microtubulaire de dynéine [160] et à la myosine V du complexe d'actine [124], respectivement. En réponse à un signal apoptotique, les gènes codant pour les protéines BH3-unique peuvent être activés transcriptionnellement et les protéines peuvent subir divers changements et modifications post-traductionnelles qui stimulent leur translocation vers les organites de la cellule où elles interagissent avec les différents membres des Bcl-2 pour moduler leur fonction [37, 124, 144, 159-164].

1.2.3.4 Régulation

L'activité des protéines de la famille Bcl-2 est régulée via les deux processus biologiques suivants: la régulation transcriptionnelle, qui affecte leur niveau d'expression, et les modifications post-traductionnelles qui modulent leur comportement et leur fonction. Des signaux cellulaires de survie, de différenciation et de mort gouvernent ces mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle, contrôlant ainsi l'activité des protéines Bcl-2-like.

Parmi les signaux qui affectent la transcription des gènes de la famille *bcl-2*, on retrouve l'action de cytokines et facteurs de croissance qui favorisent généralement la survie cellulaire. Par exemple, l'IL-3 (*interleukine-3*) peut stimuler la transcription du gène *bcl-2* [165] et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) peut induire l'expression de *mcl-1* [166]. Certaines cytokines comme le G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) et le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) peuvent également réguler de façon négative le gène *bax*, favorisant ainsi la survie cellulaire [167]. L'hormone estrogène semble être responsable de l'induction de *bcl-2* dans les cellules de cancer du sein estrogène-dépendantes, favorisant leur survie [168]. La dérégulation de l'expression de certains gènes peut également résulter de translocations chromosomiques. Par exemple, dans 85 % des cas de lymphomes folliculaires humains, une translocation dans les lymphocytes B cause la juxtaposition du gène *bcl-2* et des éléments « *enhancer* » E μ dans le locus de l'IgH (*immunoglobuline H*), ce qui résulte en une surexpression de *bcl-2* [67]. Le niveau d'expression des protéines Bcl-2-like peut également être modulé directement par des facteurs de transcription. Dans un contexte de cellules tumorales soumises à un traitement anti-cancéreux, plusieurs facteurs de transcription sont activés et vont induire l'expression de gènes pro-apoptotiques, mais aussi de gènes anti-apoptotiques, la cellule tentant de survivre malgré le stimulus de mort cellulaire [26]. Les principaux facteurs de transcription activés après le dommage à l'ADN et leurs rôles dans l'induction des gènes impliqués dans le processus apoptotique, incluant la famille Bcl-2, seront abordés dans une section ultérieure (*voir section: 1.4.2 - Les facteurs de transcription activés par le dommage à l'ADN*).

Outre la régulation au niveau transcriptionnel, les protéines de la famille Bcl-2 subissent une panoplie de modifications post-traductionnelles qui modulent leur action. La régulation post-traductionnelle des protéines Bcl-2-like et les impacts de ces modifications

sur leurs fonctions dans l'apoptose sont abordés et décrits dans un chapitre de livre rédigé au cours de mon doctorat et mis en annexe de cette présente thèse (*voir section: 7.1 - Annexe I*) [169]. Parmi les événements post-traductionnels que subissent les protéines de la famille Bcl-2, on retrouve principalement la phosphorylation, le clivage protéolytique, la myristoylation, les changements de conformation et l'ubiquitination. La séquestration dans des compartiments sous-cellulaire particuliers peut également être considérée comme un événement post-traductionnel qui affecte l'activité des Bcl-2-like. De façon générale, la phosphorylation des molécules Bad [159, 170, 171] et Bid [163] réprime leur fonction pro-apoptotique, alors que la phosphorylation de Bik [164] stimule son potentiel pro-apoptotique. La phosphorylation de l'anti-apoptotique Bcl-2 peut engendrer une stimulation ou une répression de son activité, dépendamment du stimulus initiateur et du nombre de sites phosphorylés [172, 173]. En effet, dans la voie signalétique des cytokines et des facteurs de croissance, la phosphorylation de Bcl-2 sur l'unique site de la sérine-170, situé dans la région structurale en forme de boucle, stimule son activité pro-survie [174, 175]. À l'opposé, Bcl-2 est inhibé lorsqu'il est hyper-phosphorylé à de multiples résidus localisés dans le domaine en forme de boucle, pendant le processus mitotique [132, 176-180]. De façon similaire, la phosphorylation de Bcl-xL inhibe aussi son activité anti-apoptotique [181]. Le clivage protéolytique que subissent certaines protéines Bcl-2-like est également un événement crucial dans plusieurs voies apoptotiques, surtout en ce qui concerne le BH3-unique Bid. Le clivage de Bid par des enzymes protéolytiques comme la caspase 8 génère tBid, un fragment tronqué en position N-terminale qui possède un fort potentiel pro-apoptotique [182-184]. De plus, la myristoylation subséquente de la molécule tBid sur un résidu glycine semble accroître davantage sa fonction pro-apoptotique [162]. La protéine Bax semble être elle aussi une cible de la protéolyse et le fragment clivé de Bax possède apparemment une plus grande activité pro-apoptotique au niveau mitochondrial [185]. Le clivage protéolytique du BH3-unique Bad a aussi été reporté, et le fragment tronqué de Bad semble lui aussi être un meilleur inducteur d'apoptose [186]. Les anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 peuvent aussi subir un clivage protéolytique qui atténue leur propriété pro-survie [187, 188]. Jusqu'à aujourd'hui, il semble donc que la protéolyse des molécules Bcl-2-like stimule la mort cellulaire programmée. De façon générale, les changements de conformation des protéines Bcl-2-like favorisent leur activation. Par exemple, les changements de conformation que subissent les molécules Bax et Bak en cours d'apoptose sont essentiels et stimulent leur insertion et activation au niveau de la

membrane mitochondriale [189]. La liaison d'un BH3-unique de type activateur comme tBid avec Bax et Bak semble induire les changements structuraux nécessaires chez les protéines multi-domaines pour qu'elles puissent s'insérer et/ou s'activer dans les membranes [144, 161, 189, 190]. Des changements de conformation semblent aussi précéder les événements d'homo- et d'hétéro-oligomérisation entre les différents membres des Bcl-2 [144, 161]. Dans la majorité des cas, la séquestration sous-cellulaire des protéines de la famille Bcl-2 a pour objectif de les éloigner de leur site d'action principal, c'est-à-dire la mitochondrie, et possiblement aussi des autres organites comme le RE. Par exemple, lorsque les facteurs nutritifs sont présents en quantité suffisante, la séquestration du BH3-unique Bad dans le cytosol par la protéine chaperone 14-3-3 empêche Bad de se déplacer vers la mitochondrie et d'induire l'apoptose de la cellule [159, 171]. De plus, il a été démontré dans des cellules stimulées à l'IL-4, que Bad pourrait également être séquestré au niveau de microdomaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques. Lorsque l'IL-4 est retirée, la cellule subit une carence et Bad est subséquemment relâché et transloque vers la mitochondrie pour induire l'apoptose [191]. L'activité des BH3-unique Bim et Bmf est aussi régulée par séquestration sous-cellulaire. Dans une cellule saine, ces protéines sont retenues au niveau de certains éléments du cytosquelette et sont relâchées après un stimulus apoptotique pour se diriger vers la mitochondrie et/ou lier et inhiber leurs homologues anti-apoptotiques [124, 160]. Pour ce qui est de la protéine Bax, elle semble être inactive sous sa forme cytosolique libre [150, 151, 189] et certaines activités kinases pourraient être responsables de la séquestration de Bax dans le cytosol [192-195]. La liaison de Bax avec certaines protéines co-activatrices comme Peg3/Pw1 et Bif-1 pourrait également moduler les déplacements sous-cellulaires de Bax en stimulant des changements de conformation qui favorisent la translocation mitochondriale de Bax [196, 197]. À l'opposé, Bax peut être séquestré dans le cytosol par une autre chaperone, la protéine 14-3-3 σ , empêchant ainsi l'apoptose [198]. Finalement, l'ubiquitination semble aussi être un mécanisme important qui régule la demi-vie des protéines de la famille Bcl-2. Certaines protéines, telles que Bax, Bak, tBid, Bik, Bcl-2 et Bcl-xES semblent être très sensibles à l'activité du système ubiquitine/protéosome [78, 199-203]. Dans le cas de Bcl-2, son état de phosphorylation semble influencer sa sensibilité au système ubiquitine/protéosome. La déphosphorylation de Bcl-2 représenterait un signal positif pour l'ubiquitination et la dégradation [204], alors que la phosphorylation de Bcl-2 semble lui conférer une protection contre l'activité du système

ubiquitine/protéosome [205]. Récemment, Sun et al. ont démontré que certaines sous-unités régulatrices du protéosome sont des substrats protéolytiques pour les caspases en cours d'apoptose. Il en résulte donc une inactivation ou une réduction d'activité du système ubiquitine/protéosome, ce qui empêche la dégradation de certaines molécules pro-apoptotiques telles que Diablo/Smac et Omi/HtrA2 [206]. L'inhibition du système ubiquitine/protéosome représente donc un nouveau mécanisme qui pourrait hausser la demi-vie de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose, facilitant ainsi le processus de mort cellulaire programmée.

1.2.4 La famille des caspases

1.2.4.1 Les voies d'activation des caspases

Les enzymes protéolytiques de la famille des caspases constituent la machinerie moléculaire responsable de l'exécution du processus apoptotique. La famille des caspases chez les mammifères regroupe aujourd'hui 14 protéases, dont le fondateur fut l'enzyme ICE ou la caspase-1, l'homologue de la protéine Ced-3 de *C. elegans* (voir Fig.3 - *La famille des caspases*) [39]. Quatorze caspases existent donc chez les mammifères, numérotées de 1 à 14, et le génome humain encode 11 de ces caspases; les homologues humains des caspase-11, -12 et -13 n'ayant pas encore été décrits. Les caspases sont des protéases à cystéine très sélectives qui clivent leur substrat uniquement après un résidu aspartate [34]. Elles sont synthétisées dans la cellule sous formes de précurseurs inactifs ou zymogènes, appelés pro-caspases, qui nécessitent un clivage protéolytique au niveau d'un résidu aspartate pour générer la forme catalytique active [207-210]. Les caspases sont un hétéro-dimère formés de deux sous-unités: une grande et une petite (voir Fig.3 - *La famille des caspases*). La pro-caspase inactive contient en plus un pro-domaine de longueur variable en position N-terminale qui sera libéré lors du clivage protéolytique qui active l'enzyme. Deux hétéro-dimères fusionnent ensuite pour former la caspase pleinement active, qui est donc un hétéro-tétramère constitué de deux grandes et de deux petites sous-unités [211-215]. La présence du résidu aspartate au site de clivage explique la capacité des caspases à s'auto-activer ou à être activées par d'autres caspases, générant ainsi une boucle d'évènements protéolytiques appelée la cascade des caspases [216]. Selon la

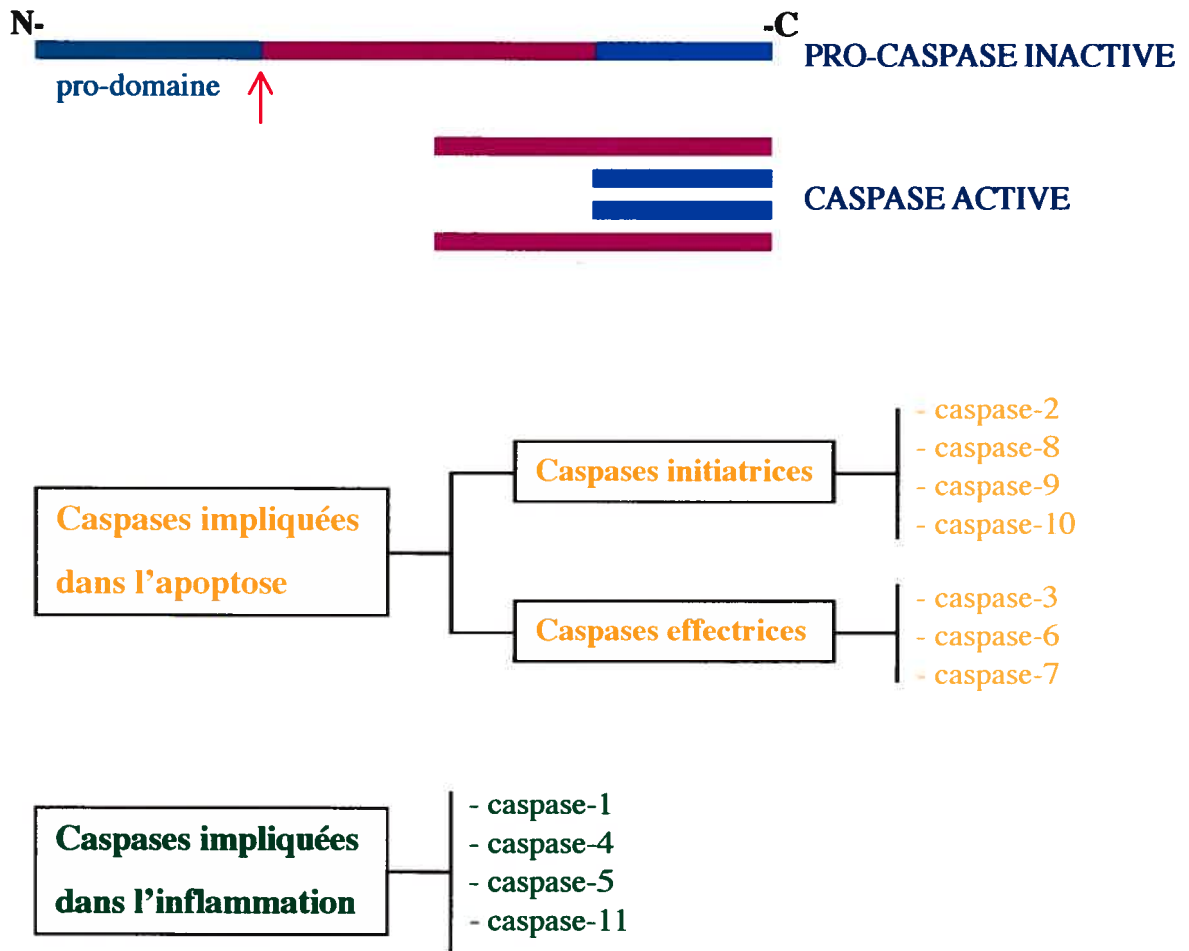


Fig.3 La famille des caspases.

Les caspases sont des protéases à cystéine qui sont synthétisées dans la cellule sous forme de précurseur inactif, appelé pro-caspase, qui contient un pro-domaine de longueur variable ainsi qu'une grande sous-unité et une petite sous-unité. La pro-caspase est clivée au niveau d'un résidu aspartate (↑), ce qui libère le pro-domaine et génère la forme catalytique active. La caspase active est un hétéro-dimère formé de deux grandes sous-unités et deux petites sous-unités. Chez les mammifères, les caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 sont impliquées dans l'apoptose, alors que les caspase-1, -4, -5 et -11 sont plutôt associées au processus d'inflammation. Parmi les caspases apoptotiques, celles contenant un long pro-domaine (-2, -8, -9, -10) agissent généralement en tant que caspases initiateuses de la cascade protéolytique, alors que celles avec un court pro-domaine (-3, -6, -7) sont les caspases effectrices responsables du clivage des divers substrats cellulaires pendant le processus apoptotique.

longueur de leur pro-domaine, les caspases peuvent être divisées en deux groupes: les caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 et -13 contiennent un long pro-domaine, alors que les caspase-3, -6, -7 et -14 possèdent un court pro-domaine [215, 217]. Le long pro-domaine de plusieurs caspases peut contenir deux types de motifs d'interactions protéiques, nommés le domaine DED (*death effector domain*) et le domaine CARD (*caspase recruitment domain*). Ces motifs semblent médier les interactions protéiques qui permettent l'oligomérisation des pro-caspases et/ou facilitent le recrutement d'autres molécules adaptatrices ou activatrices [218-222]. Les caspases avec un long pro-domaine agissent généralement en tant que caspases initiatrices de la cascade. Leur rôle serait d'activer les autres caspases, celles avec un court pro-domaine, qui sont les caspases effectrices responsables du clivage des divers substrats cellulaires [217]. De plus, les caspases effectrices peuvent également cliver et activer les caspases initiatrices, générant des boucles de rétroaction positive qui amplifie l'action protéolytique de la cascade des caspases [223]. Les caspases identifiées jusqu'à aujourd'hui ne sont pas toutes impliquées dans le processus apoptotique. Les caspase-1, -4, -5 et -11 jouent plutôt un rôle dans la maturation des cytokines et sont donc associées au processus d'inflammation, alors que les caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 exécutent le programme d'apoptose [39, 207]. Des centaines de protéines cellulaires sont des substrats des caspases en cours d'apoptose [224]. Cette activité protéolytique des caspases est essentielle à diverses étapes du processus apoptotique et est responsable du démantèlement ultime de la cellule et de la morphologie typique des cellules en apoptose [209, 223].

Deux voies majeures d'activation des caspases ont été étudiées et décrites de façon élaborée au cours des dernières années. La voie dite « extrinsèque » est initiée au niveau de la membrane plasmique suite à la ligation et l'activation des récepteurs de mort cellulaire tels que Fas/CD95/Apo-1, TNF-R1, DR-3 (*death receptor-3*), DR-4, DR-5 et DR-6 par leur ligand respectif. L'activation de ces récepteurs enclenche l'assemblage intracellulaire de plusieurs molécules adaptatrices en un complexe d'activation de caspases appelé le DISC (*death-inducing signaling complex*), qui recrute ensuite plusieurs zymogènes de pro-caspase-8. Ces pro-enzymes vont s'activer, apparemment via le modèle d'auto-protéolyse induite via leur proximité, et les molécules de caspase-8 matures vont enclencher la cascade protéolytique des caspases [4, 208, 225-227].

La seconde voie d'activation des caspases est appelée la voie « intrinsèque », parce qu'elle est enclenchée de façon interne, principalement au niveau du compartiment

mitochondrial. De nombreuses insultes cytotoxiques, causées entre autres par les thérapies anti-cancéreuses, provoquent une perméabilisation des mitochondries et le relargage subséquent des molécules apoptogéniques dans le cytosol. En présence de dATP, le cytochrome c s'associe avec la molécule adaptatrice Apaf-1 pour former un autre complexe activateur de caspases appelé l'apoptosome classique (cytochrome c/Apaf-1/pro-caspase-9). L'apoptosome promouvoit l'activation de la pro-caspase-9 initiatrice, qui active à son tour les caspases effectrices, dont la caspase-3, pour mener à l'apoptose de la cellule [42, 228-230]. Les voies apoptotiques impliquant la mitochondrie et les récepteurs de mort cellulaire sont très complexes et seront abordées de façon plus détaillée dans les sections suivantes.

Une troisième voie d'activation des caspases a également été suggérée au cours des dernières années. En 2002, les travaux de Marsden et al. ont démontré que des lymphocytes doublement déficients pour les protéines Apaf-1 et caspase-9, dans lesquels l'apoptosome classique (cytochrome c/Apaf-1/caspase-9) ne peut donc pas être constitué, peuvent quand même mourir par apoptose et des activités de caspases ont été détectées dans ces cellules [231]. Les caspases peuvent donc être activées indépendamment de l'apoptosome classique, suggérant l'existence d'un nouveau complexe d'activation de caspases, impliquant possiblement la caspase-2, qui pourrait agir en amont de la mitochondrie et être régulé par les protéines de la famille Bcl-2 [231]. La caspase-2, une caspase initiatrice dont les fonctions dans l'apoptose n'étaient pas très bien définies, a fait l'objet de nombreuses études récentes qui lui ont associé un rôle dans l'induction des dommages mitochondriaux. Deux isoformes de la caspase-2 existent chez l'humain et la souris, une forme longue pro-apoptotique, la caspase-2L et une forme courte anti-apoptotique, la caspase-2S [232]. Lorsqu'on parle de la caspase-2, on fait en général référence à la forme longue pro-apoptotique. La caspase-2 pourrait bien faire partie d'un nouvel apoptosome qui inclurait une molécule adaptatrice similaire à Apaf-1. Un candidat plausible serait la protéine pro-apoptotique PACAP (*proapoptotic caspase adaptor protein*) qui interagit avec les caspase-2 et -9 et pourrait servir d'adaptateur dans l'apoptosome de la caspase-2 [233]. Mais récemment, Tinel et al. ont reporté l'existence d'un nouveau complexe d'activation de la caspase-2 qu'ils ont appelé le PIDDosome [234]. Ce nouvel apoptosome est un complexe tri-moléculaire constitué de la caspase-2, de la protéine RAIDD et de la protéine PIDD (*p53-induced protein with a DD*) [234]. RAIDD est un adaptateur qui contient un domaine CARD, qui pourrait médier le recrutement de la

caspase-2, ainsi qu'un domaine DD (*death domain*), qui a la capacité de se lier à un second domaine DD similaire, présent entre autres chez la sérine thréonine kinase RIP et dans la portion cytoplasmique des récepteurs de mort cellulaire [235-237]. PIDD est une protéine qui a été identifiée originellement comme étant induite par p53 [238] et dont la fonction est actuellement incertaine [239]. La présence du DD de PIDD semble médier l'interaction avec RAIDD qui recrute la caspase-2 via son domaine CARD [234]. Toujours selon Tinel et al., l'assemblage du PIDDosome stimulerait l'activation de la caspase-2, mais d'une façon non cytotoxique, et un second signal de nature inconnue est apparemment requis pour que la caspase-2 active médie l'apoptose [234]. Plusieurs études récentes ont démontré un rôle majeur pour la caspase-2 dans la perméabilisation mitochondriale [240-244]. Par exemple, en utilisant un système dans lequel l'expression de la caspase-2 est inhibée par la technique d'interférence par l'ARN ou RNAi (*RNA interference*), Lassus et al. ont démontré que la caspase-2 semble être essentielle pour qu'il y ait perméabilisation mitochondriale, relargage cytosolique du cytochrome c et de Diablo/Smac et mort par apoptose après un dommage à l'ADN induit par l'étoposide, la cisplatine ou les rayons UV [241]. Toutefois, ce phénomène semble être spécifique à certains types cellulaires et/ou à des stimuli apoptotiques particuliers. En effet, la caspase-2 est requise pour qu'il y ait apoptose dans les cellules humaines d'adénocarcinome de poumon A549 et d'ostéosarcome U2OS, mais son absence n'affecte pas la mort apoptotique des cellules de cancer du sein MCF-7 [241]. De plus, les souris knock-out pour caspase-2 ne présentent pas de défauts majeurs au niveau du programme apoptotique [245, 246]. Récemment, Marsden et al. ont démontré que des lymphocytes et des fibroblastes murins déficients à la fois pour les caspase-2 et -9, dérivés à partir de souris double knock-out, demeurent sensibles à divers stimuli apoptotiques, tels que les rayons γ , le dexaméthasone et l'étoposide, et que ces cellules meurent par une voie d'apoptose caspase-dépendante accompagnée d'une perméabilisation mitochondriale et de relargage du cytochrome c [247]. Globalement, toutes ces études récentes démontrent que la caspase-2 semble effectivement posséder des fonctions pro-apoptotiques initiatrices en amont de la dysfonction mitochondriale et qu'elle peut représenter la caspase exécutrice principale dans certains types cellulaires soumis à des stimuli apoptotiques particuliers. Toutefois, certains modèles d'apoptose ne nécessitent pas l'activation de la caspase-2 et requièrent toujours la formation de l'apoptosome classique pour activer la caspase-9 initiatrice qui

active à son tour les caspases effectrices principales (caspase-3 et -7). Plusieurs questions demeurent donc en suspens en ce qui concerne le rôle de la caspase-2.

Finalement, des voies alternatives d'activation et/ou d'amplification de la cascade des caspases ont également été mises en évidence. La sérine protéase granzyme B peut activer la cascade protéolytique des caspases, entre autres lors de l'apoptose des cellules ciblées par les lymphocytes T cytotoxiques, communément appelé le « baiser de la mort » [248-252]. Une voie d'activation au niveau du RE a également été décrite. Cette voie est associée au relargage cytosolique de calcium, l'activation calcium-dépendante de la m-calpaïne (ou calpaïne 2) et l'activation subséquente de la pro-caspase-12 murine [253-255]. Dans certaines conditions, le calcium en provenance du RE est aussi impliqué dans la perméabilisation des mitochondries, le relargage du cytochrome c et l'activation ultérieure des caspases (*voir section: 1.3.3.1 - Le réticulum endoplasmique*) [256, 257]. Une voie apoptotique impliquant les lysosomes a nouvellement été mise en évidence et est abordée en de plus amples détails dans une section ultérieure (*voir section: 1.3.2 - La voie lysosomiale*). Cette voie lysosomiale est définie par la perméabilisation de la membrane lysosomiale accompagnée d'une fuite du contenu du lysosome dans le cytosol, ce qui provoque l'activation de certaines cathepsines dans le cytosol et la mise en marche de la cascade des caspases [258-260]. L'initiation et/ou l'amplification de la cascade protéolytique des caspases a également été associée aux voies signalétiques des céramides [261-266] et des sphingosines [267-274].

1.2.4.2 Les inhibiteurs des caspases

L'activation des caspases est considérée comme le pas irréversible vers la mort cellulaire apoptotique. Il existe toutefois des protéines régulatrices qui modulent l'activité des caspases, afin de permettre à la cellule d'exercer un contrôle sur ces protéases aussi dévastatrices. Les membres de la famille des IAPs constituent les plus importants régulateurs endogènes des caspases chez les mammifères [275]. Les IAPs inhibent l'activité des caspases, supprimant ainsi la cascade protéolytique et l'apoptose. La surexpression des IAPs prévient la mort cellulaire apoptotique induite par une multitude de stimuli incluant l'activation des récepteurs TNF et Fas, la staurosporine, l'étoposide et la carence en facteurs de croissance [275, 276]. Les membres de la famille des IAPs ont été identifiés originellement chez les baculovirus, des virus d'invertébrés [277], et ont la

particularité de contenir un ou plusieurs domaines BIR (*baculoviral IAP repeat*), qui semblent médier leur fonction inhibitrice [275]. Certains IAPs contiennent également un domaine « *RING finger* » qui constitue une cible pour l'ubiquitination et la dégradation protéolytique [278, 279]. Huit membres des IAPs ont été identifiés chez l'humain, dont XIAP (*X-linked IAP*) est le mieux connu. L'activité inhibitrice de XIAP est spécifique envers les caspase-3, -7 et -9, et est médiée par des domaines BIR distincts. En effet, le domaine BIR2 de XIAP inhibe les caspases effectrices 3 et 7 [280], alors que BIR3 bloque l'activité de la caspase-9 initiateur [281]. Des études ont par la suite révélé que le domaine BIR2 de XIAP jouerait un rôle mineur dans l'inhibition des caspase-3 et -7, et que ce serait plutôt une région flexible précédant le domaine BIR qui médierait l'effet inhibiteur [282-284]. Chez les mammifères, les autres membres de la famille des IAPs pour lesquels une activité inhibitrice de caspases a été reportée sont cIAP1, cIAP2 et ML-IAP. En plus des domaines BIR, cIAP1 et cIAP2 contiennent également un domaine CARD en position C-terminale, mais la délétion de CARD n'empêche pas l'inhibition de l'apoptose médiée par cIAP1 et cIAP2 [285]. cIAP1 et cIAP2 possèdent une spécificité d'inhibition similaire à XIAP, c'est-à-dire qu'ils bloquent l'activité des caspase-3, -7 et -9, mais n'antagonisent pas l'action des caspase-1, -6, -8 et -10, ni Ced-3 de *C. elegans* [285]. Les autres protéines IAPs, soit celles apparentées à Survivin et à Naip, sont apparemment dépourvues de fonctions anti-apoptotiques et seraient plutôt impliquées dans les phénomènes de ségrégation chromosomique [286] et de réponse immunitaire [287, 288], respectivement. Une région de l'IAP Bruce murin et de son homologue humain, Apollon, contient un domaine fonctionnel intact de conjugaison à l'ubiquitine, suggérant un lien entre cet IAP et le système de dégradation protéolytique ubiquitine/protéosome [289, 290]. Certaines observations soutiennent l'implication des IAPs dans la progression tumorale. Par exemple, la surexpression de certains membres des IAPs est commune dans les cancers de la prostate chez l'humain et la souris [291]. Une corrélation positive a été aussi démontrée entre l'expression des IAPs et la résistance à la chimiothérapie [292].

Chez les mammifères, il existe un second niveau de régulation des caspases via l'activité de molécules qui lient et inhibent les IAPs, favorisant ainsi l'apoptose [293]. Les deux principaux antagonistes des IAPs sont Diablo/Smac [53, 54] et Omi/HtrA2 [57, 294-297]. Ces molécules résident toutes deux dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et sont relarguées dans le cytosol en cours d'apoptose. Diablo peut alors se lier aux IAPs, entre autres à XIAP, les inhiber et rétablir ainsi l'activité des caspases [53,

54, 298-300]. Il semblerait que la liaison de Diablo aux IAPs empêchent ces derniers de se lier aux caspases, à cause de l'exclusivité mutuelle du site de liaison de Diablo et des caspases sur les IAPs [300-302]. Le mécanisme d'inhibition de HtrA2 est différent de celui de Diablo. HtrA2 possède une activité sérine protéase ainsi qu'un motif d'interaction avec les IAPs, qui sont tous deux requis pour que HtrA2 antagonise XIAP et rétablisse l'activité des caspases [295]. Toutefois, la dégradation protéolytique des IAPs par la fonction sérine protéase de HtrA2 demeure une hypothèse qui devra être confirmée par d'autres études. Les IAPs et leurs antagonistes modulent donc l'activité des caspases en aval de la mitochondrie et ces molécules constituent un système raffiné pour contrôler la cascade protéolytique menée par les caspases. Les cellules qui expriment beaucoup de IAPs et/ou de faibles quantités de Diablo et de HtrA2 démontrent un fort potentiel de survie, alors que dans les cellules qui expriment peu de IAPs et/ou beaucoup de Diablo et de HtrA2, l'activité des caspases est très élevée et ces cellules subiront plus facilement la mort apoptotique. L'abondance relative des IAPs par rapport à leurs inhibiteurs joue donc un rôle important dans la réponse apoptotique d'une cellule.

Suite à l'activation des récepteurs de mort cellulaire, il y a assemblage du DISC puis recrutement et activation de la caspase-8, aussi appelée FLICE (*FADD-like ICE*), qui enclenche la cascade protéolytique et l'apoptose. La famille des protéines FLIPs (*FLICE-inhibitory proteins*) permet d'exercer un contrôle sur la voie extrinsèque d'activation des caspases. Des protéines FLIPs ont été identifiées dans les cellules (c-FLIP) et les virus (v-FLIP) de mammifères [303-307]. Chez l'humain, il existe deux isoformes de c-FLIP, une forme longue, c-FLIP_L, et une forme courte, c-FLIP_S. c-FLIP_L contient deux domaines DED ainsi qu'une région catalytique apparentée à celle de la caspase-8 en position C-terminale, alors que c-FLIP_S est similaire à v-FLIP et contient seulement les deux domaines DED organisés en tandem. Les protéines FLIPs, grâce à leurs domaines DED, sont apparemment recrutées elles aussi au DISC et empêchent le recrutement et l'activation de la caspase-8. L'inhibition de l'apoptose par les protéines FLIPs a été observée chez plusieurs types cellulaires, dont les cellules B du centre germinale, les mastocytes et les lymphocytes T du sang périphérique [308-310]. Ce mécanisme d'inhibition permet donc de moduler la réponse apoptotique après l'activation des récepteurs de mort cellulaire.

CrmA (*Cowpox virus product cytokine response modifier A*) est une molécule d'origine virale qui possède certaines propriétés inhibitrices de caspases. Les virus utilisent CrmA pour lier et inactiver la caspase-1 et réduire ainsi la réponse inflammatoire

déclenchée par l'IL-1 β , dont le processus de maturation nécessite l'activité de la caspase-1 [311, 312]. Ce fut le premier rôle associé à CrmA. Par la suite, il a été démontré que CrmA peut empêcher directement l'apoptose de la cellule infectée, alouant aux virus plus de temps pour effectuer leur cycle de réplication [313]. Structuralement, CrmA appartient à la famille des serpinines (*serine protease inhibitor*), mais biochimiquement, CrmA inhibe des protéases à cystéine et non des protéases à sérine [311, 314]. Il agit comme un pseudosubstrat qui se lie à la forme active de la caspase et peut inhiber son activité. CrmA bloque surtout l'activité des caspase-1 et -8. Il pourrait également inhiber, mais de façon beaucoup moins efficace, les caspases effectrices 3, -6 et -7. L'effet protecteur de CrmA se limite principalement à la prévention de l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de la famille du TNF [315-318]. La protéine p35 est un autre inhibiteur viral de caspases. Cette protéine est produite par le baculovirus dans le but d'empêcher la mort apoptotique des cellules infectées par le virus [319]. La protéine p35 peut inhiber plusieurs caspases chez les insectes, ainsi que Ced-3 de *C. elegans* et certaines caspases de mammifères, dont les caspase-1, -2, -3, 4-, -6, -7, -8 et -10. p35 bloque l'apoptose induite par une variété de stimuli tels que l'activation des récepteurs TNF et Fas, les céramides, les radiations ionisantes, le dommage à l'ADN et la carence en facteurs de croissance. p35 est considéré comme un inhibiteur d'apoptose à large spectre, plus puissant que CrmA. Toutefois, aucun homologue de p35 n'a été identifié dans les cellules ou virus de mammifères [317, 318, 320-322].

Plusieurs inhibiteurs de caspases synthétiques ont également été développés en se basant sur la séquence spécifique des sites de clivage des substrats des caspases. Ce sont des peptides synthétiques qui miment le site de clivage et agissent donc comme pseudosubstrats pour les caspases actives. Ces inhibiteurs compétitifs deviennent irréversibles lorsqu'ils sont reliés à un groupement fluoro- ou chloro-méthyl kétone (-CMK ou -FMK), alors que l'inhibition est réversible si le peptide est plutôt lié à un groupement aldéhyde (-CHO). Ces inhibiteurs sont très puissants *in vitro*, alors que leur action *in vivo* est limitée par leur capacité à pénétrer la membrane plasmique. Les peptides reliés à un groupement -FMK sont les plus perméables et peuvent inhiber les caspases dans des cellules intactes. Le peptide Z-VAD-FMK est l'un des plus utilisés *in vitro* et *in vivo*, c'est un inhibiteur général qui bloque l'activité de la majorité des caspases, dont les caspase-1, -3, -5, -6, -7, -8 et -9 [317]. Certains inhibiteurs de caspases peuvent également bloquer

l'activité d'autres types de protéases (ex: cathepsines, calpaïnes) à des concentrations parfois similaires à celles utilisées pour inhiber les caspases [254, 317, 323].

1.3 Les principales voies apoptotiques

1.3.1 La voie mitochondriale

1.3.1.1 Définition et caractéristiques

De tous les organites intracellulaires impliqués dans l'apoptose, c'est la mitochondrie qui a reçu le plus d'attention au cours des dernières années. Il est intrigant de constater que la mitochondrie, qui est si essentielle à la vie en générant l'énergie nécessaire aux cellules, soit aussi impliquée activement dans le processus de mort cellulaire. Parce que la mitochondrie contient, dans son espace intermembranaire, des molécules apoptogéniques qui peuvent facilement déclencher la mort programmée de la cellule, la perméabilité de sa membrane externe doit être contrôlée de façon extrêmement précise. L'homéostasie de la mitochondrie est affectée relativement tôt dans le processus apoptotique et agit comme un centre de coordination crucial de la mort cellulaire [324]. La majorité des insultes et signaux cytotoxiques convergent vers la mitochondrie et induisent l'apoptose via la voie mitochondriale. Parmi ces stimuli on retrouve le dommage à l'ADN, les agents chimiothérapeutiques, les rayons UV, l'activation de certains gènes supresseurs de tumeurs dont p53 et d'oncogènes comme c-Myc, l'élévation des niveaux de calcium cytosolique et l'action de certains médiateurs lipidiques tels que les céramides [325]. La voie mitochondriale de l'apoptose est définie principalement par une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et le relargage subséquent des facteurs apoptogéniques dans le cytosol, qui activent les caspases et stimulent l'action d'endonucléases nucléaires. La libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux, dont le cytochrome c, est sans doute l'évènement central du processus apoptotique, commun à de nombreuses voies d'apoptose, au point où la voie mitochondriale est parfois appelée la voie médiée par le cytochrome c.

1.3.1.2 Les principaux modèles de perméabilisation des mitochondries

La membrane mitochondriale externe est donc une barrière physique dont la perméabilité influence le destin apoptotique d'une cellule. Le pore mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), aussi appelé complexe VDAC/ANT, est un méga-pore de transition de perméabilité mitochondriale localisé aux points de jonction des membranes mitochondriales externes et internes [326]. Le complexe mPTP joue un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité de la mitochondrie et dans le relargage des facteurs apoptogéniques [327-329]. Ce complexe est un assemblage des protéines suivantes: VDAC (*voltage-dependent anion channel*), enfoncé dans la membrane externe, ANT (*adenine nucleotide translocator*), localisé dans la membrane interne, le récepteur des benzodiazépines et l'enzyme hexokinase, situé du côté cytosolique, et l'enzyme cyclophiline D associée à la portion de ANT qui se retrouve du côté de la matrice [330-333]. Dans cette présente thèse l'appellation VDAC fait référence à l'isoforme la plus abondante et la mieux connue, VDAC1. Actuellement, les fonctions de la seconde isoforme, VDAC2, sont peu connues. Selon une étude de Cheng et al. VDAC2 murin serait associé à un rôle anti-apoptotique. VDAC2 serait lié à Bak et le maintiendrait inactif dans les cellules non stimulées [334]. En cours d'apoptose, l'ouverture du mPTP peut être facilitée et/ou sa conformation modifiée, entre autres par l'association des Bcl-2-like Bax et Bak au mPTP, ce qui permet alors au cytochrome c et aux autres facteurs apoptotiques de sortir dans le cytosol [335-337]. L'ouverture d'un seul complexe mPTP est apparemment suffisante pour faire sortir le cytochrome c [338]. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et, par conséquent, le relargage des facteurs apoptogéniques est un événement modulé principalement par les protéines de la famille Bcl-2. De façon générale les anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL préservent l'intégrité de la membrane mitochondriale alors que les pro-apoptotiques comme Bax et Bak agissent pour accroître la perméabilité membranaire et faciliter la sortie des facteurs apoptogéniques. La perméabilisation mitochondriale est un phénomène complexe régulé de façon très élaborée. Un grand nombre d'études ont permis de mieux comprendre les mécanismes de perméabilisation de la mitochondrie et leurs modes de régulation, mais ce phénomène est encore source de nombreuses controverses. Actuellement, au moins trois principaux modèles de perméabilisation mitochondriale sont reconnus et acceptés (*voir Fig.4 - Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale*). Le premier concerne

l'ouverture du mPTP, le second implique les protéines de la famille Bcl-2 et leur capacité inhérente à former des canaux dans la membrane mitochondriale externe, et le dernier propose que certaines altérations dynamiques de la structure de la membrane provoquent une augmentation de la perméabilité mitochondriale

L'ouverture du complexe mPTP est normalement régulée par la différence de potentiel entre la matrice mitochondriale et le cytosol, appelé potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et par le pH de la matrice [339]. La probabilité d'ouverture du pore augmente avec une diminution du $\Delta\Psi_m$ et avec l'acidification de la matrice [340]. Le mPTP peut fonctionner sous 3 états distincts. Lorsqu'il est fermé, le $\Delta\Psi_m$ est maintenu. En état de faible conductance, le mPTP est partiellement ouvert et perméable à des solutés de poids inférieur à 0.3 kDa (*kilo dalton*), et peut s'accompagner d'une diminution réversible du $\Delta\Psi_m$. Sous son état de haute conductance, le pore est perméable à des molécules d'un poids allant jusqu'à 1.5 kDa et il se produit une dissipation parfois irréversible du $\Delta\Psi_m$ [341]. Le mPTP demeure fermé lors des fonctions mitochondriales normales, afin que le $\Delta\Psi_m$, qui est essentiel pour la synthèse d'ATP et pour la phosphorylation oxydative, soit maintenu [342, 343]. L'état de haute conductance est généralement associé à l'induction de l'apoptose, bien que même dans cette condition d'ouverture, le cytochrome c, ayant un poids d'environ 15 kDa, ne peut pas sortir par le mPTP. Deux types de phénomènes peuvent alors survenir et facilitent le relargage des médiateurs apoptotiques. Le premier phénomène est appelé le modèle de gonflement de la mitochondrie (*voir Fig.4 - Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale*). Suite à l'ouverture du mPTP, probablement dans son état de haute conductance, la diffusion des divers ions et solutés provoque l'équilibrage des ions entre la matrice et l'espace intermembranaire, ce qui dissipe le gradient de protons et découple la chaîne respiratoire. De plus, la matrice devient hyper-osmolaire, ce qui entraîne la pénétration d'eau dans la matrice. Conséquemment, la matrice se gonfle et il s'ensuit une rupture de la membrane externe et le relargage non spécifique du contenu de l'espace intermembranaire dans le cytosol [332, 344, 345]. Ce phénomène de gonflement de la matrice a été observé dans certaines conditions seulement, dont lors de l'apoptose des hépatocytes induite par l'injection d'anticorps anti-Fas [345]. Toutefois, la dissipation totale du $\Delta\Psi_m$ perturbe inévitablement les fonctions mitochondriales telles que la production d'ATP, ce qui est en désaccord avec le concept que l'ATP est nécessaire tout au long du processus apoptotique. Il est donc plus probable que ce soit plutôt des ouvertures transitoires du mPTP, qui pourraient même survenir chez

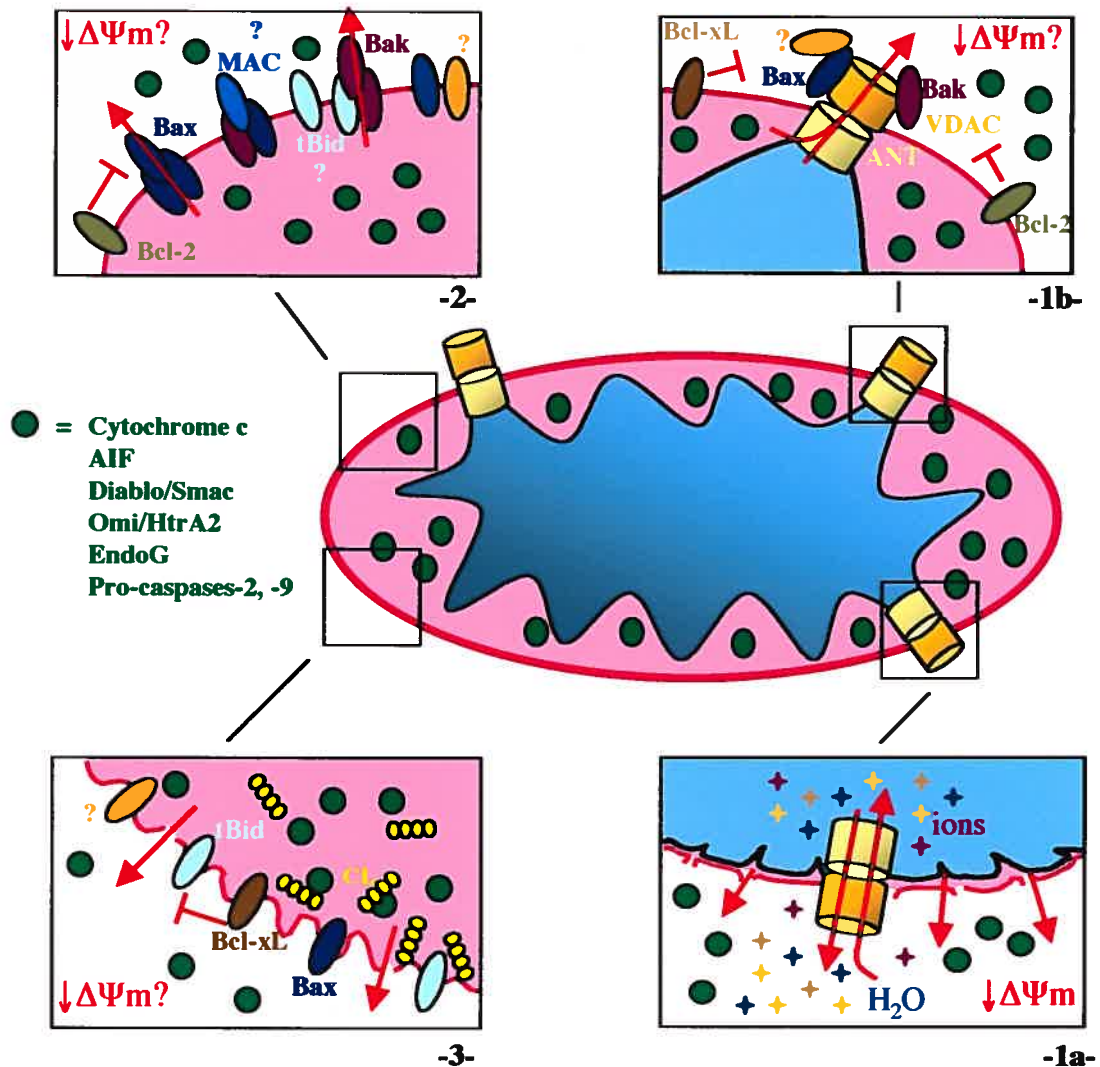


Fig.4 Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale.

Dans le premier modèle, il y a ouverture du mPTP (ou complexe VDAC/ANT) et relargage des molécules apoptogéniques. Suite à l'ouverture du mPTP, il peut y avoir gonflement de la matrice de la mitochondrie ce qui provoque la rupture de la membrane externe et cause le relargage des molécules apoptogéniques dans le cytosol et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ (-1a-). L'interaction entre certaines protéines Bcl-2-like pro-apoptotiques (ex: Bax et Bak) et le mPTP peut stimuler l'ouverture du mPTP d'une manière à permettre la sortie du cytochrome c à travers le mPTP, action antagonisée par les anti-apoptotiques (ex: Bcl-2 et Bcl-xL) (-1b-). Dans le deuxième modèle, les protéines Bcl-2-like pro-apoptotiques s'oligomérisent sous forme de canaux protéiques à travers lesquels les molécules apoptogéniques traversent dans le cytosol (-2-). Dans le troisième modèle, l'insertion de certaines protéines Bcl-2-like (ex: Bax, tBid) dans la membrane mitochondriale externe déstabilise l'organisation structurale des lipides membranaires, ce qui favorise la formation de pores et accroît la perméabilité de la membrane externe, facilitant ainsi la diffusion des molécules apoptogéniques dans le cytosol. Ce mécanisme semble impliquer la cardiolipine (CL) et est apparemment inhibé par les anti-apoptotiques, qui confèrent plutôt une certaine stabilité à la membrane mitochondriale (-3-).

une fraction seulement des mitochondries de la cellule. Ces mitochondries perméabilisées seraient responsables du relargage des molécules apoptogéniques, alors que les autres mitochondries non atteintes, ou celles dont le mPTP s'est refermé, pourraient continuer de remplir leurs fonctions normales [346, 347]. Dans ces conditions, il peut y avoir sortie du cytochrome c par le mPTP, mais sans chute du $\Delta\Psi_m$, ni gonflement et rupture de la membrane mitochondriale externe. Il semble également que ce ne soit pas toutes les protéines de l'espace intermembranaire qui se retrouvent dans le cytosol, mais seulement les molécules impliquées dans le programme apoptotique [348]. Cette observation est aussi en désaccord avec le modèle de gonflement de la matrice et de rupture de la membrane externe qui provoque plutôt le relargage non sélectif du contenu de l'espace intermembranaire. Le second phénomène d'ouverture du mPTP implique la participation des protéines de la famille Bcl-2 (voir Fig.4 - *Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale*). Certains Bcl-2-like, une fois qu'ils sont relocalisés à la mitochondrie, peuvent interagir avec des composantes du mPTP et moduler son ouverture. La molécule Bax pourrait se lier à ANT et favoriser l'ouverture du mPTP, une action antagonisée par la présence de Bcl-2 [349]. Les multi-domaines Bax et Bak peuvent interagir avec VDAC et semblent coopérer avec ce dernier, d'une façon encore incertaine, pour accroître la fonction de canal de VDAC et permettre au cytochrome c de passer à travers le mPTP pour aller dans le cytosol. Les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, apparemment via leur domaine BH4, stimulent plutôt la fermeture de VDAC [350-352] et/ou empêchent l'association de Bax et Bak avec le mPTP, bloquant ainsi le relargage de cytochrome c [8, 9, 353]. Une interaction entre le BH3-unique Bim et VDAC a également été démontrée, favorisant l'ouverture de VDAC et la sortie du cytochrome c [354]. Récemment, Rostovtseva et al. ont proposé que ce soit plutôt le BH3-unique Bid qui module l'activité de VDAC [355]. Par la reconstruction de canaux VDAC dans des membranes phospholipidiques planes, ils ont démontré, contrairement à d'autres études [350, 351, 356], que les propriétés électrophysiologiques de VDAC ne sont pas affectées par l'addition de protéine Bax recombinante dans une variété de conditions, et n'ont trouvé aucune interaction entre VDAC et Bax, que ce soit sous sa forme monomérique ou oligomérique [355]. Par contre, ils ont découvert que tBid affecte les propriétés de canaux de VDAC, stimulant sa fermeture. Rostovtseva et al. suggèrent que la fermeture de VDAC diminue la probabilité d'ouverture du mPTP et perturbe ainsi les échanges métaboliques (ex: ATP et ADP) entre la mitochondrie et le cytosol, ce qui augmente la perméabilité de la membrane

mitochondriale externe et mène à l'apoptose [355]. Malgré l'existence de quelques données contradictoires, il apparaît donc que les protéines de la famille Bcl-2 soient capables de moduler directement l'ouverture du mPTP, afin de permettre le passage des facteurs apoptogéniques dans le cytosol.

Le second modèle de perméabilisation mitochondriale implique encore une fois les protéines de la famille Bcl-2, mais concerne plutôt leur capacité intrinsèque à former des canaux ioniques dans les membranes (voir Fig.4 - *Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale*). Cette surprenante propriété fut mise de l'avant suite à la résolution de la structure tri-dimensionnelle de Bcl-xL [136]. En effet, des similarités structurelles entre la molécule Bcl-xL, particulièrement ses hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$, et certains domaines de toxines bactériennes qui sont responsables de la formation de canaux ioniques ou protéiques, ont suggéré que Bcl-xL et ses homologues pourrait aussi former des pores dans les membranes des organites intracellulaires [136, 138]. Puis, il fut démontré que Bcl-xL, Bcl-2, Bax et tBid, sous forme de protéines recombinantes ou de protéines purifiées, pouvaient effectivement créer des canaux ioniques dans des liposomes artificiels. Ces canaux présentent des propriétés de conductance particulières, sont dépendants du voltage et du pH, et de façon générale, les protéines anti-apoptotiques ont tendance à former des canaux cation-sélectifs, alors que ceux formés par les pro-apoptotiques sont plutôt perméables aux anions [130, 357-361]. Lorsque des mitochondries sont mises en présence de protéines recombinantes Bax, Bak ou tBid, la membrane mitochondriale externe devient perméable aux facteurs apoptogéniques, phénomène inhibé par Bcl-2 ou Bcl-xL [8, 9, 362]. Il est toutefois difficile de concevoir qu'une seule molécule de Bax, d'un poids moléculaire d'environ 21 kDa, puisse former un canal suffisamment large pour laisser passer, par exemple, la molécule AIF de 57 kDa. Il semble donc que les protéines Bcl-2-like, grâce à leur capacité d'oligomérisation, peuvent s'assembler pour former des pores suffisamment grands par lesquels les médiateurs apoptotiques peuvent sortir. En effet, des études ont démontré que seuls les oligomères de Bax possèdent une activité pro-apoptotique [152, 363] et qu'un tétramère de molécules Bax peut former, dans des liposomes artificiels, un canal capable de laisser passer le cytochrome c [364]. L'existence d'un tel pore *in vivo* pourrait correspondre au canal appelé MAC (*mitochondrial apoptosis-induced channel*), mis en évidence par Pavlov et al. en utilisant des techniques de « *patch clamp* » [365]. Ce canal se formerait dans la membrane mitochondriale externe, peu de temps après l'induction de l'apoptose. La taille du canal MAC serait apparemment

suffisante pour laisser passer le cytochrome c en cours d'apoptose [365, 366]. Récemment, Guihard et al. ont démontré *in vivo* la formation du canal MAC dans des mitochondries d'hépatocytes apoptotiques de rat et que MAC interagit avec le cytochrome c. Toutefois, leur étude démontre que l'activité de MAC serait plutôt associée à un événement apoptotique tardif et que le canal MAC ne semble pas être impliqué dans la perméabilisation mitochondriale initiale [367]. La possibilité que le canal MAC soit formé par Bax ou ses homologues, seul ou en association avec d'autres protéines, reste également à déterminer. Il n'est pas clair non plus si la formation de tels canaux par les Bcl-2-like s'accompagne d'une chute du $\Delta\Psi_m$, mais de nombreuses évidences tendent à suggérer que les protéines de la famille Bcl-2 induisent la transition de perméabilité mitochondriale sans altérer le $\Delta\Psi_m$ et les fonctions physiologiques de la mitochondrie [140, 352, 368].

Dans le même ordre d'idées, de nombreuses données contradictoires existent à propos de la nécessité d'une perte de $\Delta\Psi_m$ pour qu'il y ait relargage de molécules apoptogéniques et mort par apoptose. Dans certains systèmes, la chute du $\Delta\Psi_m$ est requise avant la sortie du cytochrome c [369-371] et semble même être nécessaire pour que Bax transloque à la mitochondrie [372]. Dans certaines conditions où des modifications du $\Delta\Psi_m$ sont observées, l'inhibiteur général des caspases, le Z-VAD-FMK bloque effectivement l'activité des caspases, mais n'empêche pas la dissipation du $\Delta\Psi_m$, suggérant que le $\Delta\Psi_m$ peut chuter indépendamment des caspases [373]. Il a donc été suggéré que la perte de $\Delta\Psi_m$ pourrait survenir en deux étapes. La diminution initiale du $\Delta\Psi_m$, généralement de faible intensité, serait suffisante pour faire sortir le cytochrome c et engager les cellules dans la voie apoptotique. Le relargage du cytochrome c permet l'activation de la caspase-9 initiateur qui active les autres caspases et enclenche la cascade. L'action des caspases augmenterait à son tour la dissipation du $\Delta\Psi_m$, agissant comme un système d'amplification des dommages mitochondriaux [373]. Toutefois, dans certains modèles d'apoptose induits par la doxorubicine ou les rayons UV, l'incubation des cellules avec le Z-VAD-FMK bloque totalement la chute du $\Delta\Psi_m$ [368, 374, 375]. Dans d'autres modèles d'apoptose, le $\Delta\Psi_m$ peut être maintenu [376] ou encore survenir tardivement, plutôt en tant que conséquence du processus apoptotique [377-381]. De plus, les agents qui dissipent directement le $\Delta\Psi_m$, comme le CCCP (cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), n'induisent pas la transition de perméabilité mitochondriale ni l'apoptose [381-383]. Le CCCP peut également augmenter la perméabilité dans certaines conditions, mais n'induit

pas le relargage de cytochrome c ni la mort cellulaire [384]. Pour toutes ces raisons, la perte de $\Delta\Psi_m$ est donc plus souvent utilisée comme marqueur d'apoptose et non considérée comme élément inducteur.

Dans le troisième modèle, la perméabilisation mitochondriale est médiée par des altérations de la structure en forme de bicouche lipidique de la membrane (*voir Fig.4 - Les principaux modèles de perméabilisation mitochondriale*). Des études ont suggéré que l'insertion des molécules Bax ou tBid provoque une déstabilisation de l'organisation structurale des lipides membranaires, facilitant la formation de pores et augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, ce qui favorise la diffusion des molécules apoptogéniques dans le cytosol [385-390]. La molécule tBid serait capable de produire une courbature négative de la membrane de liposomes artificiels, ce qui induirait le mélange des lipides et une fuite de la membrane, phénomène qui semble nécessiter la présence de lipides particuliers dans les liposomes, telles que la cardiolipine et la phosphatidylcholine. Ce mélange lipidique induit par tBid est inhibé par la présence de Bcl-xL [387]. Bax produit apparemment une altération lipidique similaire au phénomène causé par tBid, mais sous sa forme oligomérique seulement [388]. Bax pourrait également accroître le phénomène de diffusion des lipides à travers la membrane, facilitant ainsi le déplacement de la cardiolipine, localisée dans la membrane mitochondriale interne, vers la membrane externe en cours d'apoptose [389]. La cardiolipine semble jouer un rôle important dans la perméabilisation mitochondriale et le relargage de cytochrome c. La formation de canaux par Bax semble nécessiter la présence de cardiolipine [390] qui serait aussi essentielle pour que Bax et Bid transloquent à la mitochondrie [391]. Dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c serait fortement lié à la cardiolipine et il doit s'en détacher pour sortir de la mitochondrie [392]. Une diminution des niveaux de cardiolipine mitochondriale corrèle effectivement avec une augmentation du relargage de cytochrome c pendant l'apoptose [393, 394]. Il semble donc que la cardiolipine soit nécessaire pour le recrutement de certaines protéines Bcl-2-like à la mitochondrie, ainsi que pour permettre à ces protéines de perméabiliser la membrane externe. Il a été suggéré qu'une fois à la mitochondrie, Bax et Bid pourraient compétitionner avec le cytochrome c pour la liaison avec la cardiolipine, favorisant ainsi la libération du cytochrome c [395]. Une autre étude a toutefois démontré que le contenu en cardiolipine dans des mitochondries de levure n'affecte en rien la capacité de Bax à induire le relargage de cytochrome c, bien que chez

la levure, le cytochrome c semble aussi être retenu à la membrane mitochondriale interne via son association avec la cardiolipine [396].

Il est intéressant de constater que les protéines de la famille Bcl-2 participent aux trois principaux modèles de perméabilisation mitochondriale. En effet, ces protéines interagissent avec le mPTP et en facilitent l'ouverture, elles s'assemblent pour former, *de novo*, des canaux protéiques dans la membrane et elles altèrent l'organisation lipidique de la membrane, favorisant ainsi la formation de pores et le relargage du cytochrome c. Les protéines Bcl-2-like sont donc des régulateurs cruciaux de la perméabilisation mitochondriale.

1.3.1.3 La translocation mitochondriale et l'action des protéines de la famille Bcl-2

Afin de produire leurs diverses actions pro-apoptotiques au niveau de la membrane mitochondriale, les protéines de la famille Bcl-2 doivent tout d'abord être relocalisées à la mitochondrie. La translocation mitochondriale la mieux caractérisée est celle de la protéine Bax [64]. Dans des cellules saines, Bax existe principalement sous une forme monomérique dans le cytosol et une portion de Bax peut aussi être associée faiblement à la membrane mitochondriale externe. Suite à l'induction de l'apoptose, la protéine Bax cytosolique transloque à la mitochondrie [150-152] et s'insère profondément dans la membrane externe [397]. L'oligomérisation de Bax en complexes de haut poids moléculaire a été observée presque simultanément avec sa translocation mitochondriale et est essentielle pour que Bax puisse perméabiliser la membrane mitochondriale [363, 398, 399]. Bax est alors sous sa forme active. L'oligomérisation des protéines Bax semble s'effectuer selon le modèle de création d'une pochette hydrophobe par une première molécule Bax, dans laquelle se niche le domaine BH3 d'une seconde protéine, tel que décrit dans une section précédente (*voir section: 1.2.3.2 - Oligomérisation*). Des réarrangements conformationnels de Bax sont nécessaires pour exposer la pochette et le domaine BH3. L'extrémité hydrophobe C-terminale est normalement repliée dans la pochette et doit s'en écarter afin de rendre celle-ci accessible au domaine BH3 de la seconde molécule. Un changement conformationnel à l'extrémité N-terminale doit également avoir lieu, pour exposer un épitope de 13 à 19 acides aminés, qui modulerait le déplacement vers la mitochondrie [189, 190, 400, 401]. Le processus d'activation de Bax

semble comprendre 4 évènements qui surviennent en succession rapide: 1) l'exposition de l'épitope en N-terminale, 2) la translocation vers la mitochondrie, 3) l'oligomérisation et 4) l'insertion dans la membrane et/ou l'assemblage en de gros complexes protéiques appelés amas ou « *clusters* » sur ou à proximité de la membrane mitochondriale [402]. Les protéines multi-domaines Bax et Bak semblent agir de manière similaire et redondante, et peuvent se compléter mutuellement [142, 157, 158]. Mais contrairement à Bax, Bak semble résider de façon constitutive dans la membrane mitochondriale externe [156]. Toutefois, la forme mitochondriale de Bak dans des cellules saines est inactive. Bak s'oligomérisé lui aussi en cours d'apoptose et peut s'assembler sous forme de complexes qui co-localisent avec les complexes formés par Bax [141, 402, 403]. L'épitope en N-terminale de Bak devient aussi exposé [156]. La liaison avec le BH3-unique Bid faciliterait l'exposition de l'épitope en N-terminale et l'oligomérisation de Bak. Il semble que Bcl-2, lorsqu'il est en excès, serait capable de lier l'extrémité N-terminale de Bak, empêchant ainsi son oligomérisation et son activation [404].

De nombreuses études récentes ont démontré que Bid joue un rôle important dans l'activation de Bax et Bak au niveau mitochondrial, d'où sa fonction de BH3-unique de type activateur. Dans les cellules saines, Bid est cytosolique. Suite à certains stimuli apoptotiques, Bid subit un clivage dans sa portion N-terminale pour générer la protéine tronquée tBid. Ce clivage est principalement effectué par la caspase-8, recrutée et activée dans la voie signalétique des récepteurs de mort cellulaire [182-184]. Bid peut également être clivé par les calpaïnes, des protéases dépendantes du calcium activées dans certaines voies d'apoptose, pour produire un fragment tBid similaire à celui généré par l'activité de la caspase-8 [255, 405, 406]. Bid semble aussi pouvoir être clivé par certaines cathepsines lysosomiales [407]. La protéine tBid transloque ensuite à la mitochondrie. L'ajout post-traductionnel d'une chaîne d'hydrocarbure myristyl semble promouvoir l'activation de tBid afin qu'il puisse interagir avec Bax et Bak [162]. L'homo-oligomérisation de tBid dans la membrane mitochondriale a aussi été observée en cours d'apoptose [408]. Bien que Bax seul est capable d'induire le relargage de cytochrome c de mitochondries isolées, dans des conditions *in vitro* [409, 410], l'ajout de tBid synergise avec Bax pour accroître la perméabilisation mitochondriale [390]. Il a été reporté que tBid seul pouvait faire libérer le cytochrome c de mitochondries isolées provenant de souris déficientes pour Bax [411]. Toutefois, la présence de la protéine Bak pourrait médier l'effet du cytochrome c lorsque Bax est absent [141]. Dans un contexte *in vivo*, Bid stimule les changements

conformationnels de Bax [190] et induit l'apoptose d'une manière dépendante de Bax et Bak [158, 412]. Cependant, il est difficile, *in vivo*, de discriminer entre les différents modes d'action de ces protéines. Par exemple, le modèle dans lequel Bid se lie à Bax pour l'activer est mis en doute par la difficulté à démontrer expérimentalement une interaction entre Bid et Bax [408]. Cette lacune a conduit à l'hypothèse du « *kiss and run* ». Selon ce modèle, Bid se lie à Bax, mais de façon très transitoire, pour ensuite s'en détacher et recommencer son cycle, d'où la difficulté à saisir l'interaction physique entre les deux protéines [144, 145]. Toutefois, les souris déficientes pour Bid présentent seulement des anomalies mineures au niveau du développement, suggérant que d'autres BH3-unique peuvent compenser pour la perte de Bid dans l'activation des voies apoptotiques médiées par Bax et Bak [412]. En plus de son rôle d'activateur de Bax et Bak, tBid peut également stimuler la redistribution des lipides de la membrane mitochondriale, tel que décrit dans une section précédente (*voir section: 1.3.1.2 - Les principaux modèles de perméabilisation des mitochondries*). Ce mélange des lipides de la membrane externe pourrait modifier la courbure de la bicouche et en modifier la composition lipidique, préparant ainsi le terrain pour l'oligomérisation de Bax et Bak et facilitant la création de pores transmembranaires [413, 414]. De plus, tBid serait aussi capable d'induire un remodelage important des cristae de mitochondries isolées, au cours duquel les cristae fusionnent et les jonctions entre les cristae et l'espace intermembranaire s'ouvrent. Ce phénomène a pour effet de mobiliser les réserves de cytochrome c dans les cristae et serait médié par tBid d'une manière qui ne requière pas son domaine BH3 [415]. Des agents exogènes, tels que thapsigargin, brefeldin A et un choc de chaleur, peuvent également provoquer une réorganisation des cristae mitochondriaux, sans nécessiter Bax et Bak. Bien que ce phénomène soit encore mal compris, il semble préparer ou stimuler la mitochondrie à relarguer des protéines [338].

Les isoformes de Bim, Bim-EL et Bim-L, sont séquestrées au niveau du cytosquelette dans des cellules saines, mais transloquent aussi à la mitochondrie et/ou interagissent avec et antagonisent les anti-apoptotiques après différents stimuli apoptotiques [160]. Bim-EL, l'isoforme la plus abondante, semble aussi se lier à Bax et stimuler son insertion et activation dans la membrane mitochondriale, d'une façon similaire à tBid [416]. Bim-EL pourrait donc agir comme un BH3-unique de type activateur, mais cette hypothèse demeure incertaine. Il a également été démontré que Bim-EL pouvait directement interagir avec VDAC et stimuler son activité de canal [354]. L'isoforme Bim-L, la seconde en abondance, serait incapable d'activer directement Bax,

mais favoriserait plutôt l'apoptose en liant et inhibant les Bcl-2-like anti-apoptotiques, ce qui libère Bax et Bak et leur permet de s'activer au niveau mitochondrial [417]. Bim est donc un BH3-unique qui module lui aussi la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose. Le mode d'action du BH3-unique Bik est encore peu connu. Une des fonctions de Bik serait de lier et d'antagoniser les anti-apoptotiques, mais il semble que Bik pourrait également promouvoir l'apoptose indépendamment de ces interactions [418, 419]. Par contre, Bik ne s'associerait pas avec VDAC [352], et aucune activité intrinsèque de formation de canaux membranaires n'a été reportée pour Bim et Bik. Les BH3-unique Puma et Noxa, reportés originellement comme étant induits par le facteur p53, transloquent aussi à la mitochondrie en cours d'apoptose où ils participent à l'induction de la dysfonction mitochondriale, en agissant comme BH3-unique de type sensibilisateur, c'est-à-dire qu'ils lient et antagonisent les activités pro-survie des anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL [119, 121].

Pour ce qui est des Bcl-2-like anti-apoptotiques, il semblerait que leur fonction principale soit de lier et séquestrer les pro-apoptotiques Bax et Bak, ce qui empêche leur activation et préserve l'intégrité mitochondriale. Les anti-apoptotiques séquestrent aussi les BH3-unique, les empêchant d'effectuer leur rôle d'activateur. Évidemment, si les anti-apoptotiques sont présents en grande quantité, ils antagoniseront suffisamment de molécules pro-apoptotiques pour empêcher l'apoptose. Tout semble donc dépendre de l'abondance relative de chacune des factions. De plus, Bcl-2 et Bcl-xL semblent aussi moduler divers événements mitochondriaux, indépendamment de la liaison aux pro-apoptotiques, dans le but de protéger la mitochondrie et d'empêcher l'apoptose. Par exemple, Bcl-2 et Bcl-xL suppriment le relargage de calcium en provenance de la matrice mitochondriale [420] et peuvent augmenter l'extrusion de protons de la mitochondrie et augmenter sa capacité de tamponnage du calcium [421, 422]. La capacité de Bcl-2 et Bcl-xL à former eux aussi des canaux ioniques dans la membrane mitochondriale, ou à interagir avec des canaux pré-existants, pourrait leur permettre de moduler cet efflux de protons en provenance de la mitochondrie et de contrôler ainsi le pH mitochondrial [422]. En formant lui même un canal, ou en interagissant avec le mPTP, Bcl-xL semble aider à maintenir les niveaux d'ADP et assurer ainsi une activité normale de la pompe F_0F_1 -ATP synthase, ce qui permet de maintenir le $\Delta\Psi_m$. Shimizu et al. suggèrent que Bcl-2 maintient le $\Delta\Psi_m$ suite à un signal apoptotique en stimulant l'efflux de protons de la mitochondrie [422]. Bcl-2 et Bcl-xL peuvent également s'associer à VDAC et en stimuler la fermeture,

ce qui empêche la sortie des molécules apoptogéniques et préserve le $\Delta\Psi_m$ [350-352]. Les anti-apoptotiques peuvent aussi protéger les cellules de la mort en diminuant la production de RLO [423, 424], en prévenant l'acidification intracellulaire [425] et en conférant une certaine stabilisation aux membranes dans lesquelles ils sont insérés [362, 426].

1.3.1.4 Les évènements en aval de la perméabilisation mitochondriale

Le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose est donc de relarguer les facteurs apoptogéniques dans le cytosol. Les principales molécules pro-apoptotiques libérées de la mitochondrie sont le cytochrome c, AIF, Diablo/Smac, Omi/HtrA2, Endo G et certaines pro-caspases, dont la -2 [61], la -8 [60] et la -9 [58, 61]. La pro-caspase-3 pourrait aussi avoir une redistribution à la fois cytosolique et mitochondriale [59]. Toutes ces protéines vont soit agir pour activer les caspases, soit pour initier le processus de fragmentation de l'ADN. Dans un contexte *in vitro*, en présence de dATP, le cytochrome c s'associe à Apaf-1 et à la pro-caspase-9, pour former un complexe tri-moléculaire, l'apoptosome classique, qui stimule l'activation de la caspase-9. La liaison du cytochrome c à la molécule adaptatrice Apaf-1 permet l'oligomérisation et l'activation d'Apaf-1 qui recrute à son tour des molécules de pro-caspase-9, via les interactions entre les domaines CARD des deux protéines. La proximité des zymogènes de pro-caspase-9 leur permet alors de s'auto-activer [7, 42, 229, 427-430]. La caspase-9 initie la cascade en activant les caspases effectrices 3 et 7, qui activent à leur tour d'autres caspases, possiblement dans l'ordre suivant: les caspase-2 et -6, suivis des caspase-8 et -10. Les caspases effectrices activent aussi la caspase-9 initiateur, générant une boucle d'amplification du signal apoptotique [223, 427, 431]. Tel que mentionné précédemment, certains systèmes d'apoptose ne requièrent pas la formation de l'apoptosome classique, mais impliquent d'autres types de complexes activateur de caspases (*voir section: 1.2.4.1 - Les voies d'activation des caspases*). Quelque soit le complexe d'activation de caspases formé, l'objectif demeure toujours le même: l'activation de la cascade protéolytique. L'activité protéolytique des caspases envers des centaines de substrats cellulaires est essentielle pour induire et moduler plusieurs phénomènes ultérieurs dont la fragmentation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques [209, 223, 224]. Par exemple, CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*)/DFF40 (*DNA fragmentation factor 40*) est l'une des nucléases responsables de la fragmentation de l'ADN en cours d'apoptose. Dans les cellules saines,

CAD/DFF40 est sous forme inactive parce que séquestrée par I^{CAD} (*inhibitor of CAD*)/DFF45. Les caspases clivent I^{CAD}/DFF45, ce qui libère CAD/DFF40 et lui permet d'exercer sa fonction de nucléase [432, 433]. Les caspases clivent et inactivent également des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité génomique, telles que PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) et DNA-PK (*DNA-dependent proteine kinase*) [434].

Les caspases sont aussi impliquées dans la dysfonction mitochondriale via le clivage de la protéine mitochondriale NDUFS1, une sous-unité de 75 kDa du complexe I de la chaîne respiratoire [720]. Le clivage de NDUFS1 perturbe le transport des électrons, provoque la dissipation du $\Delta\Psi_m$, une chute des niveaux d'ATP et une augmentation de la production de RLO, ce qui endommage la fonction mitochondriale [720]. Les caspases sont aussi impliquées dans le processus de *blebbing* des cellules apoptotiques. Dans un contexte de cellules saines, la sérine/thréonine kinase ROCK 1 est un effecteur de la voie signalétique des Rho GTPases et est impliquée dans les modifications du cytosquelette d'actine et dans la génération de la force contractile. En cours d'apoptose, ROCK 1 est clivé par les caspases dans son domaine d'auto-régulation, produisant une forme de ROCK 1 tronquée constitutivement active, indépendante de Rho, qui promouvoit la contractilité cellulaire nécessaire au *blebbing* de la membrane et à la formation des corps apoptotiques [435]. Tel que discuté précédemment, la libération de Diablo/Smac et d'Omi/HtrA2 permet d'antagoniser l'action des IAPs et de promouvoir l'activité protéolytique des caspases (*voir section: 1.2.4.1 - Les inhibiteurs des caspases*).

La flavoprotéine AIF est surtout impliquée dans les changements apoptotiques qui surviennent dans le noyau, d'une façon indépendante des caspases. Une fois libéré, AIF transloque au noyau et induit la condensation de la chromatine. AIF active aussi des endonucléases qui coupent l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires [52, 436]. AIF serait aussi impliqué dans un mode d'apoptose indépendant des Bcl-2-like et des caspases, mais dépendant de PARP. Par exemple, la mort cellulaire déclenchée par un influx excessif de calcium résulte en une suractivation de PARP1 qui médierait le relargage de AIF, possiblement en agissant directement sur la mitochondrie [437-440]. L'endonucléase G, ou EndoG, transloque elle aussi de la mitochondrie au noyau en cours d'apoptose et induit la fragmentation de l'ADN, un processus qui ne requière pas non plus l'activation des caspases, à l'inverse du système CAD/DFF40-I^{CAD}/DFF45 [55]. Une fois que la mitochondrie est perméabilisée et qu'elle a relargué ses molécules apoptogéniques dans le cytosol, la cellule est engagée de façon pratiquement irréversible vers la mort apoptotique. Les fonctions principales des facteurs apoptogéniques sont donc d'activer les caspases et d'induire la fragmentation de l'ADN.

L'étape finale du processus de mort cellulaire programmée est la phagocytose des corps apoptotiques [441]. Ce phénomène survient en deux étapes: la reconnaissance de la cellule apoptotique et sa phagocytose. La cellule apoptotique expose divers signaux à sa

surface qui médient sa reconnaissance par la cellule phagocyte. Le mieux connu est l'externalisation des PS (*phosphatidylserine*) qui sont reconnus par des récepteurs à PS sur les cellules phagocytes [442, 443]. Ce phénomène constitue un signal de type « *eat-me* ». Contrairement à *C. elegans*, où les cellules apoptotiques sont phagocytées par les cellules avoisinantes, la cellule mourante et le phagocyte ne sont pas toujours à proximité chez les organismes plus complexes. D'autres types de signaux, de type « *find-me* » doivent donc exister, qui permettent au phagocyte de trouver et de se rapprocher de la cellule apoptotique. Un candidat plausible est le phospholipide LPC (*lysophosphatidylcholine*), un chimio-attractant qui serait sécrété par la cellule en apoptose et qui attirerait les cellules monocytiques [444, 445]. Toutefois, les signaux qui permettent de trouver et de phagocyter les cellules apoptotiques sont encore peu connus et seront probablement mieux caractérisés dans l'avenir. Une fois que le phagocyte et la cellule apoptotique sont entrés en contact, il semble se produire un réarrangement du cytosquelette du phagocyte qui lui permet d'engouffrer la cellule apoptotique. Chez les mammifères, ce phénomène est lui aussi peu caractérisé et plusieurs mécanismes restent à définir. Des déficiences dans les diverses étapes du processus d'élimination des cellules apoptotiques peuvent générer plusieurs conditions pathologiques, dont des désordres auto-immuns [441].

1.3.2 La voie lysosomiale

1.3.2.1 Définition et caractéristiques

La voie mitochondriale de l'apoptose a été étudiée de manière extensive au cours de la dernière décennie. Actuellement, il ne persiste plus aucun doute sur le rôle central que joue la mitochondrie dans de nombreuses voies apoptotiques. Récemment, une nouvelle voie apoptotique impliquant les lysosomes a été mise en évidence. Pendant longtemps, les lysosomes et leurs enzymes hydrolytiques furent associés presque exclusivement avec les phénomènes de mort cellulaire nécrotique et d'autophagie [446, 447]. Mais aujourd'hui, le lysosome n'est plus seulement considéré comme un « sac à ordures », mais aussi comme un joueur actif dans l'apoptose [258, 260, 447-449]. La voie apoptotique lysosomiale est caractérisée principalement par une perméabilisation partielle du lysosome, possiblement due à une rupture incomplète ou à une déstabilisation de la membrane lysosomiale, ce qui cause une fuite du contenu du lysosome dans le cytosol. Ce

phénomène de perméabilisation lysosomiale est aussi appelé « *small scale lysosomal leakage* » ou ss Δ LL, et provoque le relargage de protéases lysosomiales dans le cytosol (voir Fig.5 - *La voie apoptotique lysosomiale*) [258-260]. Les enzymes lysosomiales les plus abondantes sont les cathepsines, des protéases à cystéine. Chez les humains, la famille des cathepsines regroupe principalement 12 membres (cathepsine-B, -H, -L, -S, -F, -K, -E, -C, -W, -X, -V et -O). Les cathepsine-B et -L sont exprimées ubiquitairement et sont les plus abondantes dans les lysosomes, avec la cathepsine-D, un membre à part en tant que seule protéase lysosomiale à aspartate. Ces enzymes fonctionnent de façon optimale dans l'environnement acide du lysosome, c'est-à-dire à un pH d'environ 3,8. Toutefois, certaines cathepsines, dont la -D et la -S, pourraient être stables et actives au pH neutre du cytosol [259, 448]. Les cathepsine-B et -L ont aussi été identifiées dans le noyau et une localisation cytosolique a été reportée pour les cathepsine-B et -E [450]. Certaines cathepsines dont les cathepsine-B, -D, -L et -K ont été identifiées aussi sous forme de zymogènes, et ces pro-formes nécessitent un clivage protéolytique pour être activées [446, 451]. De façon générale, à l'inverse des caspases, les cathepsines ne sont pas reconnues pour s'activer entre elles et générer une cascade d'auto-protéolyse. Ce serait plutôt une chute du pH qui stimulerait leur activation, bien que d'autres protéases comme la cathepsine-C semblent être capable d'activer protéolytiquement certaines cathepsines et que l'auto-activation des cathepsine-B et -L ait été reportée [448]. Une fois activées, les cathepsines sont contrôlées par la présence d'inhibiteurs endogènes. Un des rôles de ces molécules inhibitrices est de capturer les protéases qui se sont échappées accidentellement des lysosomes. La majorité des inhibiteurs appartiennent à la super-famille des cystatines, divisée en trois sous-groupes: les stefines, les cystatines et les kininogènes [452-454]. Les stefines sont des inhibiteurs intracellulaires, alors que les cystatines et les kininogènes sont plutôt des molécules extracellulaires [455]. Les inhibiteurs de la super-famille des cystatines sont exprimés abondamment et ils inhibent principalement, de façon réversible, les cathepsine-B, -H, -L, -S, -K et -C [454]. Spi2A (*serine protease inhibitor 2A*), une serpine de type anti-chymotrypsin-like, est normalement produit pendant le processus inflammatoire et capable d'inhiber des protéases à sérine et à cystéine [456]. Spi2A s'est révélé comme un inhibiteur endogène efficace de la cathepsine-B, sans effet sur l'activité des caspase-3, -8 et -9, et semble avoir un effet protecteur sur la membrane lysosomiale [457]. Les cathepsine-B, -D et -L sont celles qui ont été le plus fréquemment impliquées dans l'apoptose induite par une variété de stimuli de mort cellulaire. Toutefois, les

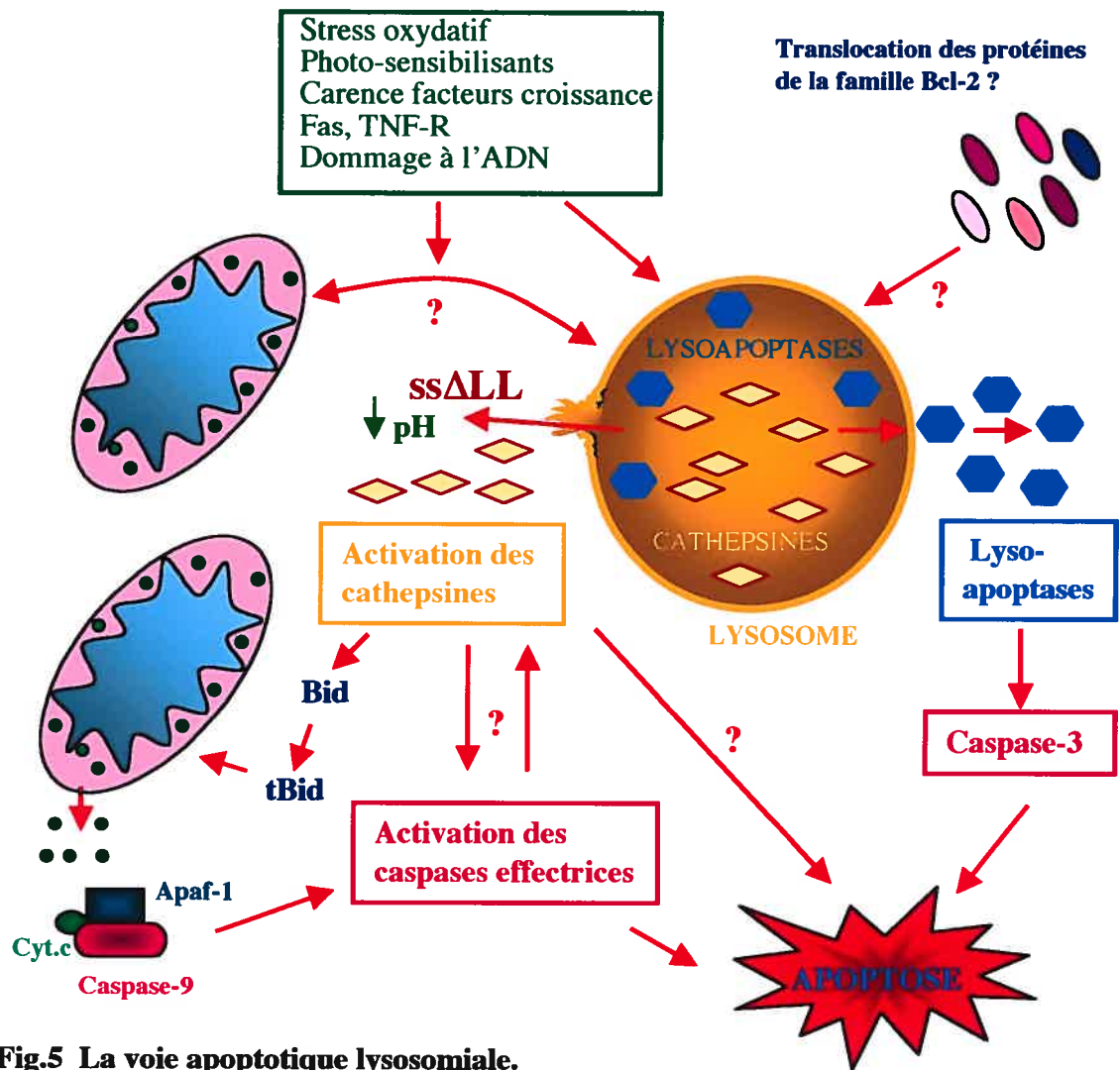


Fig.5 La voie apoptotique lysosomiale.

Diverses insultes cytotoxiques (ex: stress oxydatif, agents lysosomotropiques photo-sensibilisants, carence en facteurs de croissance, activation des récepteurs Fas et TNF et dommage à l'ADN) mènent à l'activation d'une voie apoptotique impliquant les lysosomes. La voie apoptotique lysosomiale est caractérisée principalement par une perméabilisation ou une rupture partielle de la membrane du lysosome causant une fuite du contenu lysosomal dans le cytosol, phénomène appelé « *small scale lysosomal leakage* » (ssALL). Les cathepsines, des protéases lysosomiales, sont ainsi relarguées dans le cytosol où elles seront activées soit par l'acidification du cytosol causée par la fuite lysosomiale, soit par l'activité protéolytique d'autres protéases. Dans certains modèles, la perméabilisation lysosomiale et l'activation des cathepsines mènent directement à l'apoptose de la cellule, indépendamment des caspases, alors que d'autres modèles nécessitent l'activité des deux types de protéases. Dans la majorité des voies apoptotiques impliquant les lysosomes, la perméabilisation mitochondriale survient après le ssALL et l'activation des cathepsines. L'activation de la caspase-3 par les lysoapoptases, elles mêmes activées par les cathepsines dans le lysosome, ainsi que le clivage de Bid par les cathepsines ont été proposés en tant que connexions moléculaires entre la voie lysosomiale, la voie mitochondriale et la cascade protéolytique des caspases.

mécanismes précis du ss Δ LL et de translocation cytosolique des cathepsines sont encore peu connus.

1.3.2.2 La rupture lysosomiale et les cathepsines dans l'apoptose

Actuellement, la rupture lysosomiale et/ou l'activation des cathepsines ont été associées à l'apoptose après diverses insultes cellulaires incluant le stress oxydatif [458-462], les agents lysosomotropiques photo-sensibilisants tels que les fluoroquinolones [463-465], la carence en facteurs de croissance [461], l'activation des récepteurs de mort cellulaire Fas et TNF [461, 466], l'augmentation des quantités de céramide endogène [467] et des niveaux de sphingosine [272], le dommage à l'ADN [376, 468] et l'action de certains agents stabilisateurs des microtubules [469]. Certains modèles d'apoptose sont même exclusivement dépendants des cathepsines et ne nécessitent aucune activité de caspases [449, 465, 470], alors que d'autres requièrent à la fois l'activation des caspases et des cathepsines [376, 462, 466, 471, 472]. Dans ces conditions, l'activation directe des caspases par les cathepsines est plutôt improbable, car les caspases apoptotiques se sont avérées être de pauvres substrats pour les cathepsines dans des systèmes *in vitro* [407, 473]. L'existence de molécules activatrices intermédiaires entre les deux types de protéases a donc été suggérée (voir Fig.5 - *La voie apoptotique lysosomiale*). Les lysoapoptases, une nouvelle classe de protéases, pourraient servir de tel intermédiaire. Les lysoapoptases sont apparemment activées par les cathepsines à l'intérieur du compartiment lysosomal, puis transloquent dans le cytosol où elles semblent pouvoir cliver et activer la pro-caspase-3 [472]. Un autre candidat plausible est le BH3-unique Bid, qui peut être clivé par des protéases lysosomiales suite à la perméabilisation des lysosomes. Le clivage s'effectue au site de l'arginine-65, soit à un endroit différent du clivage par la caspase-8 qui se produit au site de l'asparagine-59, mais toujours dans le domaine flexible en forme de boucle [407]. Le fragment tronqué tBid produit par les cathepsines, possiblement les cathepsine-B, -H, -L ou -S [474], est capable de transloquer lui aussi à la mitochondrie et d'induire le relargage de cytochrome c, reliant ainsi la rupture lysosomiale à la voie mitochondriale et à l'activation des caspases [407, 474]. Une étude récente de Bidère et al. propose que la cathepsine-D, une fois dans le cytosol, stimule le changement conformationnel de Bax qui se dirige ensuite vers la mitochondrie pour s'intégrer dans sa membrane et provoquer la perméabilisation mitochondriale. Ce phénomène serait indépendant du clivage de Bid et

causerait cependant une perméabilisation mitochondriale mineure seulement, qui se limiterait au relargage de AIF [475]. L'équipe de Boya et al. a proposé un mécanisme similaire, dans lequel l'activation de Bax et/ou Bak succède à la rupture lysosomiale et enclenche par la suite la dysfonction mitochondriale, le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 [476]. Dans certains systèmes, les protéases lysosomiales semblent causer directement la dysfonction mitochondriale, via la production de RLO [477]. Bien que la perméabilisation lysosomiale et la translocation/activation des cathepsines semblent précéder la dysfonction mitochondriale et le relargage de cytochrome dans la majorité des systèmes étudiés, il demeure encore beaucoup d'incertitudes et de mécanismes à élucider concernant les connexions moléculaires entre les voies lysosomiale et mitochondriale (voir Fig.5 - *La voie apoptotique lysosomiale*). Pendant longtemps, la contribution des lysosomes à plusieurs voies d'apoptose, incluant la voie mitochondriale, a tout simplement été ignorée. Actuellement, un fait demeure et est largement accepté à propos de l'importance de l'intensité du dommage lysosomal dans la décision d'une cellule d'activer la mort programmée ou de se tourner vers les voies nécrotiques. En effet, une atteinte sévère des lysosomes accompagnée du relargage massif des enzymes hydrolytiques mène à la nécrose, alors qu'une rupture partielle du compartiment lysosomal (ssALL) conduit plutôt à la mort apoptotique [259, 447, 478]

1.3.2.3 Les mécanismes de perméabilisation lysosomiale

Actuellement, peu de choses sont connues concernant les mécanismes qui mènent à la rupture de la membrane lysosomiale. Il a été proposé récemment que la sphingosine, un métabolite de la voie des sphingomyélines et des céramides, serait directement impliquée dans la perméabilisation de la membrane lysosomiale. La sphingosine est constituée d'une longue queue hydrophobique et d'une extrémité polaire qui contient un groupement amine qui a la particularité de piéger des protons. Par ce mécanisme de « *proton-trapping* », la sphingosine est donc sélectivement attirée par le compartiment lysosomal acide où la sphingosine pourrait agir comme un détergent et perméabiliser la membrane [272]. En accord avec cette hypothèse, certaines études ont démontré que de petites quantités de sphingosine exogène provoquent le ssALL et l'apoptose, alors que fortes doses de sphingosine résultent plutôt en une rupture lysosomiale massive suivie d'une mort nécrotique [272, 478]. Il est intéressant de constater la similarité de ce phénomène avec

celui décrit chez la mitochondrie: si la perméabilisation mitochondriale et la chute du $\Delta\Psi_m$ surviennent très rapidement et trop intensément, la cellule meurt par nécrose, alors que si la perméabilisation est limitée et contrôlée, la voie apoptotique sera activée [479, 480]. Récemment, Taha et al. ont démontré que plusieurs agents qui endommagent l'ADN provoquent une diminution de l'expression de la sphingosine kinase-1, l'enzyme responsable de la conversion de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate, et il en résulte donc une augmentation des niveaux intracellulaires de sphingosine [481]. Ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme via lequel l'induction d'un dommage à l'ADN mène à une augmentation des niveaux de sphingosine et à la rupture subséquente des lysosomes. Les céramides ont également été proposés comme médiateurs de la perméabilisation lysosomiale, par un mécanisme différent de celui des sphingosines. L'addition de céramides exogènes ne perméabilise pas les lysosomes [482], mais les céramides endogènes pourraient lier et activer la cathepsine D qui serait par la suite impliquée dans le ss Δ LL [467].

Le stress oxydatif et les RLO font également partie d'un mécanisme qui conduirait à la perméabilisation des lysosomes. En fait, au cours des dernières années, la rupture lysosomiale et le ss Δ LL ont surtout été observés dans des cellules subissant un stress oxydatif quelconque. Les RLO induisent des réactions oxydatives catalysées par le fer à l'intérieur des lysosomes, ce qui déstabilise la membrane lysosomiale [458, 460, 483]. Certains stimuli apoptotiques qui ont été associés à une rupture lysosomiale, tels que l'action du TNF- α [484] et des lipopolysaccharides [485], ainsi que les agents lysosomotropiques photo-sensibilisants [486], provoquent également un stress oxydatif cellulaire en cours d'apoptose. De plus, il a été démontré que les protéases lysosomiales promouvoient la génération de RLO par la mitochondrie, créant ainsi une boucle d'amplification du dommage oxydatif qui stimule davantage le ss Δ LL [477].

Étant donné les rôles majeurs joués par les protéines de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation des mitochondries, il est tentant de proposer que les Bcl-2-like pourraient aussi transloquer aux lysosomes et promouvoir la rupture lysosomiale, soit via leur capacité à s'oligomériser sous forme de canaux, soit en modulant des structures membranaires ou des complexes « *pore-like* » pré-existants dans la membrane lysosomiale. Toutefois, aucune évidence expérimentale en faveur d'une telle hypothèse n'est actuellement disponible. Deux études menées par Zhao et al. ont néanmoins démontré que la surexpression de l'anti-apoptotique Bcl-2 empêche la perméabilisation des lysosomes

induite par un stress oxydatif, une protection conférée uniquement par la forme phosphorylée de Bcl-2, et par un mécanisme qui impliquerait l'inactivation de la PLA2 (*phospholipase A2*) par Bcl-2, une enzyme possiblement impliquée dans l'endommagement des membranes mitochondriales et/ou lysosomiales [487, 488].

Actuellement, la voie apoptotique lysosomiale fait l'objet de nombreuses études, qui permettront sûrement, dans un avenir rapproché, de mieux comprendre et d'élucider les signaux et les mécanismes moléculaires qui conduisent à la rupture lysosomiale en cours d'apoptose.

1.3.3 L'implication des autres organites

1.3.3.1 Le réticulum endoplasmique

Au cours des dernières années, le RE s'est lui aussi taillé une place en tant qu'organite jouant un rôle dans l'apoptose, principalement via la modulation des niveaux de calcium intracellulaire. Le RE est le site majeur de séquestration du calcium et une perturbation de l'homéostasie calcique entraîne facilement la mort de la cellule [257, 489, 490]. Un excès de calcium intracellulaire enclenche généralement des voies d'apoptose, à moins que la surcharge calcique soit très importante, dans ce cas, ce sont des voies nécrotiques qui sont plutôt activées [491]. Les mitochondries participent aussi au maintien de l'homéostasie calcique et l'influx de calcium à travers la membrane mitochondriale est facilité par sa proximité avec le RE. Le calcium serait un messager qui coordonne les interactions entre mitochondrie et RE en cours d'apoptose [256]. Certains sites du RE, comme les récepteurs à IP₃ (*inositol-1,4,5-triphosphate*), qui sont en partie responsables de l'activation des canaux calciques, se retrouvent juxtaposés à la membrane mitochondriale. Certains signaux mènent au relargage massif de calcium du RE, ce calcium pénètre dans la mitochondrie et cette surcharge calcique promouvoit la perméabilisation mitochondriale, la libération du cytochrome c et l'apoptose [347, 492-494]. Un nouveau mécanisme d'amplification du signal apoptotique a récemment été proposé par Boehning et al. Ils ont démontré que de petites quantités de cytochrome c relarguées par la mitochondrie atteignent rapidement le RE, où le cytochrome c se lie aux récepteurs à IP₃, ce qui stimule le relargage de calcium du RE qui agit à son tour sur la mitochondrie pour déclencher le relargage massif de cytochrome c qui active les caspases et la cascade apoptotique [256].

Suite à la localisation de l'anti-apoptotique Bcl-2 au niveau des membranes du RE [149], il a été suggéré que Bcl-2 pouvait moduler les niveaux intracellulaires de calcium [420]. Toutefois, l'action de Bcl-2 sur l'homéostasie du calcium est encore source de controverses. La surexpression de Bcl-2 a été associée à une élévation des niveaux de calcium du RE dans des lymphomes de souris et des cellules humaines de cancer du sein, abaissant par conséquent la concentration de calcium cytosolique et protégeant ainsi la cellule [495, 496]. Bcl-2 pourrait augmenter l'expression de la pompe SERCA-2 (*sarco(endo)-plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*) du RE, qui pompe le calcium à l'intérieur du RE. Bcl-2 pourrait aussi moduler directement l'activité de la pompe SERCA via des interactions protéine-protéine. Bcl-2 cause ainsi un abaissement du calcium cytosolique et favorise la survie de la cellule [496]. Toutefois, des données contradictoires indiquent que la surexpression de Bcl-2 cause plutôt une diminution de la charge de calcium du RE dans les cellules HeLa [497], dans les cellules humaines de cancer de la prostate [498], dans les cellules HEK-293 de reins embryonnaires humains et dans les fibroblastes R6 [499]. Néanmoins, ces études démontrent que la surexpression de Bcl-2, en abaissant le calcium du RE, protège encore les cellules de la mort. Il a été suggéré que les faibles niveaux de calcium du RE limitent la quantité de calcium relarguée dans le cytosol, ce qui diminue aussi l'influx de calcium dans la mitochondrie et favorise la survie de la cellule [500]. Les discordances observées peuvent provenir de différences dans les niveaux de surexpression de Bcl-2, de la méthodologie utilisée pour mesurer le calcium intracellulaire, ou tout simplement des particularités propres à chaque lignée cellulaire. Depuis ce temps, d'autres membres de la famille Bcl-2 ont été localisés au niveau du RE, dont Bcl-xL [501], Bax et Bak [153, 154], Bik [502] et Spike [127]. Bcl-xL semble diminuer l'expression des récepteurs à IP₃ et le relargage subséquent de calcium lors de la stimulation des lymphocytes T, les protégeant de l'apoptose [503]. Bcl-2 et Bcl-xL interagissent avec Bap31, une protéine du RE [504]. Bap31 pourrait servir de protéine adaptatrice entre Bcl-xL ou Bcl-2 et la pro-caspase-8L [505]. Après un stimulus apoptotique, la caspase-8 clive Bap31, générant un fragment intégré dans la membrane du RE, appelé p20, qui stimulerait l'apoptose [504]. La présence de Bcl-2/Bcl-xL empêcherait le clivage de Bap31 [505] et prévient l'action pro-apoptotique de p20 [504]. L'expression ectopique de p20 induit le relargage de calcium du RE, augmente l'influx de calcium dans la mitochondrie et promouvoit l'apoptose [504, 506]. Le BH3-unique Spike qui a été localisé uniquement au RE, peut interagir avec Bap31 et déplacer ainsi Bcl-xL, ce qui favorise le clivage et

l'activation de Bap31[127]. La surexpression des pro-apoptotiques Bax et Bak stimule la décharge de calcium en provenance du RE, ce qui augmente l'entrée de calcium dans les mitochondries et favorise leur perméabilisation, la libération du cytochrome c et l'apoptose [153, 154, 507]. Les mécanismes par lesquels Bax/Bak contribuent à maintenir le calcium dans le RE des cellules saines et stimulent le relargage du calcium après un stimulus apoptotique demeurent incertains. Leur capacité à former des canaux ioniques dans les membranes, la modulation de l'expression de SERCA, des récepteurs à IP_3 ou de d'autres canaux calciques pré-existants et les interactions avec les membres anti-apoptotiques représentent tous des mécanismes d'action potentiels de Bax et Bak au niveau du RE. Le BH3-unique Bik, lorsque localisé au RE, semble stimuler le relargage de cytochrome c par un mécanisme intrigant qui ne dépend pas du calcium relargué par le RE, ni de l'expression de Bax, ni du mPTP mitochondrial [502]. Des données supplémentaires seront donc nécessaires pour clarifier le rôle de Bik ainsi que des autres Bcl-2-like au RE.

Les calpaïnes, des protéases à cystéine cytosoliques activées par le calcium, sont aussi impliquées dans l'apoptose et clivent des substrats en commun avec les caspases, dont les pro-caspase-3 et -7, Bid, Bcl-xL et Bcl-2, ainsi que des protéines structurales, des médiateurs des voies signalétiques, des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome et plusieurs autres [489]. Toutefois, le clivage des caspases par les calpaïnes mène généralement à l'inactivation des caspases [508]. Une exception est le clivage de la pro-caspase-12 par la m-calpaïne (ou calpaïne 2), une des deux isoformes des calpaïnes exprimées de façon ubiquitaire, l'autre étant la μ -calpaïne (ou calpaïne 1). La pro-caspase-12, décrite seulement chez la souris, est localisée au niveau des membranes du RE, et est clivée et activée par la m-calpaïne, elle-même activée en réponse à un stress du RE et/ou à la mobilisation du calcium intracellulaire. Une fois activée, la caspase-12 initie la cascade protéolytique en clivant les caspases effectrices [509]. Le clivage de Bid par les calpaïnes produit un fragment tronqué similaire à celui généré par l'activité de la caspase-8, qui promouvoit la perméabilisation mitochondriale [510] et le potentiel pro-apoptotique de Bax croît lorsqu'il est clivé par les calpaïnes, tout comme lors de son clivage par les caspases [511]. La calcineurine, une protéine phosphatase calcium/calmoduline-dépendante, est activée par le calcium et promouvoit l'apoptose de diverses façons. Par exemple, la calcineurine déphosphoryle le BH3-unique Bad, qui est par la suite libéré de la chaperone 14-3-3, transloque à la mitochondrie et induit l'apoptose par la voie mitochondriale [512]. L'immunosupresseur cyclosporine A, par son action inhibitrice sur

la calmoduline et/ou sur l'ouverture du mPTP, bloque l'apoptose calcium-dépendante des cellules lymphoïdes [513]. Les calpaïnes clivent et inactivent aussi un inhibiteur endogène de la calcineurine, cain/cabin 1, favorisant son activation [514]. Des perturbations de l'homéostasie du calcium, contrôlée principalement au niveau du RE, peuvent donc entraîner la mort de la cellule de diverses façons et la survie cellulaire nécessite une régulation précise de la signalisation calcique.

1.3.3.2 Le noyau

Le noyau est la cible principale de nombreux agents inducteurs d'apoptose, tels que les agents alkylants (ex: cyclophosphamide), les antimétabolites (ex: 5-fluorouracil), les radiations UV et ionisantes, les inhibiteurs de topoisomérases (ex: camptothécine, etoposide) et les agents qui se lient de façon covalente à l'ADN (ex: cisplatine) [515-517]. Le mode d'action de ces agents est l'induction de dommage à l'ADN, qui seront détectés par des enzymes qui initieront une panoplie de réponses cellulaires telles que la réparation de l'ADN, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Les cassures doubles brins sont détectées principalement par les kinases ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) et DNA-PK, alors que les dommages induits par les rayons UV et possiblement les cassures simples brins seront plutôt détectés par la kinase ATR (*ataxia teleangiectasia Rad3 related*). Toutes ces enzymes, ainsi que les sérine/thréonine kinases activées en aval Chk1 et Chk2, peuvent phosphoryler p53 ce qui le stabilise et active sa fonction de transactivation et/ou inhibe sa liaison avec Mdm2, empêchant ainsi la dégradation de p53 et favorisant son accumulation [518]. La protéine Mdm2 lie l'extrémité N-terminale de p53, bloquant ainsi la fonction de transactivation de p53, en plus de stimuler la dégradation de p53 par le protéosome. Suite à l'induction de dommage à l'ADN et à l'activation de la cascade enzymatique de détection, le signal apoptotique initié dans le noyau se dirigerait principalement vers la mitochondrie. En effet, p53 peut transactiver directement les Bcl-2-like pro-apoptotiques Bax, Noxa, Puma et Bid [121, 519-521], qui médient l'apoptose en agissant surtout au niveau mitochondrial. Donc contrairement aux autres organites, qui génèrent eux-mêmes des voies apoptotiques spécialisées, il n'existe pas de voie apoptotique nucléaire en tant que tel. La formation d'un apoptosome nucléaire, composé des corps nucléaires PML (*promyelocytic leukaemia*) et de BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*), a bel et bien été suggérée [516], mais aucune évidence n'a

pu démontré l'activation intranucléaire de caspases, excepté peut-être pour la caspase-2. La pro-caspase-2, qui possède un NLS (*nuclear localization signal*), est la seule à être présente de façon constitutive dans le noyau [522, 523]. Une interaction entre la caspase-2 et la cycline D3 pourrait potentialiser l'activation nucléaire de la caspase-2 [524]. La pro-caspase-2 a également été co-localisée avec la molécule adaptatrice RAIDD dans le noyau lorsque les deux protéines sont transfectées dans des cellules HEK 293T [525]. À noter que la localisation sous-cellulaire du nouveau complexe PIDDosome (PIDD-RAIDD-caspase-2), décrit par Tinel et al. [234], est actuellement inconnue et la présence du PIDDosome dans le noyau demeure une possibilité. Bien que le mécanisme d'activation de la caspase-2 nucléaire suite à l'endommagement de l'ADN ne soit pas encore bien défini, la caspase-2 pourrait ensuite transloquer dans le cytosol, où elle pourrait initier la voie apoptotique mitochondriale (*voir section: 1.2.4.1 - Les voies d'activation des caspases*). Il a même été démontré que la caspase-2 nucléaire pouvait provoquer la dysfonction mitochondriale très tôt pendant le processus apoptotique, par un mécanisme qui ne nécessiterait pas la translocation cytosolique de la caspase-2 car l'utilisation d'un agent qui bloque l'exportation à travers les pores nucléaires ne modifie pas le relargage de cytochrome c induit par l'activité de la caspase-2 nucléaire [244]. La caspase-2 nucléaire diffuserait de façon passive dans le cytosol seulement au cours de phases ultérieures de l'apoptose, lorsqu'il y a un accroissement général du processus de diffusion à travers les pores nucléaires [244]. Une fois que le signal apoptotique est relayé vers la mitochondrie, des molécules apoptogéniques, tels que AIF et EndoG (*voir section: 1.3.1.4 - Les événements en aval de la perméabilisation mitochondriale*), vont transloquer dans le noyau pour provoquer les phénomènes apoptotiques nucléaires. Récemment, il a été démontré que le cytochrome c peut lui aussi transloquer dans le noyau, où son accumulation semble contribuer au phénomène de condensation de la chromatine, dans des conditions *in vitro* [526]. Le noyau est donc un site d'initiation, le signal apoptotique sort ensuite du noyau pour atteindre les organites par des mécanismes encore obscurs qui semblent impliquer les Bcl-2-like, et le signal retourne finalement dans le noyau pour provoquer les changements nucléaires typiques. Bien que le mode d'action principal des protéines de la famille Bcl-2 après l'induction de dommage à l'ADN soit de transloquer vers les autres organites pour y médier l'apoptose, certains Bcl-2-like pourraient aussi agir directement dans le noyau pour moduler des événements nucléaires impliqués dans le programme apoptotique. Bcl-2 a aussi été localisé au niveau de la membrane nucléaire externe et des complexes de pores

nucléaires, suggérant une action de Bcl-2 dans le noyau [149]. Il a été proposé que Bcl-2 pouvait affecter la translocation nucléaire de p53, modulant ainsi l'apoptose p53-dépendante [527, 528]. Bcl-2, peut-être via son activité de formation de canaux, semble également stimuler l'augmentation des concentrations de glutathione dans le noyau, une condition qui favorise la survie cellulaire en protégeant contre certains phénomènes apoptotiques nucléaires [529-531]. Bcl-2 semble aussi diminuer l'influx de calcium dans des noyaux isolés, ce qui favoriserait la survie des cellules [532]. Bcl-2 et Bax ont été observés en association avec des protéines de la matrice nucléaire dans des noyaux en interphase, suggérant un rôle possible pendant la division cellulaire [533-535]. Récemment, il a été démontré dans notre laboratoire, que Bcl-xL s'associe au complexe cdc2/cdk1-cycline A/B1 et inhibe l'activité kinase de ce complexe après un dommage à l'ADN, suggérant une nouvelle fonction pour Bcl-xL en tant que lien moléculaire entre l'apoptose et les points de contrôle du cycle cellulaire [536].

1.3.4 La voie des récepteurs de mort cellulaire

Chez les mammifères, la famille des récepteurs de mort cellulaire TNF inclue les membres suivants: Fas/CD95/Apo-1, TNF-R1, DR3, DR4/Trail-R1, DR5/Killer/Trail-R2, et DR6 [537]. Les récepteurs de mort cellulaire n'ont pas d'homologue chez *C.elegans* ni chez la drosophile *D.melanogaster*, bien qu'un homologue de l'adaptateur FADD (*Fas-associated DD*) ait été identifié chez la mouche [538]. De façon générale, les récepteurs de mort cellulaire sont activés par oligomérisation en réponse à la liaison de leur ligand respectif, élément initiateur de la voie extrinsèque d'activation des caspases, tel que décrit précédemment (*voir section: 1.2.4.1 - Les voies d'activation des caspases*). La portion extracellulaire des récepteurs contient un domaine riche en cystéine et la portion intracellulaire est caractérisée par la présence du domaine DD, couvrant environ une région de 80 acides aminés. Le DD est essentiel à l'activité pro-apoptotique des récepteurs de mort cellulaire [539]. Les voies signalétiques les mieux connues sont celles des récepteurs Fas, TNF-R1 et Trail. Les caractéristiques générales de ces voies sont discutées ci-après.

Le récepteur Fas est activé par la liaison de son ligand, Fas-L (*Fas ligand*), dont la transcription est régulée principalement par les facteurs NF- κ B et AP1 [540]. Fas-L est surtout exprimé par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK (*natural killer*). La transcription du récepteur Fas est régulée par les facteurs NF- κ B et p53. Fas est largement

exprimé, surtout dans les thymocytes et les cellules T activées [539]. Le DD intracellulaire de Fas recrute FADD, une molécule adaptatrice qui contient aussi un DD, ainsi qu'un DED. Ce dernier est responsable du recrutement de la pro-caspase-8, via l'interaction de leur DED respectif. La pro-caspase-10 pourrait aussi être recrutée de cette façon. Cette série de recrutement moléculaire forme le complexe appelé DISC [4, 218, 541]. Les pro-caspases s'auto-activent à cause de leur proximité, clivent et activent les caspases effectrices et la cellule meurt par apoptose. La pro-caspase-8 peut aussi cliver Bid et tBid transloque à la mitochondrie pour induire l'apoptose par la voie mitochondriale. En plus d'activer la voie extrinsèque, Fas peut donc activer aussi la voie apoptotique intrinsèque. Les cellules qui subissent l'apoptose médiée par Fas indépendamment de la mitochondrie, c'est-à-dire que la caspase-8 active directement les caspases effectrices sans intermédiaire, sont appelées cellules de type I (ex: cellules B lymphoblastoïdes SKW6.4 et cellules T H9). Dans les cellules de type II (ex: cellules T CEM et Jurkatt), la caspase-8 clive Bid qui active la voie mitochondriale et cette dysfonction mitochondriale est requise pour que Fas induise l'apoptose [542]. Il existe aussi un récepteur de type « leurre » ou « *decoy* » pour la liaison de Fas-L, appelé DcR3 (*decoy receptor 3*). C'est un récepteur sécrété qui ne contient pas de portion transmembranaire, incapable d'initier la cascade signalétique, mais qui lie Fas-L avec une très grande affinité. DcR3 compétitionne donc avec Fas pour la liaison de son ligand et agit comme une molécule anti-apoptotique [543]. En plus d'induire l'apoptose, Fas peut aussi enclencher des voies nécrotiques. Par exemple, si les caspases sont inhibées avec le Z-VAD-FMK, Fas tuera les cellules par nécrose [544, 545]. Le système Fas-L/Fas est important pour plusieurs fonctions du système immunitaire, dont l'élimination par apoptose des cellules qui ont terminé leur travail et des lymphocytes réactifs envers le soi, ainsi que pour l'élimination des cellules infectées par un virus ou des cellules cancéreuses par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK [4, 546]. L'expression de Fas et Fas-L étant régulée entre autres par les facteurs NF- κ B et p53, les agents anti-cancéreux qui mènent à l'activation de NF- κ B et p53 peuvent ainsi permettre au signal apoptotique généré dans le noyau d'activer les récepteurs de mort cellulaire à la surface de la cellule.

La liaison de TNF- α à son récepteur résulte en l'homo-trimérisation et l'activation du récepteur TNF-R1. Le DD de TNF-R1 interagit ensuite directement avec l'adaptateur TRADD qui recrute FADD qui recrute à son tour la pro-caspase-8 [218, 547], les zymogènes de caspase-8 s'auto-activent et la cascade des caspases est enclenchée, menant

à l'apoptose de la cellule. TRADD peut aussi s'associer avec la sérine/thréonine kinase RIP qui est ainsi recrutée au récepteur TNF-R1 [547]. RIP peut ensuite interagir avec l'adaptateur RAIDD via leurs domaines DD respectifs [236], et RAIDD peut recruter à son tour la pro-caspase-2 via leurs domaines CARD respectifs [235, 236]. Cette cascade de recrutement permet donc d'associer également la caspase-2 à la signalisation par le TNF- α . Un autre type de signalisation initiée par TNF-R1 mène plutôt à l'activation de cascades de kinases qui médient les effets pro-survie des facteurs de transcription NF- κ B et AP1 via la molécule TRADD qui peut aussi recruter la sérine/thréonine kinase RIP et la molécule TRAF-2 (*TNF receptor-associated factor-2*), qui activent les voies de survie de NF- κ B et AP1, respectivement [548, 549]. Le TNF étant synthétisé surtout par les macrophages activés et par d'autres cellules lymphoïdes, le TNF et ses récepteurs sont surtout impliqués dans des activités pro-inflammatoires et la voie inductrice d'apoptose médiée par l'activation de TNF-R1 survient plutôt rarement [539, 550]. La liaison de TNF- α à son récepteur semble même induire la nécrose de certains types cellulaires [551].

Les récepteurs DR4/Trail-R1 et DR5/Killer/Trail-R2 sont activés par la liaison de leur ligand commun, Trail (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). DR4 et DR5 contiennent un DD dans leur portion intracellulaire qui promouvoit la formation du complexe DISC et l'activation subséquente des pro-caspase-8 et/ou -10. De façon similaire à Fas, DR4 et DR5 peuvent induire l'apoptose à la fois par la voie extrinsèque via l'activation directe des caspases effectrices et par la voie intrinsèque via le clivage de Bid par la pro-caspase-8 [552-554]. DcR1 et DcR2 sont deux récepteurs de type leurre, qui peuvent également lier le ligand Trail. DcR1 ne possède pas de domaine intracellulaire et le domaine DD de DcR2 est tronqué. Ces deux récepteurs sont donc incapables d'enclencher la voie signalétique et inhibent l'apoptose induite par Trail lorsqu'ils sont surexprimés [555-558]. Le cinquième récepteur capable de lier Trail est l'osteoprotégerin (OPG), une protéine sécrétée dont l'affinité pour Trail est très faible et dont le rôle est encore méconnu [559]. Le système Trail pourrait participer, entre autres, à l'apoptose des cellules ciblées par les cellules T cytotoxiques, les cellules dendritiques et les monocytes [560-562]. En réponse à l'endommagement de l'ADN, p53 peut transactiver DR5 et faciliter ainsi l'apoptose [563, 564]. Plusieurs lignées cellulaires cancéreuses traitées avec Trail démontrent une résistance à l'apoptose, due entre autres à l'expression élevée des récepteurs de type leurre dans certaines tumeurs [565].

Les récepteurs de mort cellulaire sont donc essentiels pour assurer une bonne fonction immunitaire. De plus, ces récepteurs sont aussi impliqués dans l'induction de l'apoptose par certaines thérapies anti-cancéreuses et des anomalies dans les voies signalétiques enclenchées par les récepteurs de mort cellulaire ont été observées dans de nombreuses tumeurs, telles que la perte de l'expression de Fas, la délétion et/ou des mutations dans les gènes codant pour DR4 et DR5, la surexpression des récepteurs de type leurre et de FLIP, un inhibiteur du recrutement et de l'activation de la caspase-8 par le DISC, décrit précédemment (*voir section: 1.2.4.1 - Les inhibiteurs des caspases*) [539, 566].

1.4 Le dommage à l'ADN

1.4.1 Les inhibiteurs de topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes nucléaires retrouvées chez toutes les espèces procaryotes et eucaryotes. Ces enzymes sont essentielles aux processus de réplication et de transcription de l'ADN, ainsi que lors de la mitose. De façon générale, le rôle des topoisomérases est d'éliminer le « super-enroulement » de l'ADN en amont de la fourche de réplication ou du complexe de transcription, causé par la progression de ceux-ci. Les topoisomérases de type I et III, ou topo I et topo III, se lient à la molécule d'ADN, coupent un brin, le deuxième brin non-clivé passe à travers la brisure simple brin et est reliqué, éliminant ainsi un super-enroulement à chaque fois. La topoisomérase de type II, ou topo II, coupe les deux brins de la molécule d'ADN, fait passer une portion du duplex à travers la cassure et religue ensuite les deux brins d'ADN, ce qui relaxe l'ADN super-enroulé. La topo II facilite également le nouement de l'ADN pendant la condensation de la chromatine en chromosomes lors de la mitose. La topo II est la cible de plusieurs agents anti-tumoraux très puissants, dont doxorubicine, mitoxantrone, amsacrine et ellipticines, qui s'intercalent dans l'ADN, ainsi que des agents non-intercalants tels que etoposide (VP16) et teniposide [567]. L'activité de la topo I est bloquée par l'alkaloïde camptothécine (CPT) et ses dérivés semi-synthétiques solubles comme topotecan et MDO-CPT, qui sont largement utilisés en clinique [568]. Les inhibiteurs de topo I stabilisent un état transitoire où la topo I est liée de façon covalente à l'extrémité 3' du brin d'ADN cassé, stabilisant ainsi une cassure de type simple brin. Les inhibiteurs de topo II, quant à eux, stabilisent la cassure double brins

produite par la topo II au moment où celle-ci vient de briser les deux brins de l'ADN et est liée à l'extrémité 5' du duplex d'ADN [567, 568]. La stabilisation covalente des cassures de l'ADN est le mécanisme d'action majeur des inhibiteurs de topoisomérases. Les inhibiteurs de topo I et II sont donc actifs lorsque les cellules sont en phase S (*synthèse*), où elles répliquent leur ADN, et lorsqu'elles effectuent le processus de transcription. De plus, les inhibiteurs de topo II sont aussi actifs dans les cellules mitotiques, lors de la condensation de la chromatine en chromosomes. La grande efficacité des inhibiteurs de topo II est reliée au fait que ceux-ci induisent directement des cassures double brins dans l'ADN, un dommage immédiatement reconnu par les kinases détectrices telles que ATM (ou ATR) et DNA-PK qui enclenchent les voies de réponse de la cellule. Les inhibiteurs de topo I provoquent une cassure simple brin, dommage non-cytotoxique en soi, et il semble que ce soit la collision entre le complexe topo I-ADN stabilisé par l'inhibiteur et la fourche de réplication qui provoque une cassure double brins et génère la lésion cytotoxique [569]. Les inhibiteurs de topo I semblent plus actifs pendant la réplication que lors du processus de transcription de l'ADN [570]. La réponse cellulaire aux agents inhibiteurs de topoisomérases est à la fois complexe et très variée. Cette réponse comporte plusieurs aspects, dont l'initiation des voies signalétiques de dommage génotoxique, les arrêts du cycle cellulaire et l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN. Suite à l'endommagement de l'ADN, la cellule effectue généralement des arrêts du cycle cellulaire, probablement dans le but de se donner du temps pour réparer les bris et pour prévenir les cassures supplémentaires induites pendant la réplication [570]. Les cassures doubles brins peuvent être réparées par les voies cellulaires de réparation conventionnelles, dont les mécanismes de recombinaison homologue, qui impliquent principalement les protéines Rad52/51, et de recombinaison non-homologue, aussi appelé le NHEJ (*non-homologous end joining*) qui comptent surtout sur l'activité de la DNA-PK [570]. La topoisomérase doit préalablement être dégradée afin de laisser le site de cassure libre et accessible aux protéines de réparation. Par exemple, la topo I est dégradée par le système ubiquitine/protéosome, lui-même stimulé par la camptothécine [571]. La camptothécine induit aussi la conjugaison des protéines SUMO, des ubiquitin-like, à la topo I pour stimuler sa dégradation [572, 573]. Les cassures doubles brins activent des kinases, principalement ATM (ou ATR) et la DNA-PK, qui initient les cascades signalétiques de réparation de l'ADN et de mort cellulaire [569]. Si l'ADN est réparé de manière acceptable par la cellule, celle-ci pourra survivre, alors que si la cellule est incapable de réparer les

bris dans son ADN, des voies de mort cellulaire seront enclenchées. Les cellules traitées avec des inhibiteurs de topoisomérases vont principalement activer des voies de mort apoptotique. Par exemple, l'activation de ATM (ou ATR) mène à la stabilisation du facteur p53 qui médie alors l'apoptose. Toutefois, la mort de la cellule par nécrose peut également survenir [569, 574]. Les voies de réponse cellulaire après l'action des inhibiteurs de topoisomérases sont très complexes et ne sont pas encore bien élucidées. Alors que les premières étapes, c'est-à-dire la stabilisation des complexes topoisomérase/cassure d'ADN et la conversion de cet événement en cassure double brins, sont relativement bien élucidées, ce n'est pas le cas des voies signalétiques qui mènent à la mort cellulaire. Une meilleure compréhension de ces cascades d'évènements signalétiques permettra d'améliorer les thérapies anti-cancéreuses ciblant l'action des topoisomérases.

1.4.2 Les facteurs de transcription activés par le dommage à l'ADN

1.4.2.1 Le facteur p53

Suite à l'induction de dommage à l'ADN, l'activité de la kinase ATM mène rapidement à la stabilisation et à l'activation du facteur p53. Chez les vertébrés, p53 est bien connu pour médier l'apoptose, mais p53 agit aussi pour activer les points de contrôle du cycle cellulaire [575]. Les souris knock-out pour p53 développent rapidement des tumeurs spontanées, d'où l'attribution de gène supresseur de tumeurs à p53. Plus de la moitié des tumeurs humaines présentent des mutations dans le gène *p53*. L'activation de p53 joue un rôle majeur dans la réponse apoptotique après les traitements de radiothérapie et de chimiothérapie. Plusieurs agents anti-cancéreux activent p53 qui stimule l'apoptose en transactivant de nombreux gènes pro-apoptotiques. L'expression de plusieurs membres de la famille Bcl-2 est modulée par p53. Le gène *bax* fut la première cible transactivée par p53 à avoir été identifiée [519, 576, 577]. Les gènes *puma* [119, 520], *noxa* [121] et *bid* [521], qui codent pour des BH3-unique pro-apoptotiques, contiennent tous des éléments de réponse à p53 dans leur séquence génique et sont aussi transactivés par p53. Le facteur p53 pourrait également réprimer le gène *bcl-2*, bien qu'aucun élément de régulation négative n'ait été identifié dans la séquence de *bcl-2* [576, 578]. La modulation de l'expression des protéines Bcl-2-like par p53 favorise donc l'activation de la voie mitochondriale et la mort apoptotique subséquente. Outre la famille Bcl-2, le facteur p53 transactive aussi le gène

codant pour le récepteur de mort cellulaire Fas, alors que l'expression de Fas-L serait plutôt induite de façon p53-indépendante [579, 580]. Un autre récepteur de mort cellulaire, DR5, est aussi induit par p53 [563]. L'induction de Fas et DR5 par p53 établit un lien entre un signal apoptotique initié dans le noyau et l'activation des récepteurs de mort à la surface de la cellule. La protéine PIDD est également une cible transactivationnelle de p53 [238], le rôle de PIDD dans la formation d'un nouveau complexe activateur de caspases a été abordé précédemment (*voir section: 1.2.4.1 - Les voies d'activation des caspases*). Le facteur p53 stimule aussi la transcription des gènes codant pour p21, Gadd45 (*growth arrest- and DNA damage-inducible 45*) et 14-3-3 σ , des médiateurs des arrêts du cycle cellulaire, ainsi que le gène *mdm2*, p53 stimulant ainsi sa propre dégradation Mdm2-dépendante [518, 581]. Une famille de gènes, appelés les *pig's (p53-inducible genes)*, sont aussi induits par p53, et la protéine PIG3 possède apparemment la capacité d'accroître les niveaux de RLO cellulaires, causant un stress oxydatif et facilitant ainsi l'apoptose [582, 583]. L'activité transcriptionnelle de p53 semble dépendre du contexte cellulaire car certains gènes-cibles de p53 présentent un patron d'expression spécifique à certains tissus [564, 584, 585]. Par sa capacité à lier directement des séquences d'ADN, p53 pourrait aussi réprimer l'expression de l'IAP Survivin [586], bien que l'implication de Survivin dans l'apoptose après dommage à l'ADN soit incertaine.

Des fonctions autres que celle de facteur de transcription ont aussi été attribuées à p53. Dans un modèle d'apoptose p53-dépendante, p53 peut transloquer directement à la mitochondrie, où il se lierait directement aux anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL pour antagoniser leur fonction pro-survie [587, 588]. Récemment, Chipuk et al. ont démontré que lorsque p53 s'accumule dans le cytosol, il peut interagir avec Bax et stimuler directement son activation afin de perméabiliser la mitochondrie, d'une manière analogue à l'action des BH3-unique de type activateur comme tBid [589]. Dans une étude similaire, Leu et al. ont montré que p53 interagit aussi avec Bak, stimulant l'oligomérisation de Bak et le relargage de cytochrome c [590]. Le facteur p53 semble donc promouvoir l'apoptose de diverses façons, l'activation de la transcription demeurant tout de même sa fonction la plus commune.

1.4.2.2 L'apoptose p53-indépendante

Les voies apoptotiques qui dépendent de l'activation du facteur p53 ont fait et font toujours l'objet de nombreuses études dans le domaine de la recherche sur le cancer. À l'opposé, beaucoup moins d'attention a été portée à l'apoptose en l'absence de p53. Les voies apoptotiques p53-indépendantes induites par un stress génotoxique demeurent actuellement peu comprises. Pourtant, des mutations de type « *loss of function* » dans le gène *p53* ont été retrouvées dans la majorité des tumeurs humaines et ces tumeurs caractérisées par un p53 muté ou défectueux représentent, apparemment, les cibles les plus difficiles pour les thérapies anti-cancéreuses [591, 592]. Il est toutefois intéressant de constater que certaines lignées cellulaires tumorales déficientes pour p53 peuvent demeurer sensibles à certains agents anti-cancéreux, dont les inhibiteurs de topoisomérase, et mourir rapidement par apoptose suite à l'action de ces agents [21, 27, 593-595]. Ces observations remettent évidemment en cause le rôle de p53 en tant que médiateur absolu de l'apoptose et ouvrent la voie à l'implication d'autres facteurs de transcription qui pourraient moduler, eux aussi, la transcription de gènes associés à l'apoptose. Les sections suivantes (*voir sections: 1.4.2.3, 1.4.2.4 et 1.4.2.5*) aborderont le rôle de certains de ces facteurs dans l'apoptose après une lésion génotoxique. De plus, des mécanismes indépendants de la transcription peuvent également jouer un rôle prépondérant dans la promotion de la mort cellulaire programmée. Par exemple, les nombreuses modifications post-traductionnelles que peuvent subir les protéines de la famille Bcl-2 modulent grandement leur activité pro- ou anti-apoptotiques (*voir section: 1.2.3.4 - Régulation*). Il est aussi important de noter que les modes d'action des protéines de la famille Bcl-2 ont rarement été étudiés dans un contexte cellulaire p53-déficient, et les mécanismes d'activation p53-indépendants des protéines Bcl-2-like restent à définir.

1.4.2.3 Les facteurs p73 et p63

Les facteurs de transcription p73 et p63 sont les deux autres membres de la famille de p53. Les facteurs de la famille p53 partagent des homologies au niveau de leurs domaines de transactivation, de liaison à l'ADN et d'oligomérisation. Il existe plusieurs variants de p73 et p63 produits par épissage alternatif, ces formes isomériques sont exprimées à la fois dans les cellules saines et dans les cellules cancéreuses. Des formes de

p73 et p63 délétées en position N-terminale sont même exprimées de façon endogène dans les cellules et agissent comme des dominants négatifs. Tout comme p53, p73 et p63 sont des régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, bien que leurs fonctions soient moins bien définies que celles de p53. De plus, l'attribution de suppresseur de tumeurs aux facteurs p73 et p63 est incertaine. En effet, la délétion des gènes *p73* et *p63* chez les souris n'est pas associée à une augmentation de la tumorigenèse et les mutations de p73 et p63 sont beaucoup moins fréquentes dans les cancers que celles de p53 [596-600]. Certains agents chimiothérapeutiques peuvent aussi mener à l'activation du facteur p73 et possiblement de p63. Par exemple, des traitements de cisplatine, doxorubicine, taxol, etoposide, camptothécine et gemcitabine mènent tous à l'activation de p73 [600], mais il semblerait que p73 demeure inactif suite à l'exposition des cellules aux rayons UV [601]. Le mode d'activation de p73 après un dommage à l'ADN semble aussi différer de celui de p53. Alors que p53 est phosphorylé et stabilisé principalement par l'action des kinases ATM et DNA-PK, ce serait plutôt la tyrosine kinase c-Abl qui serait responsable de l'activation de p73. La kinase c-Abl est rapidement activée par le dommage à l'ADN, c-Abl se lie ensuite directement à p73 et le phosphoryle, ce qui augmente la stabilité de p73 [598, 602, 603]. La MAP kinase p38 peut aussi phosphoryler et activer p73, indépendamment de la présence de c-Abl [604]. L'acétylation de p73 stimule aussi son activité et ces réactions d'acétylation sont aussi dépendantes du dommage à l'ADN [605]. Une interaction entre l'oncogène c-Myc et p73 pourrait aussi moduler l'activité de ce dernier [606]. Par contre, la régulation du facteur p63 n'est pas très bien connue actuellement et le lien entre l'induction d'un dommage à l'ADN et l'activation de p63 n'a pas encore été démontré de façon évidente. Une étude a reporté la stabilisation du variant p63 γ dans une lignée érythroleucémique de souris suite aux radiations ionisantes et après un traitement avec l'actinomycine D [607]. Toutefois, la stabilisation de p63 γ serait plutôt liée à l'induction de la différenciation et non à l'apoptose dans ce modèle.

Certains gènes-cibles de p53 sont aussi transactivés par p73 et p63 [600, 601, 608-610]. La transcription des gènes de la famille Bcl-2 *bax* et *puma* est stimulée par p73, favorisant ainsi l'apoptose par la voie mitochondriale. L'expression du récepteur de mort cellulaire DR5 serait aussi induite par p73, ainsi que la protéine Mdm2, qui médie la dégradation de p53, mais non celle de p73. Puis, en transactivant p21 et 14-3-3 σ , p73 peut aussi médier des arrêts du cycle cellulaire. p73 transactive également certains membres de la famille PIG. Toutefois, selon Zhu et al, la majorité de ces gènes sont induits d'une façon

moins par p73 que par p53, excepté les gènes 14-3-3 σ et PIG7, pour lesquels l'effet transactivationnel de p73 semble être dominant [608]. Les gènes *p21*, *bax* et *mdm2* sont également des cibles transactivationnelles de p63, mais demeurent eux aussi plus affectés par l'activité de p53 que par celle de p63 [597, 611]. Des études futures permettront sûrement de mieux comprendre les fonctions de p73 et p63, mais il semble déjà évident que ces facteurs, du moins p73, jouent aussi un rôle dans l'induction de l'apoptose. Ces facteurs représentent donc de bons candidats pour médier l'apoptose en l'absence de p53. Une étude intéressante a démontré, par des expériences avec des souris knock-out, que p53 serait même inactif lorsque p73 et p63 sont absents [612], suggérant l'existence d'un réseau d'interactions inter-moléculaires entre les différents membres de la famille p53.

1.4.2.4 Le facteur NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) est un complexe d'homo- ou d'hétéro-dimères formé par les différents membres de la famille NF- κ B: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105) et NF- κ B2 (p52/p100). NF- κ B est surtout connu pour son rôle dans la réponse immunitaire. NF- κ B est rapidement activé par les cytokines inflammatoires et les produits bactériens et régule l'expression de gènes codant pour des cytokines, des chémokines, des molécules d'adhésion et des peptides anti-bactériens [613-615]. NF- κ B est aussi impliqué dans la réponse cellulaire après un stimulus apoptotique, entre autres après l'induction d'un dommage à l'ADN [616-621]. Dans des cellules non-stimulées, NF- κ B est séquestré dans le cytosol par un inhibiteur de la famille I κ B (*inhibitor of NF- κ B*), dont les principaux sont I κ B α et I κ B β . En réponse à divers stimuli, les kinases IKK (*I κ B kinase*) phosphorylent I κ B, ce qui stimule la dégradation ubiquitine-dépendante de I κ B, libérant ainsi NF- κ B qui transloque dans le noyau où il induit l'expression de gènes-cibles [614].

NF- κ B peut transactiver des gènes anti-apoptotiques dont les membres de la famille Bcl-2 suivants: *bcl-2* [81], *bcl-xL* [622-625] et *bcl-2* [626]. Il induit aussi l'expression des inhibiteurs des caspases IAPs et c-FLIP, ainsi que de TRAF-1 et TRAF-2 [627], des molécules adaptatrices associées aux voies signalétiques du récepteur de mort cellulaire TNF. NF- κ B pourrait également médier, d'une façon probablement indirecte, l'inhibition du pro-apoptotique Bax [628]. Liu et al. ont démontré que NF- κ B pouvait protéger les

cellules de la mort cellulaire en bloquant l'activité de la cathepsine-B. Ils ont montré qu'après la stimulation du récepteur TNF-R1, NF- κ B est activé et qu'il induit l'expression de Spi2A, un inhibiteur endogène des cathepsines, plus précisément de la cathepsine-B, et que cette inhibition protège les cellules de l'apoptose par la voie lysosomiale [457]. De façon générale, NF- κ B semble donc agir comme facteur pro-survie et il semble jouer un rôle dans la tumorigenèse. Une activité constitutive de NF- κ B a été retrouvée dans certains cancers du sein, de la prostate, des ovaires et des tumeurs colorectales, ainsi que dans certaines formes de leucémies et de lymphomes [621, 629]. L'activité de NF- κ B représente donc une cible thérapeutique intéressante pour traiter ces formes de tumeurs.

Des fonctions pro-apoptotiques ont également été attribuées à NF- κ B. En effet, NF- κ B peut induire l'expression de molécules pro-apoptotiques comme les récepteurs de mort cellulaire Fas, DR4, DR5 et DR6 [630-632]. Toutefois, dans plusieurs modèles, NF- κ B induit aussi des gènes anti-apoptotiques qui semblent neutraliser l'effet des pro-apoptotiques. Il a été démontré récemment qu'après l'induction de dommage à l'ADN par les rayons UV-C et les agents anti-cancéreux doxorubicine et donوروبicine, des inhibiteurs des topoisomérases II, NF- κ B peut s'associer aux HDAC (*histone déacétylase*) et participer à une activité de « fermeture » de la chromatine, réprimant ainsi la transcription de certains gènes anti-apoptotiques, dont les gènes codant pour Bcl-xL et XIAP [633]. Cette dualité fonctionnelle de NF- κ B semble dépendre du contexte cellulaire et de la nature des signaux élicités par le stimulus apoptotique [634-636]. L'activation de NF- κ B pourrait aussi jouer un rôle dans l'apoptose en l'absence de p53. Dans un modèle d'apoptose induite par un traitement avec la camptothécine, l'activation de NF- κ B a déjà été associée à l'apoptose p53-indépendante [637], alors que l'activité de NF- κ B s'est avérée essentielle dans un autre modèle d'apoptose médiée par p53 [638]. En conclusion, il semble que l'environnement cellulaire et le type d'insulte cytotoxique soient encore une fois des facteurs déterminants dans la nature de la réponse élicitée par le facteur NF- κ B

1.4.2.5 Autres facteurs de transcription

La famille des facteurs de transcription AP1 (*activating protein 1*) est constituée d'homo-dimères et d'hétéro-dimères de Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), de Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) ou des membres de la famille ATF (ATF2, ATF3, B-ATF), qui sont

toutes des protéines de type bZIP (*basic region leucine zipper*) [639]. Les protéines Jun peuvent homo-dimériser entre elles ou former des hétéro-dimères avec les membres de la famille Fos et ATF. Les protéines ATF peuvent aussi homo-dimériser, alors que les membres de la famille Fos forment seulement des hétéro-dimères. Ces facteurs de transcription lient tous un site commun dans l'ADN, appelé site de liaison à AP1 [639]. c-Jun est un composant central de tous les complexes AP1 et le gène *c-jun* est exprimé dans de nombreux types cellulaires [640]. La cascade signalétique des JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase* ou *SAPK: stress-activated protein kinase*), qui font partie de la super-famille des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), est activée par un stress cellulaire et a été associée à l'apoptose dans certains modèles [641]. Suite à différents stimuli tels que l'abondance de facteurs de croissance, de cytokines et l'irradiation UV, les JNK sont responsables de la phosphorylation et de l'activation du facteur de transcription c-Jun/AP1 [640]. Selon différentes études, l'activation de la voie JNK-c-Jun stimulerait l'expression de Fas-L [642] et du BH3-unique Bim [643], suite au retrait du facteur de croissance NGF (*neuronal growth factor*). Suite à l'induction de Bim dans les neurones sympathiques du système nerveux périphérique privées de NGF, il y a activation de la voie mitochondriale et relargage de cytochrome c [643]. Toutefois, dans un autre modèle d'apoptose induit par les rayons UV, la voie JNK-c-Jun stimule l'apoptose indépendamment de l'activité transcriptionnelle de c-Jun/AP1 [644]. L'activité transitoire des JNK contribuerait aussi à l'apoptose médiée par le TNF- α , possiblement en induisant la protéolyse de Bid [645]. Selon certaines évidences, les JNK phosphorylent et inactivent les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, favorisant ainsi l'apoptose [179, 646]. Une autre étude a démontré que l'apoptose induite par les JNK nécessite la présence de Bax/Bak et que ceux-ci demeurent inactifs lorsque des fibroblastes déficients pour les JNK sont exposés à des stress environnementaux [647]. Récemment, Tsuruta et al. ont démontré que les JNK phosphorylent les chaperones 14-3-3, des protéines qui ancrent Bax dans le cytosol, ce qui libère Bax et enclenche la voie apoptotique mitochondriale [193]. La voie JNK-c-Jun est aussi associée à des fonctions anti-apoptotiques. Yu et al. ont démontré que la survie cellulaire médiée par l'IL-3 nécessite l'activation des JNK qui phosphorylent le BH3-unique Bad, causant sa séquestration dans le cytosol et son inactivation [648]. L'inhibition des activités JNK supprime la croissance de certaines cellules tumorales en stimulant leur mort apoptotique [649, 650]. Selon d'autres évidences, les JNK ne jouent aucun rôle dans l'apoptose induite par le TNF [651]. Il semble donc que la nature de la réponse cellulaire

élicitée par la voie signalétique JNK-c-Jun dépende encore une fois du contexte cellulaire et du type de stimulus initiateur.

La perte du supresseur de tumeurs Rb mène à une prolifération cellulaire incontrôlée et contribue au développement de nombreux cancers humains. Normalement, en réponse à l'inactivation de Rb, p53 est activé et déclenche l'apoptose, prévenant ainsi la tumorigenèse [652]. Dans des cellules saines, Rb régule négativement les facteurs de transcription de la famille E2F afin de freiner la croissance des cellules. En plus de promouvoir la transcription de gènes requis pour la progression du cycle cellulaire, certains facteurs E2F sont aussi associés à l'induction de l'apoptose. Par exemple, l'expression dérégulée de E2F1 due à l'inactivation de Rb, serait responsable de l'accumulation de p53 et de l'apoptose [653]. E2F1 est aussi un facteur de transcription phosphorylé et activé par les kinases ATM et ATR après l'induction d'un dommage à l'ADN. E2F1 phosphorylé serait recruté au promoteur du gène *p73* et stimulerait l'expression du facteur *p73* [654]. Il a été suggéré récemment que E2F1, par un mécanisme encore obscur, pourrait stimuler directement l'activité kinase d'ATM envers ses substrats p53 et Chk2, ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [655]. Hershko et al. ont montré dernièrement que la surexpression de E2F1 stimule l'induction des BH3-unique Puma, Noxa, Bim et Hrakiri, et que la forme E2F1 endogène lie les promoteurs de ces 4 gènes. De plus, l'inhibition de l'activité E2F dans des cellules p53-déficientes empêche l'augmentation des niveaux de protéines Puma après l'induction d'une lésion génotoxique par la cisplatine ou doxorubicine [656]. La modulation de certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 semble donc contribuer à l'apoptose induite par E2F1 et selon cette étude, E2F1 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose p53-indépendante après un dommage génotoxique.

La famille FoxO (*forkhead box-containing protein, O subfamily*) regroupe les facteurs de transcription FoxO1a, FoxO2, FoxO3a et FoxO4. En l'absence de facteurs de croissance, les FoxOs sont actifs dans le noyau, où ils transcrivent, entre autres, des gènes codant pour des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes Cdk (*cyclin-dependent kinase*), afin de freiner le cycle cellulaire. Suite à une stimulation avec des facteurs de croissance, les FoxOs sont phosphorylés par la cascade PI3K (*phosphatidylinositol-3'-OH kinase*) et sont par la suite capturés par les protéines 14-3-3 qui exportent les FoxOs à l'extérieur du noyau, favorisant ainsi la prolifération de la cellule [657]. La perte de fonction des FoxOs serait associée à la tumorigenèse. FoxO2 et FoxO4 sont impliqués dans des translocations chromosomiques dans certains cancers humains, ce qui pourrait

déréguler l'expression des FoxOs [658 , 659]. Les facteurs FoxOs sont aussi impliqués dans d'autres types de voies menant à la tumorigenèse. Par exemple, dans les tumeurs qui ont une activité élevée de la kinase $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, celle-ci phosphoryle FoxO3a, l'excluant ainsi du noyau ce qui stimule la croissance cellulaire [660]. Outre les gènes associés au contrôle du cycle cellulaire, FoxO3a pourrait aussi moduler l'expression de certains Bcl-2-like. Dans une étude récente de Sunter et al., un traitement de paclitaxel, un agent anti-cancéreux ciblant la polymérisation des microtubules, mène à l'activation de FoxO3a dans des cellules de cancer du sein. FoxO3a induit ensuite l'expression de Bim, contribuant ainsi à l'apoptose médiée par le paclitaxel [661]. Les facteurs FoxOs semblent donc jouer un rôle dans la tumorigenèse et l'inactivation des FoxOs favorise apparemment le développement et la progression de tumeurs. Les FoxOs feraient donc partie de la catégorie des gènes supresseurs de tumeurs et représentent eux aussi des cibles pour les thérapies anti-cancéreuses.

Chez les mammifères, les facteurs de transcription de la famille Myc stimulent la croissance cellulaire, inhibent la différenciation terminale et peuvent également induire l'apoptose. L'expression des facteurs Myc doit donc être contrôlée de manière très précise. Myc est considéré comme un puissant oncogène dont la dérégulation promouvoit la tumorigenèse. De nombreux cancers humains, comme le lymphome de Burkitt's, sont caractérisés par des niveaux anormalement élevés de c-Myc et représentent des néoplasmes agressifs et très peu différenciés [662, 663 , 664]. L'oncoprotéine c-Myc stimule donc la prolifération cellulaire mais possède aussi des capacités pro-apoptotiques [665 , 666]. Un couplage fonctionnel entre les voies de prolifération et de mort apoptotique fait en sorte que l'activation du cycle cellulaire sensibilise en même temps les cellules à l'apoptose. Le destin de la cellule est alors grandement influencée par l'expression relative de facteurs pro-survie versus pro-apoptose. Il a été démontré que c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose après plusieurs stimuli de mort, dont l'hypoxie, le dommage à l'ADN, la déplétion des facteurs de croissance et l'activation de certains récepteurs de mort cellulaire [664]. L'apoptose induite par c-Myc est associée à l'activation de Bax et de la voie mitochondriale [667]. L'activation indirecte de p53 contribue aussi à l'apoptose induite par c-Myc. Le facteur c-Myc induit l'expression du supresseur de tumeur ARF (*alternative reading frame*), qui inhibe Mdm2 et stabilise ainsi la protéine p53 [668]. Le type de cellules, l'environnement tissulaire et la présence de molécules pro- et anti-

apoptotiques sont tous des facteurs déterminants dans la réponse cellulaire médiée par l'activation de c-Myc.

1.5 Les percées thérapeutiques dans le domaine de l'apoptose et du cancer

L'induction de la mort cellulaire programmée est depuis longtemps une cible thérapeutique dans la bataille médicale contre le cancer. Les agents chimiothérapeutiques classiques tels que les agents alkylants (ex: les nitrosurés), la cisplatine, les antimétabolites (ex: methotrexate, 5-fluorouracil), les dérivés des plantes tels que la vinblastine, l'étoposide, les camptothécines (ex: topotecan, irinotecan) et les taxanes (ex: paclitaxel), les agents hormonaux (ex: androgènes, estrogènes, adrénocorticoïdes) et les inhibiteurs d'hormones (ex: l'anti-estrogène tamoxifène, l'anti-androgène flutamide), ainsi que les antibiotiques anthracyclines (ex: doxorubicine, daunorubicine), mitomycine, bleomycine et autres agents divers (ex: hydroxyurée, dérivés de l'acide rétinoïque) sont utilisés couramment en thérapie anti-cancéreuse. Les traitements de chimiothérapie sont aussi souvent combinés à la radiothérapie, dans le but d'optimiser l'effet anti-tumoral. La très grande majorité de ces agents agissent en induisant une lésion génotoxique qui enclenche les voies d'apoptose et résulte, idéalement, en l'éradication des cellules cancéreuses. Outre la chimiothérapie classique, les dernières années ont vu l'émergence de nouvelles thérapies anti-tumorales ayant pour cible des molécules spécifiques, impliquées dans le contrôle et dans l'exécution des diverses voies apoptotiques [669, 670].

Parmi les percées thérapeutiques actuelles, plusieurs essais cliniques ayant comme objectif d'inhiber l'expression ou l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont remporté un succès prometteur. Par exemple, une approche utilisant un oligonucléotide antisens dirigé contre Bcl-2 est présentement en phase clinique III dans le traitement de la leucémie lymphocytaire chronique et myélocytaire aiguë, du myélome multiple, du mélanome malin et du cancer du poumon de type « *non-small cell* » [671]. Un antisens bi-spécifique contre Bcl-2 et Bcl-xL s'est aussi avéré prometteur en facilitant l'apoptose de certaines cellules tumorales surexprimant Bcl-2 et Bcl-xL [672, 673]. Un antisens ayant comme cible l'anti-apoptotique Mcl-1 a aussi fait l'objet d'une stratégie thérapeutique pour chimio-sensibiliser les cellules de myélome [674]. Un autre type d'approche est de développer de petites molécules qui miment le domaine BH3 des protéines Bcl-2-like, dans le but d'antagoniser l'activité des anti-apoptotiques tels que Bcl-

2 et Bcl-xL et/ou de promouvoir l'activation des pro-apoptotiques comme Bax et Bak, stimulant ainsi la voie apoptotique mitochondriale [675].

Une autre stratégie est de cibler directement la mitochondrie pour provoquer la perméabilisation, le relargage de cytochrome c et l'apoptose. Par exemple, le PK11195 est un ligand du récepteur à benzodiazépine, un constituant du mPTP, qui n'est pas toxique par lui-même et qui facilite l'apoptose induite par plusieurs agents incluant les glucocorticoïdes, étoposide, doxorubicine et rayons γ [676]. La sélectivité du PK11195 envers les cellules tumorales reste à déterminer. Basé sur les observations que certaines séquences peptidiques altèrent les membranes mitochondriales et que d'autres séquences peptidiques réagissent sélectivement avec les cellules endothéliales associées aux tumeurs, de petits peptides synthétiques bi-fonctionnels ont été élaborés. Ces peptides contiennent un domaine qui confère une localisation dans les vaisseaux sanguins tumoraux et un second domaine qui perturbe les mitochondries. Des activités anti-tumorales intéressantes pour ces peptides bi-spécifiques ont été obtenues chez les animaux [677-679].

La voie des récepteurs de mort cellulaire constitue aussi une cible thérapeutique depuis plusieurs années. Le TNF- α a fait l'objet de nombreux essais cliniques mais son administration systémique provoque des effets secondaires trop néfastes, tels que l'hypotension et la dysfonction du foie. Par contre, le TNF- α s'est avéré moins toxique et quand même efficace lorsqu'administré localement ou en combinaison avec la chimiothérapie [680, 681]. Les agonistes du système Fas causent aussi une importante toxicité hépatique [682]. Cette toxicité est évidemment due au fait que les récepteurs Fas et TNF sont exprimés par les cellules tumorales, mais aussi par les cellules saines, particulièrement dans les hépatocytes. L'expression des récepteurs DR4 et DR5 est plus sélective envers les cellules tumorales, faisant de ces récepteurs des cibles prometteuses [683, 684]. L'administration du ligand Trail chez des animaux a effectivement démontré que l'activation de DR4 et DR5 provoque la destruction des cellules tumorales sans toxicité importante [685, 686]. D'autres évidences ont toutefois reporté que Trail semble provoquer l'apoptose des hépatocytes chez l'humain [687].

L'expression aberrante des molécules inhibitrices de caspases IAPs pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale [688, 689] et l'inhibition des IAPs par des oligonucléotides antisens a aussi fait l'objet d'investigations thérapeutiques [688]. Par contre, la difficulté d'utiliser des oligonucléotides comme agents thérapeutiques provient

de leur courte demi-vie et de la nécessité de les administrer de manière intraveineuse, ce qui peut causer certaines toxicités [669].

La voie PI3K-Akt, associée à des fonctions pro-survie, représente aussi un système potentiel pour des interventions thérapeutiques. Pour des raisons pharmacologiques, les sites actifs des enzymes sont relativement faciles à cibler avec des molécules chimiques. Des inhibiteurs de la PI3K, tels que wortmannin et LY 294004, administrés seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie classique se sont avérés efficaces dans l'éradication de cellules tumorales [670]. Un dérivé de la geldanamycine, le 17-AAG (*17-allylaminogeldanamycin*), qui bloque la voie Akt est présentement en phase clinique I et semble avoir une bonne sélectivité envers les cellules tumorales [670, 690]. Des inhibiteurs de la tyrosine kinase Bcr/Abl, activée par translocation chromosomique dans la leucémie CML (*chronic myelogenous leukemia*), sont capables d'induire l'apoptose des cellules transformées par Bcr/Abl [691]. Des investigations cliniques ont démontré un taux de réponse de 96 % chez les patients CML traités avec un de ces inhibiteurs, le STI571 [692-694]. Récemment, un nouvel inhibiteur de Bcr/Abl, le AP23464, a été découvert et semble lui aussi prometteur dans le traitement des CML [695].

Finalement, il existe une panoplie d'essais thérapeutiques qui ont comme objectif d'inactiver divers oncogènes, comme par exemple c-Myc et Ras. D'autres approches visent plutôt l'inhibition de facteurs de transcription qui possèdent des fonctions anti-apoptotiques, tels que NF- κ B et AP1 [670, 696, 697]. Toutefois, la mise au point de ces stratégies requière de la prudence car des activités pro-apoptotiques ont aussi été attribuées à la majorité de ces cibles thérapeutiques et plusieurs de ces facteurs sont essentiels à divers processus physiologiques normaux.

1.6 Objectif du projet de doctorat

La protéine supresseur de tumeurs p53 prévient l'accumulation des altérations génomiques et joue donc un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du génome. En réponse aux traitements anti-cancéreux de radiothérapie et de chimiothérapie, la protéine p53 est normalement activée et est impliquée dans les arrêts du cycle cellulaire, dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans l'activation des voies apoptotiques. L'apoptose médiée par p53 est relativement bien caractérisée grâce aux nombreuses études qui ont permis de mieux comprendre le rôle de p53, dont la transactivation de gènes pro-

apoptotiques demeure une fonction majeure (*voir section: 1.4.2.1 - Le facteur p53*). Toutefois, la protéine p53 est mutée ou défectueuse dans plus de la moitié des néoplasies humaines et ces tumeurs p53-déficientes sont difficilement ciblées par les thérapies anticancéreuses actuelles [591, 592]. Peu d'études se sont consacrées à la caractérisation des voies apoptotiques p53-indépendantes induites par un stress génotoxique et les mécanismes d'activation de l'apoptose en l'absence du facteur p53 demeurent actuellement peu compris.

De façon générale, mon projet de doctorat concerne l'étude des voies apoptotiques p53-indépendantes, suite à l'induction d'un dommage à l'ADN par un agent chimiothérapeutique dans des lignées cellulaires tumorales humaines, déficientes pour la protéine p53. Mon projet se divise en 3 objectifs principaux. Dans la première partie (chapitre 2), nous avons déterminé si une voie apoptotique impliquant les lysosomes est activée suite à l'induction du dommage à l'ADN. La deuxième partie (chapitre 3) s'intéresse aux mécanismes d'activation de la voie mitochondriale p53-indépendante induite par le dommage génotoxique, en étudiant particulièrement les modes d'action des protéines de la famille Bcl-2 dans un contexte cellulaire p53-déficient. La troisième partie (chapitre 4) porte sur les facteurs de transcription qui pourraient être impliqués dans l'activation des voies apoptotiques p53-indépendantes après l'induction du dommage à l'ADN. Finalement, en annexe, nous avons également étudié l'effet de la surexpression de deux nouveaux membres de la famille Bcl-2, Bcl-xES (annexe II) et Bax- σ (annexe III), deux isoformes clonées dans notre laboratoire, dans un contexte de cellules apoptotiques p53-déficientes.

Comme modèles expérimentaux, nous avons utilisé deux lignées cellulaires tumorales humaines p53-déficientes: les U937, des cellules monocyte-like qui ont des délétions aux deux allèles du gène *p53* [591], et les Namalwa, des cellules de lymphome B (lymphome de Burkitt's) qui présentent une mutation non-synonyme sur chacun des allèles de *p53* [698]. Ces lignées cellulaires p53-déficientes demeurent très sensibles à l'action de plusieurs agents inducteurs de dommage génotoxique et meurent rapidement par apoptose après l'induction d'une lésion génotoxique [78, 699-701]. Les lignées cellulaires Namalwa et U937 constituent donc des modèles intéressants pour l'étude des voies apoptotiques p53-indépendantes.

Dans nos études principales présentées dans les chapitres 2, 3 et 4, les cellules U937 et Namalwa sont d'abord traitées avec l'agent camptothécine (CPT), un inhibiteur de

la topoisomérase I. Nous étudions ensuite les caractéristiques des voies apoptotiques p53-indépendantes activées par la camptothécine, par rapport aux 3 objectifs principaux énumérés précédemment.

Dans nos études secondaires présentées dans les annexes II et III, les nouvelles protéines Bcl-xES et Bax- σ ont d'abord été transfectées dans la lignée cellulaire Namalwa et les effets de leur surexpression sont analysés suite à une variété de stimuli apoptotiques, dont le traitement avec la camptothécine.

CHAPITRE 2.

**Caspase-, sphingosine- and mitochondrial dysfunction-dependent
mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation
in DNA damage-induced apoptosis**

Claudie Paquet, Alain-Théophile Sané, Myriam Beauchemin and Richard Bertrand

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

Running title: Camptothecin-mediated small scale lysosomal leakage

*Key words: Camptothecin; lysosome; mitochondria; caspase; cathepsin; sphingosine;
apoptosis.*

Article soumis pour publication à:

Oncogene, septembre 2004

** C. Paquet est responsable d'environ 90 % de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. A.-T. Sané est responsable des travaux présentés à la fig.3 C et D, M. Beauchemin a contribué aux travaux présentés à la fig.5 et R. Bertrand a supervisé l'ensemble de l'étude.*



Claudie Paquet



Dr. Richard Bertrand
directeur de recherche

Résumé:

L'apoptose induite par un dommage à l'ADN est généralement associée à la dysfonction mitochondriale, le relargage de cytochrome c, l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN. Une nouvelle voie apoptotique impliquant les lysosomes a récemment été mise en évidence. Les lysosomes participent à l'apoptose induite par certains stimuli cytotoxiques, particulièrement lors d'un stress oxydatif. Cette voie apoptotique lysosomiale est caractérisée par une rupture partielle de la membrane du lysosome, causant une fuite du contenu lysosomal dans le cytosol. Il en résulte le relargage cytosolique de protéases lysosomiales, dont les cathepsines, qui peuvent contribuer à l'apoptose. Dans cet article, nous démontrons qu'une voie lysosomiale est rapidement activée lors de l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN. Dans les lignées cellulaires tumorales humaines p53-déficientes U937 et Namalwa traitées avec la camptothécine (CPT), nous avons observé une fuite des lysosomes accompagnée de l'activation de la cathepsine-B, qui surviennent simultanément avec la chute du $\Delta\Psi_m$ des mitochondries et l'activation des caspases. L'inhibition du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) avec la cyclosporine A et l'acide bongkreki diminue à la fois la perte du $\Delta\Psi_m$ et la perméabilisation des lysosomes, suggérant que la rupture lysosomiale nécessite préalablement la perméabilisation des mitochondries. La surexpression de Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique connue pour préserver l'intégrité mitochondriale, protège les deux organites, suggérant l'existence d'une signalisation entre mitochondries et lysosomes. Toutefois, nous n'avons obtenu aucune évidence indiquant que des protéines Bcl-2-like transloquent aux lysosomes en cours d'apoptose. L'activité des caspases, dont la caspase-2, est absolument essentielle à la perméabilisation des lysosomes et des mitochondries et l'activité de la cathepsine-B contribue à la propagation de l'apoptose induite par CPT. Finalement, nous démontrons qu'une diminution des niveaux de sphingosine intracellulaires protège à la fois les lysosomes et les mitochondries, et que l'accumulation de sphingosine après le traitement de CPT corrèle avec la perméabilisation des deux organites. Notre étude démontre la participation d'une voie lysosomiale dans l'apoptose après dommage à l'ADN. Nos résultats suggèrent que l'activation des caspases, les niveaux de sphingosine et la dysfonction mitochondriale pourraient faire partie des mécanismes par lesquels un dommage génotoxique mène à la rupture lysosomiale.

SUMMARY

A lysosomal pathway, characterized by partial rupture of lysosomal membranes and activation of cathepsin B, is rapidly activated during camptothecin (CPT)-induced apoptosis in human U937 and Namalwa cancer cells. These lysosomal events occur simultaneously with mitochondrial permeabilization and caspase activation after CPT treatment. In U937 cells, blocking mitochondrial permeability transition pore with cyclosporin A and bongkreikic acid reduces both mitochondrial and lysosomal permeabilization, suggesting that lysosomal rupture may first necessitate mitochondrial disruption. Overexpressing bcl-xL, an anti-apoptotic protein known to preserve mitochondrial functions, also impedes lysosomal leakage and mitochondrial disruption, again indicating signaling between the 2 organelles. However, no evidence was obtained of bcl-2-like proteins targeting lysosomes. Caspase activities, including caspase-2L, are absolutely required for lysosomal and mitochondrial disruption, and lysosomal cathepsin B actively participates in apoptosis propagation after CPT treatment. Lowering intracellular sphingosine levels by inhibition of acidic ceramidase protects both organelles, while sphingosine accumulation after CPT correlates with lysosomal and mitochondrial permeabilization in U937 cells. Our study provides conclusive evidence for the participation of a lysosomal pathway during DNA damage-induced cell death. Our data suggests that caspase activation, sphingosine levels and mitochondrial disruption may represent mechanisms by which DNA damage leads to lysosomal rupture, and that lysosomal cathepsin B could participate in apoptosis propagation after CPT treatment.

INTRODUCTION

Apoptosis is an evolutionary well-conserved, programmed cell death process that plays a crucial role in normal development, in maintaining tissue homeostasis, and in providing good immune function throughout life. Defects or anomalies in the apoptotic program are involved in the pathogenesis of multiple diseases, including cancer (Rudin & Thompson, 1997). In the past decade, great efforts have been made to better understand and elucidate the complex molecular pathways leading to cell death. As a site of convergence for multiple death-inducing stimuli, the mitochondria is a finely-regulated decision centre that controls life and death by releasing apoptogenic factors, such as cytochrome c, in cytosol (Kluck et al., 1997). While the mitochondrial pathway of apoptosis has been studied extensively for many years, a new pathway involving lysosomes has emerged recently.

Previously, lysosomes and their hydrolytic enzymes were almost exclusively associated with necrosis and autophagic cell death (Uchiyama, 2001). Today, lysosomes are no longer seen uniquely as scavenger compartments, but also as active players in apoptosis. The lysosomal pathway of apoptosis involves partial permeabilization of lysosomes, possibly due to incomplete rupture or destabilization of the lysosomal membrane, often referred to as small scale lysosomal leakage (ssALL), and subsequent release of lysosomal proteases into the cytosol (Brunk et al., 2001; Guicciardi et al., 2004; Turk et al., 2002). The most abundant lysosomal enzymes belong to the cathepsin family of papain-like cystein protease, and include cathepsins B and L as well as cathepsin D, the sole aspartic protease. Cathepsins B, D and L have been implicated in apoptosis after a variety of death stimuli, but the precise mechanisms of ssALL and cathepsin relocation and activation during

apoptosis are currently unknown (Brunk et al., 2001; Guicciardi et al., 2004; Turk et al., 2002).

To date, lysosomal rupture and/or cathepsin activation have been linked to apoptosis after various insults, including oxidative stress (Brunk & Svensson, 1999; Kagedal et al., 2001a), lysosomotropic photosensitizer agents (Boya et al., 2003a; Brunk et al., 1997), serum withdrawal (Brunk & Svensson, 1999), Fas and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ligation (Guicciardi et al., 2000), increased sphingosine (Kagedal et al., 2001b) and endogenous ceramide levels (Heinrich et al., 1999), DNA damage (Hishita et al., 2001), and microtubule-stabilizing agents (Broker et al., 2004). While some models of apoptosis appear to be dependent exclusively on the cathepsins and do not need caspase activation (Foghsgaard et al., 2001), others involve both cathepsins and caspases (Guicciardi et al., 2000; Hishita et al., 2001; Ishisaka et al., 1998; Katunuma et al., 2001). However, the direct activation of caspases by cathepsins is unlikely because the apoptotic caspases are rather poor substrates for most cathepsins (Stoka et al., 2001); hence, the possible existence of intermediary molecules. Good candidates are the lysoapoptases, a new class of proteases that are activated by cathepsins within the lysosomal compartment, then translocated to cytosol where they can process and activate procaspase-3 (Katunuma et al., 2001). Another aspirant is the bcl-2 family member Bid, which is apparently cleaved by lysosomal proteases after permeabilization of lysosomes by lysosomotropic agents, producing a truncated Bid (tBid) fragment which may translocate to the mitochondria and induce cytochrome c release, thus connecting lysosomal disruption to the mitochondrial pathway of apoptosis (Stoka et al., 2001). Though lysosomal rupture and cytosolic translocation/activation of the cathepsins occurred before cytochrome c release in most studies, there is still some uncertainty and surely much to elucidate concerning the molecular connections between the

lysosomal and mitochondrial apoptotic pathways. However, the amplitude of lysosomal damage may determine the type of cell death (apoptosis vs necrosis). Indeed, intense disruption of lysosomes with the release of lysosomal enzymes in large quantities into the cytosol will lead to necrosis, while partial lysosomal permeabilization or ssALL will participate in apoptotic death (Brunk, 2000; Bursch, 2001; Turk et al., 2002).

Little is known about the molecular mechanisms responsible for lysosomal permeabilization. Recently, it was proposed that sphingosine, a metabolite of the sphingomyelin and ceramide pathway, was directly involved in ssALL. Because of its long hydrophobic tail and polar head containing a proton-trapping amino group, sphingosine is selectively attracted by the acidic lysosomal compartment where it could act as a detergent to permeabilize the membrane (Kagedal et al., 2001b). In support of this hypothesis, low-dose sphingosine has been shown to provoke ssALL and apoptosis, while high-concentration sphingosine resulted in intensive lysosomal rupture and necrosis (Brunk, 2000; Kagedal et al., 2001b). More recently, the demonstration that sphingosine kinase-1, the enzyme responsible for the conversion of sphingosine to sphingosine-1-phosphate, was down-regulated after the action of several DNA-damaging agents (Taha et al., 2004) suggested a plausible mechanism by which DNA damage could lead to increased intracellular sphingosine that causes ssALL.

In this study, we investigated the molecular connections between the lysosomal and well-described mitochondrial apoptotic pathways after DNA damage. It has been shown previously, in our laboratory and others, that a variety of human cancer cells rapidly undergo apoptosis involving the mitochondrial pathway after DNA damage induced by CPT (Paquet et al., 2004; Schmitt et al., 1998a; Schmitt et al., 2004; Schmitt et al., 1998b). Using 2 of these cell lines, here we report the rapid

disruption of the lysosomal cellular compartment with subsequent ss Δ LL and cathepsin B activation after CPT treatment. These lysosomal events occur simultaneously with $\downarrow\Delta\Psi_m$ and caspase-3-like activation. Our data suggests that $\downarrow\Delta\Psi_m$, caspase activation and sphingosine level modulation may represent mechanisms by which DNA damage leads to ss Δ LL, and that lysosomal cathepsin B could actively participate in apoptosis propagation after CPT treatment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The radioactive precursors [2-¹⁴C]-thymidine (59 mCi/mmol) and [³H]acetic anhydride (specific activity: 130 mCi/mmol) were obtained from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA) and MP Biomedicals Inc. (Irvine, CA), respectively. [³H]acetic anhydride was dissolved in water-free benzene at a concentration of 35 mM and stored at -80°C. CPT, metrizamide, propidium iodide (PI), 4-methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide and N-oleoylethanolamine (NOE) were procured from the Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO). Acridine orange (AO) and 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanideiodide (JC-1) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Cyclosporin A (CsA) was from Novartis Pharma Canada Inc. Bongkreic acid (BkA), dihydroethidium (DHE), 2,3-dimethoxy-1-naphthoquinone (DMNQ), the fluorogenic peptide derivatives acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Z-RR-AMC) were acquired from Calbiochem-Novobiochem Corporation (San Diego, CA). The peptide derivatives benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) and benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-diazomethylketone (Z-FA-DMK) were from Bachem (Torrance, CA). Percoll and Amplify staining reagent were obtained from Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). Silica gel 60 thin layer chromatography (TLC) plates were from Whatman Inc. (Clifton, NJ). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from the Sigma-Aldrich Company, ICN BioMedicals or other local sources.

Cell culture, drug treatment and DNA labeling. The human B lymphoma Namalwa cell line and the human monocyte-like U937 cell line, obtained from the

American Type Culture Collection (Manassas, VA), were 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). The derivation of stable Namalwa and U937 cells expressing HA-Bcl-xL has been described previously (Schmitt et al., 1998a; Schmitt et al., 2000; Schmitt et al., 1998b). To obtain the episomal pCep4-U6-siRNA expression vector, first the episomal pCep4 vector (Invitrogen, San Diego, CA) was digested at *Sal-I* to remove sequences of the CMV promotor, multiple cloning site and SV40 polyadenylation signal. The U6 promotor and *Bam-HI/Hind-III* cloning site sequences of pSilencer 2.0-U6 vector (Ambion, Austin TX) was amplified by PCR using specific adapter primers containing *Sal-I* sequences. The amplified fragment was first cloned in pCR2.1-Topo vector (TA cloning system; Invitrogen), sequenced and then subcloned at the *Sal-I* restriction sites of the modified pCep4 vector. Then, caspase-2 hairpin siRNA-encoding oligonucleotides (sense, GATCCCACAGCTGTTGTTGAGCGAATTCAAGAGATTCGCTCAACAACAGC TGTTTTTTTTGGAAA; antisense AGCTTTTCCAAAAAACAGCTGTTGTTGAGCGAATCTCTTGAATT CGCTCAACAACAGC TGTGG) were annealed and ligated into *Bam-HI/Hind-III* restriction sites of pCep4-U6-siRNA expression vector to obtain pCep4-U6-siRNA-caspase-2 vector. Purified pCep4-U6-siRNA-caspase-2 construct was transfected in Namalwa cells by electroporation at 0.27 kVolts (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA). Transfected cells were grown under hygromycin B1 selection at 250 µg/ml, and 1.0 mg/ml for 2 to 3 months to obtain stable lines before performing the experiments. Exponentially-growing cells were used in all experiments at a concentration of 5 x 10⁵ cells/ml. They were treated with CPT at a concentration of 1.0 µM for 30 min,

and then grown in drug-free medium. When indicated, the cells were pretreated with one of the following inhibitors: 50 $\mu\text{g/ml}$ CsA, 50 μM BkA, 100 μM Z-VAD-FMK, 10 μM , Z-FA-DMK or 100 μM NOE for 1 h before CPT treatment, maintained during CPT treatment, and added to culture media after CPT treatment. For DNA labeling, the cells were grown with [^{14}C]-thymidine (0.02 $\mu\text{Ci/ml}$) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to drug treatment (Bertrand et al., 1991).

Assessment of $\downarrow\Delta\Psi\text{m}$ and ss ΔLL . $\downarrow\Delta\Psi\text{m}$ was assessed by JC-1 staining. At the indicated times (h) after CPT treatment, 1×10^6 cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 in complete culture medium for 15 min at room temperature, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 500 μl of PBS and submitted to flow cytometry analysis. For the assessment of ss ΔLL , 1×10^6 cells were incubated with 1 μM AO in complete culture medium for 15 min at 37°C. After incubation, the cells were washed twice and resuspended in 500 μl of fresh culture medium before analysis by flow cytometry. Loss of JC-1 orange fluorescence was measured with the FL2 channel, and loss of AO red fluorescence with the FL3 channel of a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer. At least 10,000 cells per sample were acquired in histograms, and the results are expressed as the percentage of total cells presenting $\downarrow\Delta\Psi\text{m}$ or ss ΔLL .

Oxidative stress detection. Superoxide anion production served as a parameter of cellular oxidative stress. Cells were incubated with 5 μM DHE for 1 h at 37°C, then treated with CPT or 100 μM DMNQ, as a positive control for superoxide anion generation. At the indicated times (h) after CPT or DMNQ treatment, 1×10^6 cells

were washed twice, resuspended in 500 μ l PBS, then analyzed by flow cytometry with recording on the FL2 channel of the Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer.

Analysis of DNA fragmentation. The kinetics of DNA fragmentation were monitored and quantitated by DNA filter elution assays (Bertrand et al., 1991). The results are expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in control (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 control cells, respectively (Bertrand et al., 1991). DNA content was also measured by flow cytometry after PI staining with recording on the FL2 channel of the Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer. The results are expressed as the percentage of cells presenting hypoploid DNA content (sub-G1 peak).

Enzymatic assays. For the measurement of caspase-3-like activities, cellular extracts were prepared in lysis buffer containing 100 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% (v/v) glycerol and 0.3% (v/v) Igepal. The samples were then centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C, and the supernatants stored at -80°C. For the measurement of cathepsin B activity, cellular pellets were lysed in 0.1 % (v/v) Triton X-100 buffer, then centrifuged and the supernatants stored at -80°C. Protein aliquots (100 μ g) were incubated with 200 μ M of the caspase-3-like substrate Ac-DEVD-AMC or with 20 μ M of the cathepsin B substrate Z-RR-AMC, in reaction assay mixtures (500 μ l) containing 100 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT and 1 mM EDTA for caspase-3-like activity, and 0.4 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) and 4 mM EDTA for cathepsin B activity. For the measurement of β -hexosaminidase activity, lysosomal and mitochondrial-enriched fractions were lysed in 1% Triton X-100 buffer at 4°C for

30 min, then centrifuged. 20 μ g-protein aliquots were immediately assessed for β -hexosaminidase activity in a reaction mixture containing 1.5 mM of 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide in 500 μ l of 400 mM acetate buffer (pH 4.4) and 250 mM sucrose. Cleavage of the fluorogenic peptides was monitored continuously at 37°C in a dual luminescence fluorometer (LS 50B, Perkin Elmer) at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm for both Ac-DEVD-AMC and Z-RR-AMC substrates, and at excitation and emission wavelength of 355 nm and 460 nm, respectively, for the 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide- β -hexosaminidase substrate. Enzymatic activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg.

Measurement of intracellular sphingosine levels. Cellular concentrations of sphingosine were measured according to Ohta et al. (Ohta et al., 1994). The assay is based on quantitative conversion of sphingosine to [3 H]*N*-acetylsphingosine after acylation with [3 H]acetic anhydride. Stock solution of [3 H]acetic anhydride was diluted to 5 mM with chloroform prior to use. Briefly, 1×10^7 cells were harvested at the indicated times (h) after CPT treatment, washed twice in ice-cold PBS and resuspended in 0.1 ml PBS. After the addition of 3 ml of chloroform:methanol (1:2, v/v), the samples were mixed thoroughly and sonicated for 1 min. Phases were separated by adding 2 ml each of chloroform and 1M NaCl. After centrifugation at 1,000 x g for 1 min, the upper phase was discarded, and 3 ml of 0.2 N NaOH in methanol was added to the lower chloroform phase. After incubation for 1 h at room temperature, the phases were separated by adding 3 ml each of chloroform and 1M NaCl. After washing with chloroform:methanol:water (3:48:47, v/v/v), samples from the lower chloroform phase were evaporated under N_2 . Dried samples were dissolved in 60 μ l of 0.02 N NaOH in methanol:5 mM [3 H]acetic anhydride (1:4, v/v), and

incubated for 1 h at 37°C for acylation to proceed. The remaining anhydride was hydrolyzed by the addition of 0.2 N NaOH in methanol and incubation at room temperature for 1 h. [³H]*N*-acetylsphingosine was then extracted by the addition of 0.98 ml of chloroform, 0.78 ml of methanol and 0.9 ml of 1 M NaCl. After washing with chloroform:methanol:water (3:48:47, v/v/v), samples from the lower chloroform phase were evaporated under speed vacuum and redissolved in 40 μl of chloroform:methanol (4:1, v/v). They were spotted on TLC Silica gel 60 plates with chloroform:methanol:7 N NH₄OH:water (80:20:0.5:0.5, v/v/v/v) as developing solvent, air dried, soaked for 1 min in Amplify staining reagent, air dried and exposed to Hyperfilm™ MP (Amersham Biosciences) at -80°C. Radioactive spots corresponding to [³H]*N*-acetylsphingosine were scraped and counted by liquid scintillation spectrometry.

Subcellular fractionation. For the isolation of mitochondria and lysosomes, a metrizamide-Percoll density gradient protocol, modified from Storrie and Madden (Storrie & Madden, 1990), was followed. At the indicated times (h) after CPT treatment, the cells were washed twice in PBS and swelled in deionized water for 4 min on ice. The samples were then adjusted to 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4) and 1 mM EDTA. The cells were disrupted by passing the samples 30-fold through a 26G 3/8 needle adapted to a syringe, and subsequently centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4°C to pellet unbroken cells and nuclei. The supernatants were layered on top of the first gradient consisting, from bottom to top, of 2 ml of 35 (w/v) metrizamide, 2 ml of 17% (w/v) metrizamide and 5 ml of 6% (v/v) Percoll. The metrizamide and Percoll solutions were made in 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4) and 1 mM EDTA (isotonic buffer). After centrifugation at 50,500 x g for 1 h at 4°C, a set of two discrete bands

appeared at the interfaces 6 % Percoll/17% metrizamide (upper band) and 17/35% metrizamide (lower band). The lower band contains highly pure mitochondria and was used as the mitochondria-enriched fraction. The upper band contains lysosomes and smaller mitochondria that were further separated by the second gradient. This interface was collected and adjusted to 35% metrizamide by mixing with a 80% (w/v) metrizamide solution. The sample was then placed at the bottom of the second gradient and overlaid with 2 ml of 17% metrizamide and 2 ml of 5% metrizamide. The tube was filled to the top with the isotonic buffer, and centrifuged at 50,500 x g for 1 h at 4°C. Two distinct bands were observed; the upper one, at the 5/17% metrizamide interface, contained lysosomes and was used as the lysosome-enriched fraction. The mitochondria- and lysosome-enriched fractions were then pelleted by diluting the interface in the largest possible volume of isotonic buffer and centrifuged at 53,000 x g for 1 h at 4°C. For enzymatic assays, the mitochondria and lysosomes pellets were lysed in 1% Triton X-100 for 30 min at 4°C, centrifuged, and the supernatants assessed for β -hexosaminidase activity. For immunoblot experiments, the pellets of mitochondria and lysosomes were lysed in buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 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 analyzed by immunoblot.

Immunoblot analysis. To prepare total protein extracts, cells were washed twice in PBS and homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate and a cocktail of protease inhibitors

(Complete[™], Roche Molecular Biochemicals), for 30 min at 4°C. After centrifugation, the supernatants were collected as total protein extracts. For immunoblot analysis, 100 µg of total protein extract and 20 µg of the mitochondria- and lysosome-enriched fractions were used. The primary antibodies in this study included anti-HA mouse monoclonal antibody (clone 12CA5, Roche Molecular Biochemicals), anti-caspase-2 mouse monoclonal (clone G310-148, BD Biosciences), anti-β-actin mouse monoclonal antibody (clone AC-40, Sigma), anti-Porin 31 HL mouse monoclonal antibody (clone 89-173/045, Calbiochem-Novobiochem Corporation), anti-Bax rabbit polyclonal antibody (n-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bak rabbit polyclonal antibody (06-536, Upstate Biotechnology), anti-Bik rabbit polyclonal antibody (FL-160, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bim rabbit polyclonal antibody (202000, Calbiochem), anti-Bcl-2 mouse monoclonal antibody (100, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bid rabbit polyclonal antibody (2002, Cell Signaling Technology) and anti-lamin B mouse monoclonal antibody (clone 101-B7, Oncogene Research Products). The secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse Ig and donkey anti-rabbit Ig (Amersham Pharmacia Biotech).

RESULTS

Lysosomes are disrupted after CPT treatment in U937 and Namalwa cells.

Human monocytic-like U937 and B lymphoma Namalwa cells, two p53-defective cell lines, are highly sensitive to DNA damage and rapidly die by apoptosis after short treatment with the DNA-damaging drug CPT, a DNA topoisomerase I inhibitor. The apoptotic death of these cells is associated with quick involvement of a mitochondrial pathway, within 2 to 3 h after drug treatment, that is linked with rapid translocation to mitochondria of multiple pro-apoptotic proteins of the bcl-2 family, cytochrome c release, Apaf-1 oligomerization, caspase activation, DNA fragmentation, and typical morphological changes of cell death (Paquet et al., 2004; Schmitt et al., 1998a; Schmitt et al., 2004; Schmitt et al., 1998b). $\downarrow\Delta\Psi_m$, activation of caspase-3-like enzymes, DNA fragmentation and sub-G1 cell populations rapidly appear in CPT-treated U937 (Fig. 1A) and Namalwa cells (Fig. 1B). The magnitude of caspase activation and DNA fragmentation, and the appearance of sub-G1 cells are similar between both cell types, while the percentage of cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ is much greater in U937 cells, about 40% after 4 h, compared to a peak value of approximately 20% for Namalwa cells (Fig. 1A, 1B). Both ssALL and cathepsin B activation also occur within 2 to 3 h after CPT treatment in these cell lines (Fig. 1C, 1D). Strikingly, the kinetics of ssALL and cathepsin B activation occurred simultaneously to those of $\downarrow\Delta\Psi_m$ and caspase activation. Because lysosomal disruption has been observed in oxidative stress-induced apoptosis, we evaluated the possibility that oxidative stress was generated during CPT-induced cell death. Thus, cells were incubated DHE, a compound that is converted to ethidium by superoxide anions, then intercalates into DNA where it emits red fluorescence. Four to 6 h after treatment, neither U937 (Fig. 1E) nor Namalwa (Fig. 1F) cells showed the presence

of superoxide anions after CPT. Cells exposed to the quinone DMNQ served as positive controls. These results show that lysosomes undergo disruption associated with ss Δ LL and cathepsin B activation simultaneously with $\downarrow\Delta\Psi_m$ and caspase activation by CPT. These events are independent of oxidative stress after CPT treatment.

Blockage of the mitochondria permeability transition pores (mPTP) partially protects from CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937 cells.

Permeabilization of the outer mitochondrial membrane may be caused by the opening of mPTP or megachannels. The major constituents of mPTP are VDAC1, the adenine nucleotide translocator (ANT), the peripheral benzodiazepine receptor and the mitochondrial matrix enzyme cyclophilin D. As a result of mPTP opening, $\Delta\Psi_m$ is dissipated, and apoptogenic factors, notably cytochrome c, are released in the cytosol. mPTP blockage has been shown to inhibit apoptosis in several models (Marchetti et al., 1996; Zamzami et al., 1996a; Zamzami et al., 1996b). To impede mPTP opening, we incubated CPT-treated U937 and Namalwa cells with the mPTP inhibitors CsA and BkA. CsA inhibits the enzyme cyclophilin D which impedes ANT function, while BkA directly inhibits ANT. Obstructing mPTP with CsA (Fig. 2A) or BkA (Fig. 2B) reduced both CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937 cells. The protection conferred by CsA was significant during the first 6 h of CPT-induced death (Fig. 2A), while BkA significantly reduced mitochondrial and lysosomal permeabilization over the first 4 h of CPT action (Fig. 2B). In contrast, the mitochondrial and lysosomal disruption observed after CPT treatment in Namalwa cells was not affected by blocking mPTP with CsA or BkA (*data not shown*). The similar reductions in the percentage of total cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL after

protection of the mitochondria with mPTP inhibitors suggests that lysosomal leakage depends, in part, on mitochondrial disruption in U937 cells.

Bcl-xL prevents $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL after CPT treatment in U937 and Namalwa cells.

Overexpressing anti-apoptotic bcl-2 protein has been shown to protect from lysosomal rupture in oxidative stress-induced apoptosis (Zhao et al., 2000), while bcl-2 overexpression is not sufficient to impede ss Δ LL induced by the lysosomotropic agent ciprofloxacin (Boya et al., 2003a). We previously reported that overexpression of the anti-apoptotic bcl-2 family member bcl-xL, in Namalwa and U937 cells (Fig. 2C), completely abolished for at least 48 h (Namalwa cells) or greatly reduced (U937 cells) caspase activation, DNA fragmentation and apoptosis after various DNA-damaging treatments (Schmitt et al., 1998a; Schmitt et al., 1998b). Bcl-xL also significantly protected the mitochondria and lysosomes from CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937 cells (Fig. 2D), and entirely in Namalwa cells (Fig. 2E). These results indicate that anti-apoptotic bcl-xL protects against mitochondria and lysosomes disruption after CPT and again suggests that lysosomal leakage depends, in part, on mitochondrial disruption.

$\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL are dependent on caspase activation in U937 and Namalwa cells.

Apoptosis usually necessitates caspase activation that culminates in cell dismantling, DNA fragmentation, and cell death. To investigate the role of caspase activation in CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL, U937 and Namalwa cells were treated with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK prior to CPT treatment. No caspase activities were measured in CPT-treated U937 and Namalwa cells incubated with 100 μ M Z-VAD-FMK (*data not shown*). Moreover, inhibition of caspase activities with Z-VAD-FMK completely abolished CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937

(Fig. 3A) and Namalwa (Fig. 3B) cells. These results demonstrate that both $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL require caspase activities after DNA damage. Because caspase-2L has been reported to act upstream of mitochondria in stress-induced apoptosis (Guo et al., 2002; Lassus et al., 2002; Robertson et al., 2002; Tinel & Tschopp, 2004), Namalwa cells expressing small interfering RNA (siRNA) were derived to silence caspase-2L expression and to investigate its role in CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL. These cells, transfected with Cep4-U6-siRNA-caspase-2 vector under high hygromycin B1 selection (1.0 mg/ml), showed strong caspase-2L expression inhibition (Fig. 3C, left panel). Moreover, silencing caspase-2L expression delayed CPT-mediated DEVDase activities (Fig. 3C, right panel) and both $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL (Fig. 3D). These results demonstrate that caspase-2L acts upstream of both $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL after DNA damage.

Modulation of intracellular sphingosine levels affects lysosomal and mitochondrial permeabilization in U937 cells.

Sphingosine is a sphingolipid particularly located in lysosomal membranes that has been directly implicated in lysosomal permeabilization. The addition of a small quantity of exogenous sphingosine to cells resulted in ss Δ LL and apoptosis (Brunk, 2000; Kagedal et al., 2001b), and intracellular sphingosine rose during TNF- α -induced apoptosis (Schutze et al., 1999). Catabolism of ceramide to sphingosine by the enzyme acidic ceramidase is the major source of cellular sphingosine (Koch et al., 1996; Rother et al., 1992). To investigate the role of sphingosine in CPT-mediated ss Δ LL and apoptosis, we first blocked this catabolic pathway with NOE, a chemical inhibitor of acidic ceramidase. Incubation of U937 cells with 100 μ M NOE significantly reduced ss Δ LL and $\downarrow\Delta\Psi_m$ (Fig. 4A) during the first 4 h of CPT-induced death. In contrast, acidic ceramidase inhibition did not protect ss Δ LL or $\downarrow\Delta\Psi_m$ in

CPT-treated Namalwa cells (*data not shown*). In addition, intracellular sphingosine levels increased significantly in CPT-treated U937 cells during the first 3 h after CPT (Fig. 4B), which coincided with the onset of ssALL and $\downarrow\Delta\Psi_m$. U937 cells directly treated with low-dose synthetic sphingosine also underwent ssALL and $\downarrow\Delta\Psi_m$ (*data not shown*), again suggesting signaling between sphingosine levels and these 2 organelles. The results indicate that modulation of the sphingosine pathway and intracellular sphingosine accumulation represent a mechanism by which DNA damage leads to lysosomal disruption in U937 cells.

Lysosomal cathepsin B participates in CPT-induced cell death in U937 cells.

Cathepsin B, one of the most abundant lysosomal proteases, has been implicated in apoptosis (Brunk et al., 2001; Guicciardi et al., 2004; Turk et al., 2002). We noted an increase of cathepsin B activity in CPT-treated U937 and Namalwa cells (Fig. 1C, 1D). To investigate the role of cathepsin B activation in CPT-induced apoptosis, cells were pretreated with the cathepsin B inhibitor Z-FA-DMK, and various CPT-mediated apoptotic events were monitored (Fig. 5). First, no cathepsin B activity was detected in CPT-treated U937 cells incubated with 10 μ M Z-FA-DMK (Fig. 5A). Cathepsin B inhibition resulted in substantial reduction of caspase-3-like activities (Fig. 5B) and of the percentage of cells with $\downarrow\Delta\Psi_m$ (Fig. 5C), ssALL (Fig. 5D) and sub-G₁ DNA content (Fig. 5E), over the first 4 h in CPT-treated U937 cells. In contrast, inhibition of cathepsin B had no significant effect over the same events in CPT-treated Namalwa cells (*data not shown*). Therefore, these results suggest that cathepsin B activity contributes substantially to caspase-3-like enzyme activation as well as to $\downarrow\Delta\Psi_m$, ssALL and to the overall magnitude of apoptosis after CPT treatment in U937 cells, most likely as a feedback amplification loop.

Proteins of the Bcl-2 family do not target the lysosomal compartment during CPT-induced cell death.

The BH3-only Bid protein can be cleaved by lysosomal proteases, including cathepsin B, that produces a truncated fragment with characteristics similar to tBid, the active fragment generated by caspase-8 (Stoka et al., 2001). To investigate if Bid undergoes cleavage during CPT-induced cell death, and thus, bridges a link between lysosomal proteases and the mitochondria, the kinetics of native Bid expression were monitored in U937 and Namalwa cells after CPT treatment. As positive controls, the cells were also treated with etoposide (VP16) and TNF- α in association with cyclohexamide (CHX). Native Bid expression was significantly reduced as early as 4 to 6 h after VP16, and by 24 h after TNF- α /CHX in U937 and Namalwa cells (Fig. 6A). In contrast, native Bid expression levels were not reduced after CPT treatment, within time-frames where $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ssALL occurred, suggesting that Bid did not undergo cleavage and did not bridge a link between lysosomes and mitochondria in CPT-treated cells.

Several members of the bcl-2 family undergo translocation to the mitochondria after a variety of death stimuli, where they finely regulate permeabilization of the mitochondrial membrane (Green & Reed, 1998; Harris & Thompson, 2000; Kroemer & Reed, 2000). Similar lysosomal translocation of proapoptotic bcl-2-like proteins therefore represents an attractive hypothesis to further explore the mechanisms of lysosomal permeabilization. To date, no experimental evidence supports such involvement of bcl-2 family proteins at lysosomes. To investigate this hypothesis, a fractionation method based on metrizamide-Percoll density gradients was employed to obtain lysosome- and mitochondria-enriched fractions from control and CPT-treated cells. High β -hexosaminidase activity was

detected in lysosome-enriched fractions, but some activity was also detected in mitochondria-enriched fractions indicating lysosome contamination within mitochondria-enriched fractions (Fig. 6B). Similarly, the presence of mitochondrial VDAC1 in lysosome-enriched fractions indicated mitochondrial contamination within the lysosome-enriched extracts (Fig. 6C, 6D). Thus, the expression patterns obtained for various Bcl-2 family proteins were compared to VDAC1 patterns in lysosome-enriched fractions. In U937 cells, bax, bak, bim-EL and bcl-2 expression patterns in lysosome-enriched preparations were very similar to that of VDAC1, suggesting that the bcl-2-like proteins found in lysosome-enriched preparations originated from mitochondrial contamination (Fig. 6C). Similar results were obtained from lysosome-enriched fractions of Namalwa cells, where bax, bak, bik, bim-EL and bcl-2 expression patterns correlated with VDAC1 patterns (with the exception of bim-EL), again suggesting that these proteins originated from mitochondrial contamination (Fig. 6D). As a reference, the expression patterns of the same proteins were monitored in mitochondria-enriched fractions. Also, the nuclear protein lamin B was absent from both mitochondria- and lysosome-enriched fractions (Fig. 6D). Altogether, these experiments indicate that bcl-2 family members, at least the ones studied, do not target lysosomes after CPT treatment.

DISCUSSION

Human monocytic-like leukemia U937 and Burkitt's lymphoma Namalwa cells are two human cancer cell lines with deletions/mutations in the tumor suppressor p53 gene. These cells, therefore, constitute convenient models to study p53-independent apoptosis. They are highly sensitive to DNA damage, and undergo rapid apoptosis after short treatment with several DNA-damaging drugs. Upon CPT treatment, the apoptotic death of these cells is associated with rapid mitochondrial translocation and oligomerization of several bcl-2-like pro-apoptotic proteins, cytochrome c release, Apaf-1 oligomerization, caspase activation, DNA fragmentation, and typical morphological changes (Paquet et al., 2004; Schmitt et al., 1998a; Schmitt et al., 2004; Schmitt et al., 1998b). Recently, partial permeabilization of the lysosomal compartment with the leakage of lysosome content into cytosol, termed ss Δ LL, has been observed in several models of apoptosis, most often with oxidative stress (Brunk & Svensson, 1999; Brunk et al., 1995; Kagedal et al., 2001a). Therefore, the current study was undertaken to investigate the existence of a lysosomal apoptotic pathway during p53-independent DNA damage-induced cell death. Here, we report the occurrence of ss Δ LL and cathepsin B activation simultaneously with $\downarrow\Delta\Psi_m$ and caspase-3-like activation in CPT-treated U937 and Namalwa cells, suggesting the involvement of lysosomes and crosstalk between lysosomes and mitochondria during CPT-induced apoptosis. Though the production of reactive oxygen species is not usually associated with CPT-induced cell death, we monitored the production of superoxide anions after CPT treatment, and found no increase in superoxide generation. Thus, the notion that oxidative stress participates in CPT-mediated ss Δ LL was discarded.

Mitochondrial damage has been shown to occur after lysosomal rupture in several apoptotic models, including oxidative stress (Roberg et al., 1999), treatment with TNF- α (Guicciardi et al., 2000), staurosporine (Bidere et al., 2003), low-dose sphingosine (Kagedal et al., 2001b), some lysosomotropic agents (Boya et al., 2003a; Boya et al., 2003b), and reactivation of p53 function (Yuan et al., 2002). To the best of our knowledge, no direct experimental evidence has demonstrated lysosomal leakage arising after or as a consequence of mitochondrial disruption. Mitochondrial and lysosomal permeabilization occurred simultaneously after CPT treatment in U937 and Namalwa cells. To investigate the hierarchy between lysosomal and mitochondrial disruption, mPTP inhibitors were used to protect the mitochondria from permeabilization. An equivalent reduction of ss Δ LL was observed in U937 cells when mPTP were blocked. Since megapores or channels analogous to mPTP have never been described in the lysosomal membrane, a direct protective action of lysosomes by the mPTP inhibitors CsA and BkA is unlikely. Hence, these results suggest that lysosomal disruption depends on mitochondrial permeabilization. The observations that Namalwa cells incubated with CsA or BkA still undergo $\downarrow\Delta\Psi_m$ after CPT treatment indicate that in these cells, dissipation of $\Delta\Psi_m$ may occur independently of mPTP opening or of ANT function, which is targeted by the inhibitory action of CsA and BkA. Indeed, $\downarrow\Delta\Psi_m$ without mPTP opening has been noted in granzyme B-induced apoptosis (Thomas et al., 2001), and a BH3 peptide also evoked $\downarrow\Delta\Psi_m$ and apoptosis in an ANT-independent way (Vieira et al., 2002).

The anti-apoptotic proteins bcl-2 and bcl-xL promote cell survival in part by preventing mitochondrial dysfunction (Green & Reed, 1998; Harris & Thompson, 2000; Kroemer & Reed, 2000). Overexpressing anti-apoptotic bcl-2 family members in cells thus represents other means of protecting the mitochondria. Though protection against lysosomal rupture has been achieved in bcl-2-overexpressing cells

after oxidative insult, presumably by its protective action on the mitochondria (Zhao et al., 2000), no data support a direct action of anti-apoptotic proteins on lysosomes. In fact, *bcl-2* overexpression was unable to impede *ssΔLL* induced by the lysosomotropic agent ciprofloxacin, which acts directly on lysosomes (Boya et al., 2003a). *Bcl-xL* conferred protection against CPT-mediated *ssΔLL* and $\downarrow\Delta\Psi_m$ in U937 and Namalwa cells. Although the possibility of *bcl-xL* directly preserving the integrity of the lysosomal membrane by itself can not be completely discarded, lysosomal preservation as a consequence of the protective action of *bcl-xL* on the mitochondria is more likely. *Bcl-xL* overexpression completely protects Namalwa cells against CPT-induced organelle permeabilization, while it confers partial protection in U937 cells, although the 2 cell lines express similar *bcl-xL* levels. Thus, the death signals that induce $\downarrow\Delta\Psi_m$ and *ssΔLL* are not totally inhibitable by *bcl-xL* in U937 cells, consistent with previous observations indicating that *bcl-xL* conferred only partial protection in these cells (Schmitt et al., 1998a). In this study, we also investigated, in more detail, whether *bcl-2* family members directly target lysosomes, or not. Even though it is apparently difficult to obtain highly-purified organelle fractions, our results suggested that *bcl-2* family proteins, at least the ones studied, did not target lysosomes during CPT-induced apoptosis. However, more discriminatory approaches must be undertaken before reaching a decisive conclusion.

Our results demonstrate that caspase activation is a crucial step in CPT-induced cell death. Indeed, preventing caspase activation with Z-VAD-FMK, an inhibitor of various caspases, completely abrogates CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and *ssΔLL*. Thus, $\downarrow\Delta\Psi_m$ and *ssΔLL* absolutely necessitate caspase activities in these cells. It has been shown previously that caspase activities provoked $\downarrow\Delta\Psi_m$, while caspase inhibitors impeded $\downarrow\Delta\Psi_m$ under certain circumstances (Bossy-Wetzels et al., 1998;

Marzo et al., 2001; Marzo et al., 1998). More recently, it had been reported that active caspases could penetrate into mitochondrial intermembrane spaces, where they could cleave a subunit of the electron transport chain complex I, leading to disruption of electron transport and resulting in $\downarrow\Delta\Psi_m$ (Ricci et al., 2004). Furthermore, evidence now supports a role for caspase-2L as an initiator protease activated prior to $\downarrow\Delta\Psi_m$ in DNA damage-induced apoptosis (Guo et al., 2002; Lassus et al., 2002; Robertson et al., 2002; Tinel & Tschopp, 2004). Our results deploying siRNA indicate that caspase-2L acts upstream not only to $\downarrow\Delta\Psi_m$, but also to ssALL in Namalwa cells after CPT. However, our results do not permit discrimination between the following possibilities: whether the protection of lysosomes is a consequence of mitochondrial protection by Z-VAD-FMK or silencing caspase-2L expression, or whether specific caspases including caspase-2L, play a direct role in lysosomal permeabilization, or both.

Because of its detergent and lysosomotropic properties, sphingosine has been involved in the mechanism of lysosomal membrane permeabilization (Brunk, 2000; Kagedal et al., 2001b). Lowering intracellular sphingosine levels by inhibition of acidic ceramidase significantly reduced CPT-mediated ssALL and $\downarrow\Delta\Psi_m$ in U937 cells. In addition, sphingosine levels rose in CPT-treated U937 cells. These data suggest that sphingosine could provoke lysosomal permeabilization that, in turn, contributes to mitochondrial disruption, suggesting fatal crosstalk between the two organelles. Because of its polar head containing a proton-trapping amino group, sphingosine is believed to be selectively attracted in acidic lysosomes where its hydrophilic end undergoes protonation due to the low pH. Charged sphingosine becomes a much stronger detergent compared to uncharged sphingosine, destabilizing and rupturing the lysosomal membrane (Firestone et al., 1979; Kagedal et al., 2001b). The possibility that sphingosine directly induces mitochondrial

membrane destabilization through a similar mechanism is unlikely, because in mitochondria, sphingosine would be mostly under its uncharged, thus less harmful, form. Recently, Taha et al. (Taha et al., 2004) demonstrated downregulation of sphingosine kinase-1 activity, accompanied by intracellular sphingosine elevation after treatment with several DNA-damaging agents, via a mechanism dependent on ZVAD-sensitive proteases. In addition, Werneburg et al. (Werneburg et al., 2002) have reported that cathepsin B enhanced sphingosine-stimulated lysosomal permeabilization. Together, these data are indicative of complex regulatory networks between intracellular sphingosine levels, caspase and cathepsin activities, ss Δ LL and $\downarrow\Delta\Psi_m$ during apoptosis. Therefore, it is possible that sphingosine kinase-1 downregulation through caspase proteolytic activities also contributes to increasing intracellular sphingosine levels after CPT treatment. In turn, cathepsin B could contribute to caspase activation, $\downarrow\Delta\Psi_m$ and further ss Δ LL, via amplification loop mechanisms. Recently, two other forms of ceramidase have been cloned from human cells, neutral/alkaline ceramidase, and alkaline ceramidase (El Bawab et al., 2000; Mao et al., 2001). It is, therefore, possible that these two forms could compensate for acidic ceramidase inhibition, particularly in Namalwa cells.

Several models of apoptosis necessitate the activity of lysosomal cathepsin B (Brunk et al., 2001; Guicciardi et al., 2004; Turk et al., 2002). Cathepsin B was rapidly activated after CPT in U937 and Namalwa cell lines. Cathepsin B inhibition resulted in substantial reduction of caspase-3-like activation, $\downarrow\Delta\Psi_m$, ss Δ LL and sub-G, DNA content in U937, but not in Namalwa cells. These data suggest that cathepsin B participates in the propagation of apoptosis after CPT treatment in U937 cells, perhaps as an amplification loop. However, our data did not support a role for Bid in transducing a message between cathepsin activation and the mitochondria after CPT treatment. Cathepsin B is one of the many cathepsins that can be activated

after ssALL. Further investigation is needed to dissect the importance of other cathepsins in the promotion or amplification of apoptosis after CPT treatment.

In conclusion, our study demonstrates that lysosomal rupture and cathepsin B activation are early events during p53-independent apoptosis induced by CPT, occurring simultaneously with mitochondrial disruption and caspase activation. Our findings indicate that lysosomal leakage may first necessitate caspase activation, mitochondrial permeabilization and sphingosine accumulation, although lysosomal disruption may, in turn, contribute to amplify these events in apoptotic cells.

ABBREVIATIONS

The abbreviations used are: Ac-DEVD-AMC: acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl coumarin; ANT: adenine nucleotide translocator; AO: acridine orange; BkA: bongkrekic acid; CHX: cycloheximide; CPT: 20-S-camptothecin lactone; CsA: cyclosporin A; DHE: dihydroethidium; DMNQ: 2,3-dimethoxy-1-naphthoquinone; JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanideiodide; mPTP: mitochondrial permeability transition pore; NOE: N-oleoylethanolamine; PBS: phosphate-buffered saline; PI: propidium iodide; tBid: truncated Bid; siRNA: silencing RNA; ssALL: small scale lysosomal leakage; TLC: thin layer chromatography; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; VDAC: voltage-dependent anion channel; VP16: etoposide; Z-FA-DMK: benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-diazomethylketone; Z-RR-AMC: benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin; Z-VAD-FMK: benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone; $\downarrow\Delta\Psi_m$: loss of mitochondrial transmembrane potential.

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. C.P. obtained a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. The authors thank Mr. Ovid Da Silva (Research Support Office, Research Centre, CHUM) for the editorial work on this manuscript.

REFERENCES

- Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D. & Pommier, Y. (1991). *Cancer Res*, **51**, 6280-6285.
- Bidere, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C. & Senik, A. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 31401-31411.
- Bossywetzel, E., Newmeyer, D.D. & Green, D.R. (1998). *Embo J*, **17**, 37-49.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M. & Kroemer, G. (2003a). *J Exp Med*, **197**, 1323-1334.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H.L., Roumier, T., Perfettini, J.L. & Kroemer, G. (2003b). *Oncogene*, **22**, 3927-3936.
- Broker, L.E., Huisman, C., Span, S.W., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A. & Giaccone, G. (2004). *Cancer Res*, **64**, 27-30.
- Brunk, U.T. (2000). *Redox Rep*, **5**, 87-88.
- Brunk, U.T., Dalen, H., Roberg, K. & Hellquist, H.B. (1997). *Free Radic Biol Med*, **23**, 616-626.
- Brunk, U.T., Neuzil, J. & Eaton, J.W. (2001). *Redox Rep*, **6**, 91-97.
- Brunk, U.T. & Svensson, I. (1999). *Redox Rep*, **4**, 3-11.
- Brunk, U.T., Zhang, H., Roberg, K. & Ollinger, K. (1995). *Redox Rep*, **1**, 267-277.
- Bursch, W. (2001). *Cell Death Differ*, **8**, 569-581.
- El Bawab, S., Roddy, P., Qian, T., Bielawska, A., Lemasters, J.J. & Hannun, Y.A. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 21505-21513.
- Firestone, R.A., Pisano, J.M. & Bonney, R.J. (1979). *J. Med. Chem.*, **22**, 1130-1133.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M. & Jaattela, M. (2001). *J Cell Biol*, **153**, 999-1010.

- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). *Science*, **281**, 1309-1312.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H. & Gores, G.J. (2000). *J Clin Invest*, **106**, 1127-1137.
- Guicciardi, M.E., Leist, M. & Gores, G.J. (2004). *Oncogene*, **23**, 2881-2890.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 13430-13437.
- Harris, M.H. & Thompson, C.B. (2000). *Cell Death Differ*, **7**, 1182-1191.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Kronke, M. & Schutze, S. (1999). *Embo J*, **18**, 5252-5263.
- Hishita, T., Tada-Oikawa, T., Tohyama, K., Miura, Y., Nishihara, T., Tohyama, Y., Yoshida, Y., Uchiyama, T. & Kawanishi, S. (2001). *Cancer Res*, **61**, 2878-2884.
- Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, N. & Utsumi, K. (1998). *FEBS Lett*, **435**, 233-236.
- Kagedal, K., Johansson, U. & Ollinger, K. (2001a). *FASEB J*, **15**, 1592-1594.
- Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U.T. (2001b). *Biochem J*, **359**, 335-343.
- Katunuma, N., Matsui, A., Le, Q.T., Utsumi, K., Salvesen, G. & Ohashi, A. (2001). *Adv Enzyme Regul*, **41**, 237-250.
- Kluck, R.M., Bossywetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). *Science*, **275**, 1132-1136.
- Koch, J., Gartner, S., Li, C.M., Quirtern, L.E., Bernardo, K., Levran, O., Schnabel, D., Desnick, R.J., Schuchman, E.H. & Sandhoff, K. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 33110-33115.
- Kroemer, G. & Reed, J.C. (2000). *Nature Med*, **6**, 513-519.

- Lassus, P., Opitz-Araya, X. & Lazebnik, Y. (2002). *Science*, **297**, 1352-1354.
- Mao, C., Xu, R., Szulc, Z.M., Bielawska, A., Galadari, S.M. & Obeid, L.M. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 26577-26588.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1996). *J Exp Med*, **184**, 1155-1160.
- Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Anel, A. & Naval, J. (2001). *Biochem J*, **359**, 537-546.
- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998). *FEBS Lett*, **427**, 198-202.
- Ohta, H., Ruan, F., Hakomori, S.I. & Igarashi, Y. (1994). *Anal Biochem*, **22**, 489-494.
- Paquet, C., Schmitt, E., Beauchemin, M. & Bertrand, R. (2004). *Apoptosis*, **9**, 815-831.
- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H. & Green, D.R. (2004). *Cell*, **117**, 773-786.
- Roberg, K., Johansson, U. & Ollinger, K. (1999). *Free Radic Biol Med*, **27**, 1228-1237.
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 29803-29809.
- Rother, J.G., van Echten, G., Schwarzmann, G. & Sandhoff, K. (1992). *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 14-20.
- Rudin, C.M. & Thompson, C.B. (1997). *Ann Rev Med*, **48**, 267-281.
- Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A. & Bertrand, R. (1998a). *Exp Cell Res*, **240**, 107-121.

- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. & Bertrand, R. (2004). *Oncogene*, **23**, 3915-3931.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J. & Bertrand, R. (2000). *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 868-879.
- Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G. & Bertrand, R. (1998b). *Cell Death Differ*, **5**, 506-516.
- Schutze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M.L., Heinrich, M., Wickel, M. & Kronke, M. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 10203-10212.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V. & Salvensen, G.S. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 3149-3157.
- Storrie, B. & Madden, E.A. (1990). *Methods Enzymol*, **182**, 203-225.
- Taha, T.A., Osta, W., Kozhaya, L., Bielawski, J., Johnson, K.R., Gillanders, W.E., Dbaibo, G.S., Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 20546-20554.
- Thomas, D.A., Scorrano, L., Putcha, G.V., Korsmeyer, S.J. & Ley, T.J. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14985-14990.
- Tinel, A. & Tschopp, J. (2004). *Science*, **304**, 843-846.
- Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oreic, K. & Turk, V. (2002). *Biol Chem*, **383**, 1035-1044.
- Uchiyama, Y. (2001). *Arch Histol Cytol*, **64**, 233-246.
- Vieira, H.L., Boya, P., Cohen, I., El Hamel, C., Haouzi, D., Druillenec, S., Belzacq, A.S., Brenner, C., Roques, B. & Kroemer, G. (2002). *Oncogene*, **21**, 1963-1977.

- Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F. & Gores, G.J. (2002). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **283**, G947-G956.
- Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L. & Brunk, U.T. (2002). *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **99**, 6286-6291.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Masse, B. & Kroemer, G. (1996a). *FEBS Lett*, **384**, 53-57.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996b). *J Exp Med*, **183**, 1533-1544.
- Zhao, M., Eaton, J.W. & Brunk, U.T. (2000). *FEBS Lett*, **485**, 104-108.

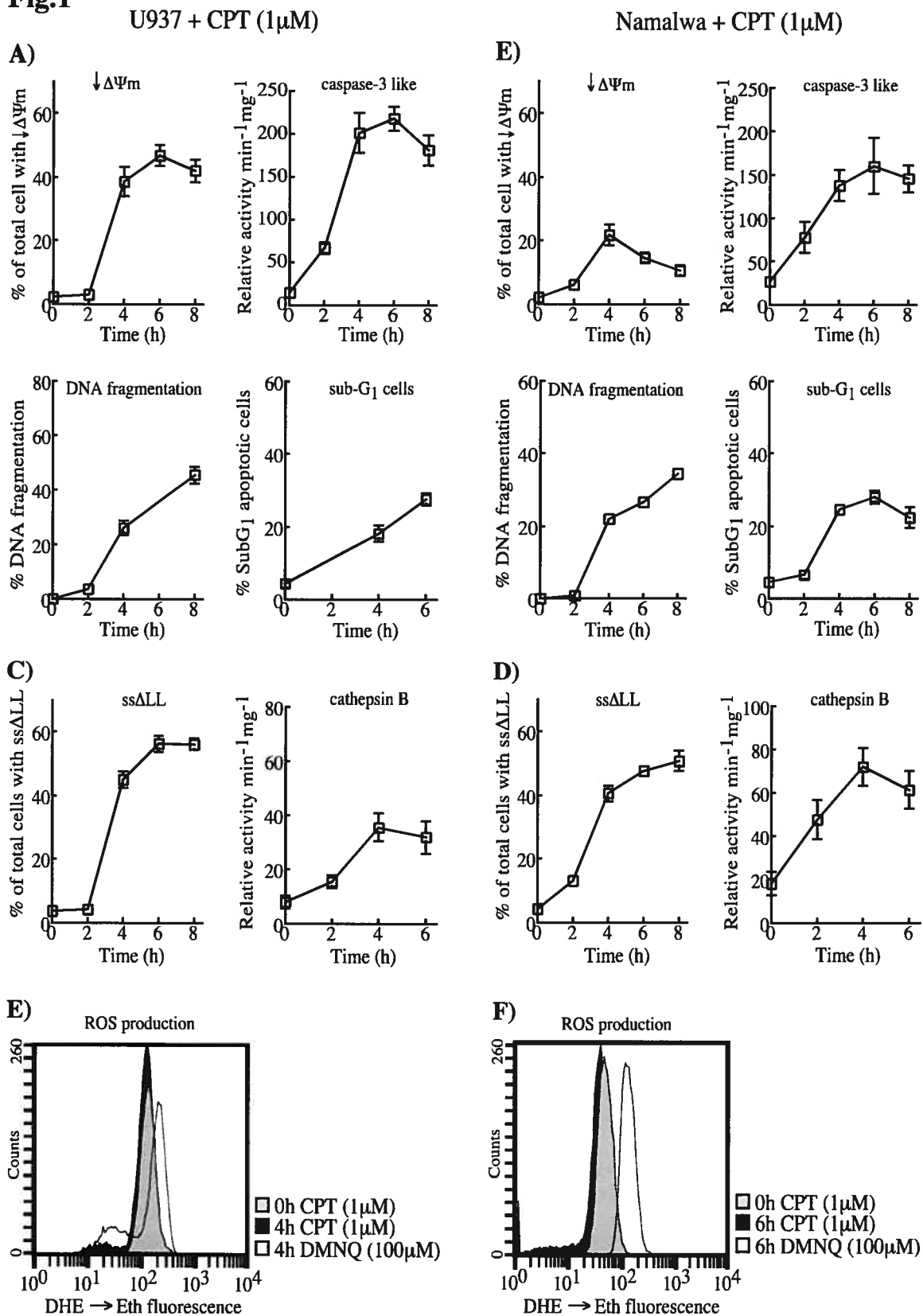
Fig.1

Fig. 1 Parameters of CPT-induced apoptosis in U937 and Namalwa cells. U937 (A, C, E) and Namalwa (B, D, F) cells were treated with 1.0 μ M CPT for 30 min. At the indicated times (h) after CPT treatment, A, B) the percentage of total cells with $\downarrow\Delta\Psi_m$, kinetics of caspase-3-like activities, the percentage of DNA fragmentation and sub-G₁ apoptotic cells were quantified as described in Materials and Methods. Symbols represent the means \pm SE of at least 4 independent experiments. In C, D), the percentage of total cells with ss Δ LL and the kinetics of cathepsin B activity were monitored after CPT treatment. Symbols represent the means \pm SE of at least 4 independent experiments. E, F) Flow cytometry histograms of DHE-loaded cells (gray), treated with CPT (black) or DMNQ (white). The histograms shown are representative of 3 independent experiments.

Fig.2

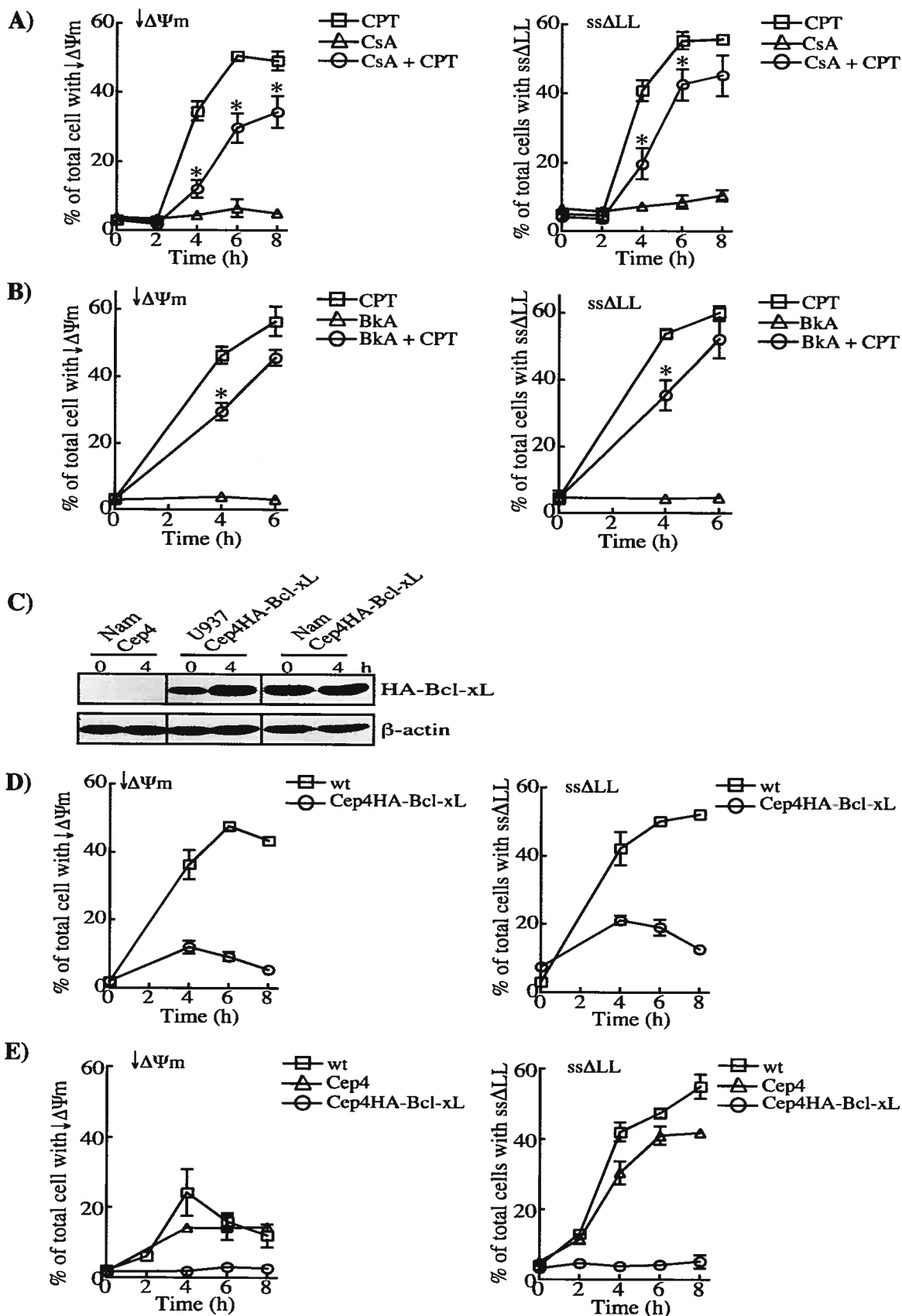


Fig. 2 Effect of mPTP and Bcl-xL on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL . U937 cells were pretreated with A) 50 $\mu\text{g/ml}$ of CsA or B) 50 μM of BkA, for 1 h before the addition of CPT and the percentages of total cells with $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL were measured by flow cytometry at the indicated times (h) after CPT treatment. Symbols represent the means \pm SE of at least 3 independent experiments. * significance with the paired Student's t-test : $p < 0.05$.

C) Expression level of HA-Bcl-xL in transfected Namalwa and U937 cells at times 0 and 4 h after CPT-treatment. β -Actin expression is shown as a loading control. Wild-type and transfected U937 (D) and Namalwa (E) cells were treated with CPT, and the percentages of total cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss ΔLL were measured by flow cytometry. Symbols represent the means \pm SE of at least 3 independent experiments. * significance with the paired Student's t-test : $p < 0.05$.

Fig.3

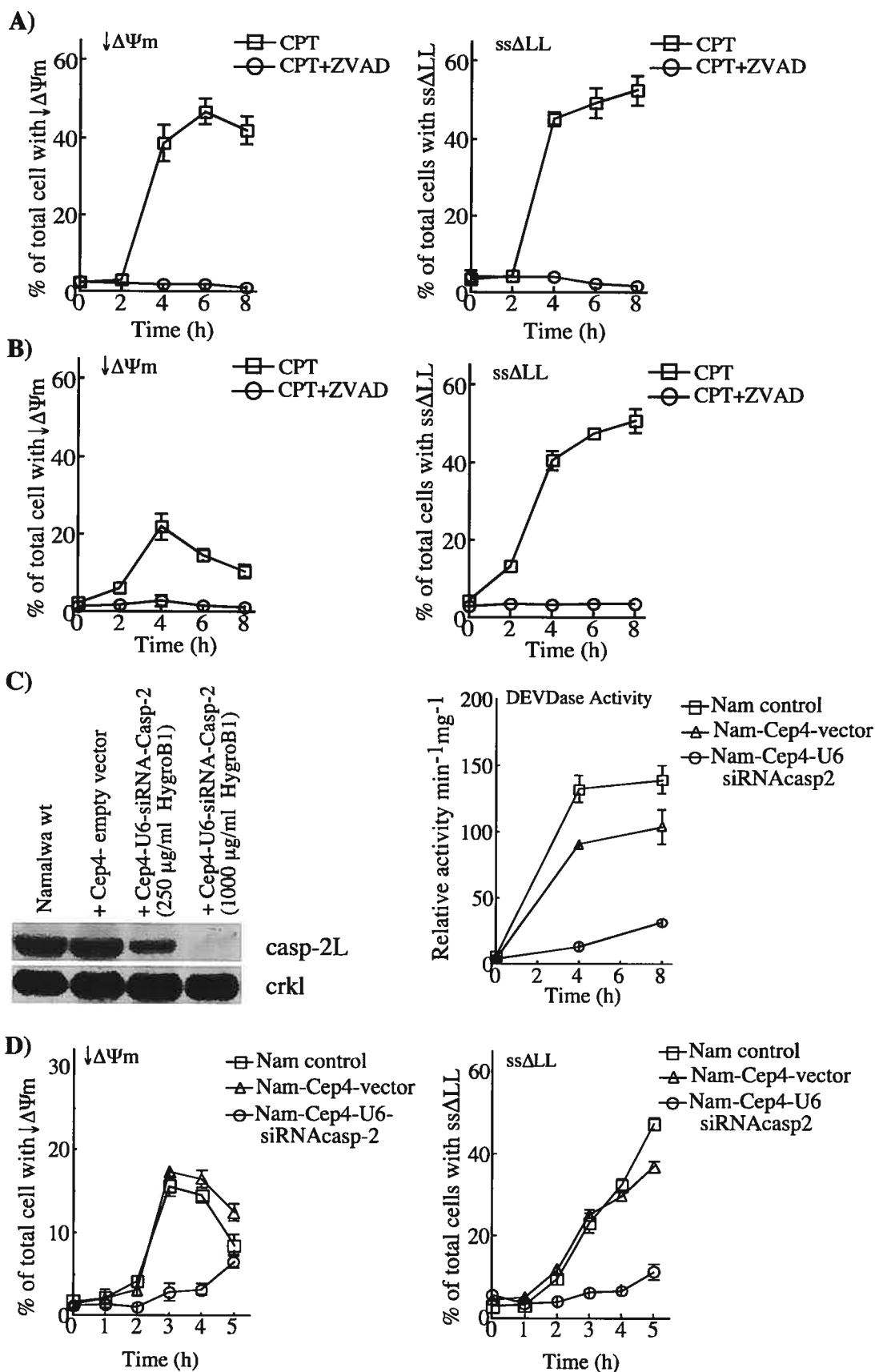


Fig. 3 Effect of caspase inhibition on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937 and Namalwa cells. U937 (A) and Namalwa (B) cells were pretreated with 100 μ M Z-VAD-FMK for 1 h, then CPT was added for 30 min. At the indicated times (h) after CPT treatment, the percentages of total cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL were measured by flow cytometry. C) Silenced caspase-2L expression in Namalwa cells transfected with empty vector and pCep4-U6-siRNA-caspase-2 vector under hygromycin B1 selection at 250 μ g/ml and 1.0 mg/ml (left panel). Membranes were also hybridized with anti-crkl monoclonal antibody as loading control. Control, empty vector- and Cep4-U6-siRNA-caspase-2 vector-transfected Namalwa cells (selected at 1.0 mg/ml hygromycin B1) were treated with CPT, and at the indicated times (h) after CPT treatment, DEVDase activities (C, right panel), and the percentages of total cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL (D) were measured by flow cytometry. Symbols represent the means \pm SE of 3 independent experiments.

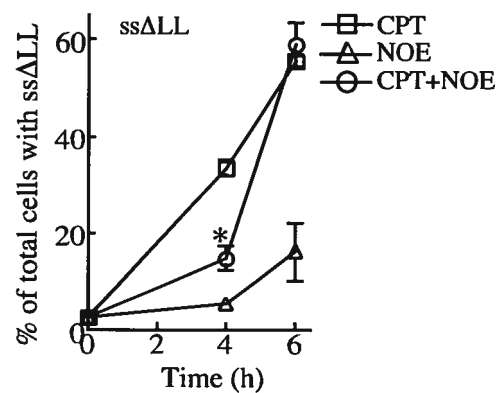
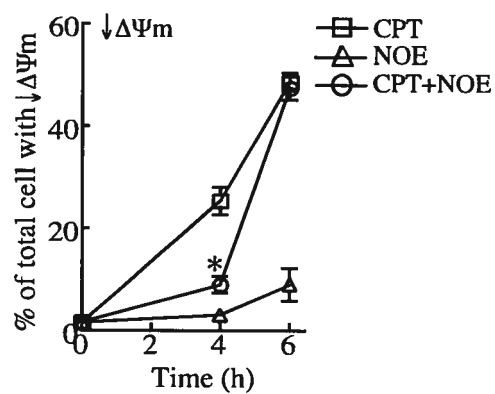
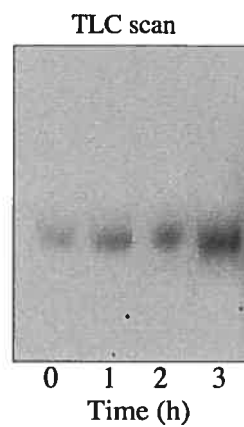
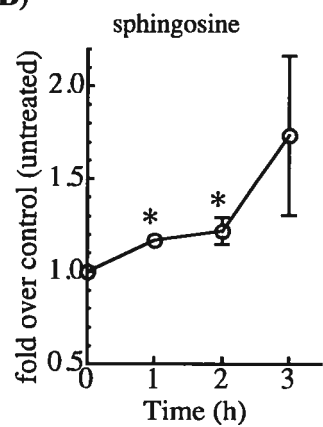
Fig.4**A)****B)**

Fig. 4 Effect of sphingosine levels on CPT-mediated $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL in U937 cells. A) U937 cells were pretreated with 100 μ M NOE for 1 h, then CPT was added for 30 min. At the indicated times (h) after CPT treatment, the percentages of total cells undergoing $\downarrow\Delta\Psi_m$ and ss Δ LL were measured by flow cytometry. Symbols represent the means \pm SE of 3 independent experiments. * significance with the paired Student's *t*-test: $p < 0.05$. B) Quantitation of cellular sphingosine levels during CPT-induced apoptosis. Lipids were extracted from control and CPT-treated U937 cells, and the sphingosine levels were measured in each lipid sample by converting sphingosine to [3 H]*N*-acetylsphingosine with [3 H]acetic anhydride. After TLC, radioactive spots corresponding to [3 H]*N*-acetylsphingosine were scraped and counted in a liquid scintillation counter. The results are expressed as counts per million (CPM) for each CPT-treated sample over the number of CPM for control samples. Points represent the means \pm SE of 3 independent experiments. * significance with the paired Student's *t*-test: $p < 0.05$. A representative TLC chromatogram is shown (right panel).

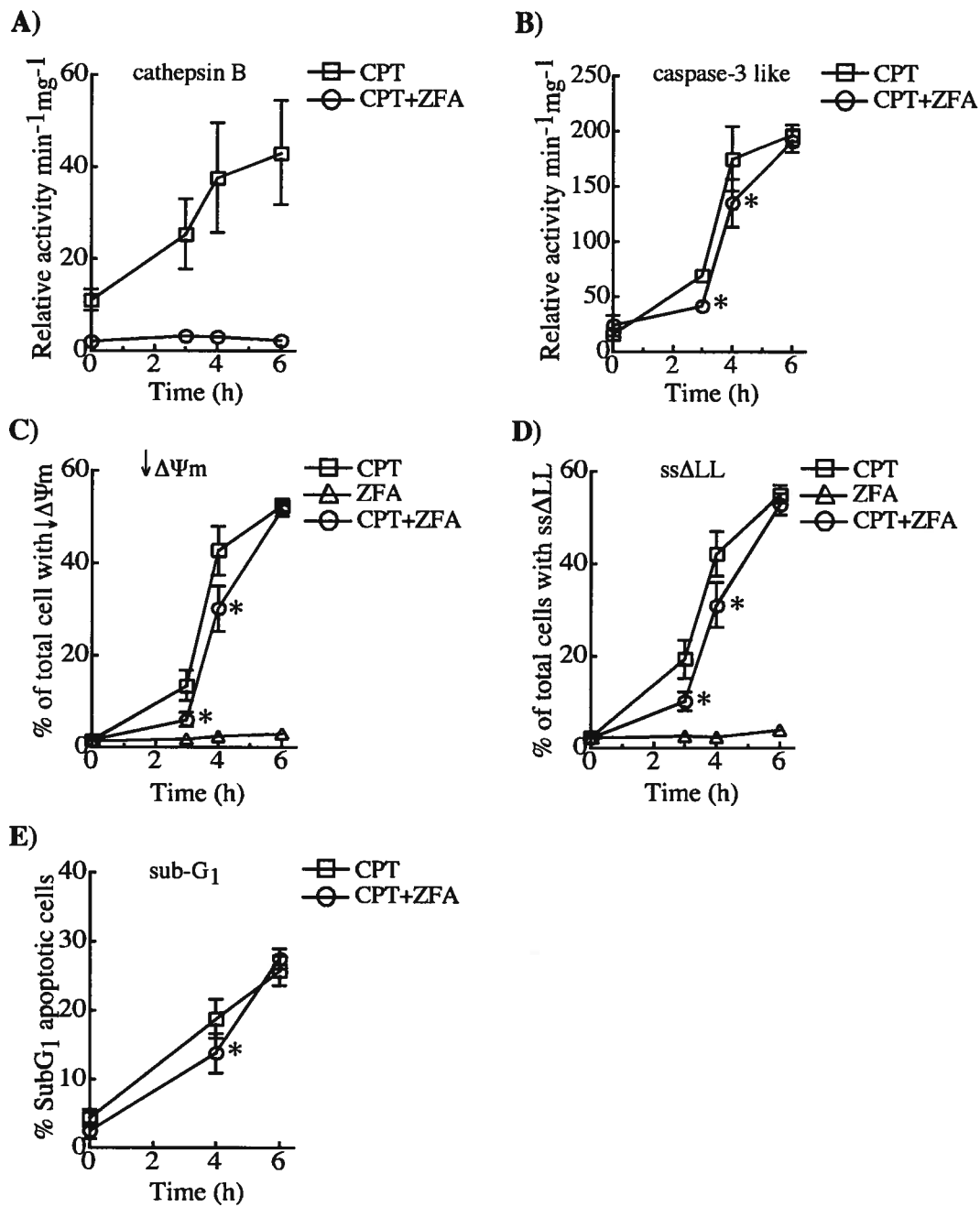
Fig.5

Fig. 5 Effect of cathepsin B inhibition on parameters of CPT-induced apoptosis in U937 cells. U937 cells were pretreated with 10 μ M Z-FA-DMK for 1 h, then CPT was added for 30 min. At the indicated times (h) after CPT treatment, A) the kinetics of cathepsin B, and B) caspase-3-like activities were measured by spectrofluorometry. The percentages of total cells exhibiting C) $\downarrow\Delta\Psi_m$, D) ssALL, and E) hypoploid sub-G₁ DNA content were analyzed by flow cytometry. Symbols represent the means \pm SE of at least 3 independent experiments. * significance with the paired Student's t-test: $p < 0.05$.

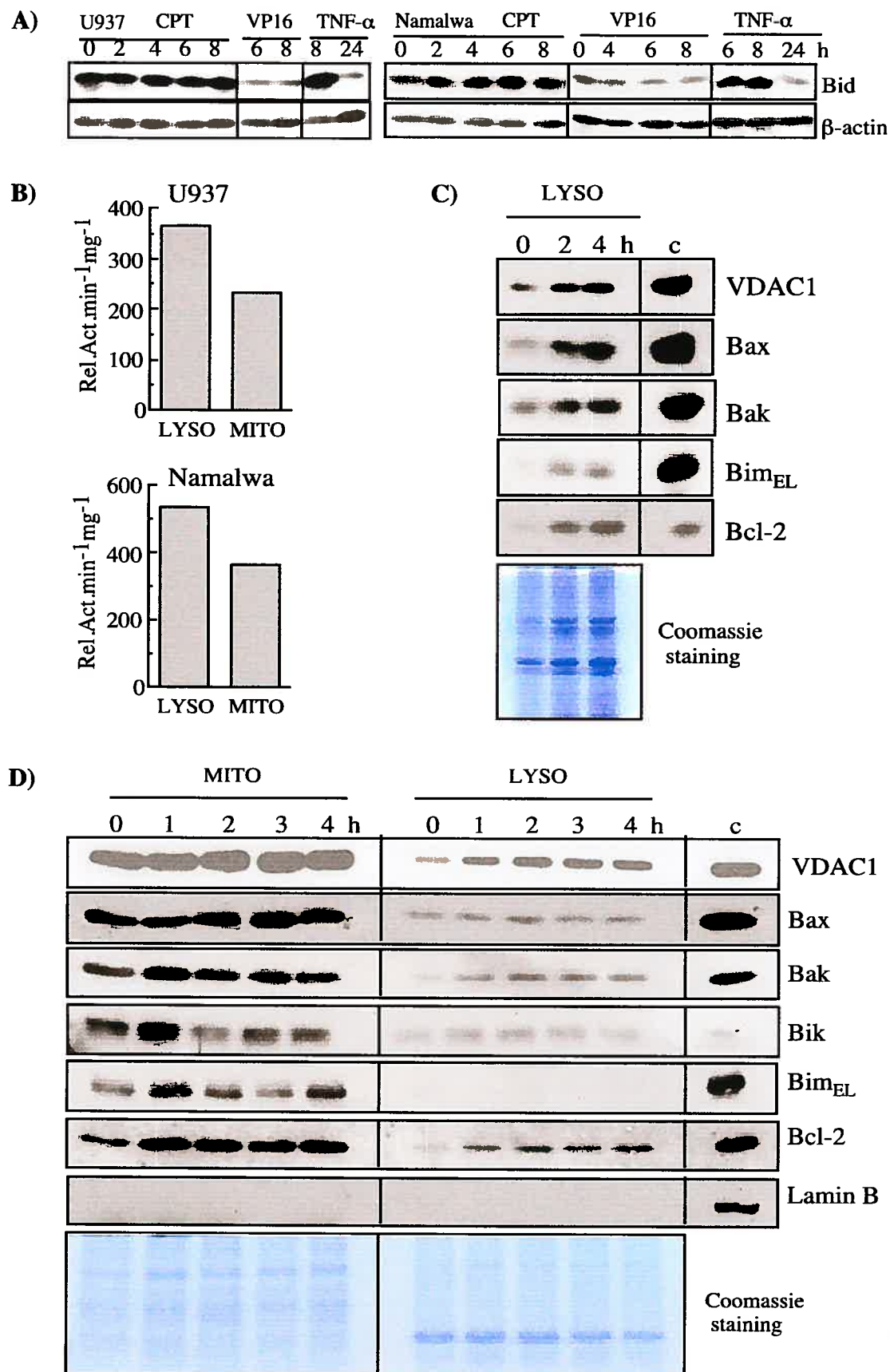
Fig.6

Fig. 6 Kinetics of Bcl-2 family protein expression after CPT treatment in U937 and Namalwa cells. A) Native Bid expression patterns in U937 and Namalwa cells were monitored from total cellular extracts at the indicated times (h) after CPT (1.0 μ M; 30 min), VP16 (50 μ M; continuous) and TNF- α /CHX (1.0 μ g/2.0 μ g/ml; continuous) treatment. Membranes were also hybridized with anti- β -actin monoclonal antibody as loading control. B) β -hexosaminidase activity monitored in lysosome- and mitochondria-enriched fractions obtained from U937 and Namalwa cells. C) Expression patterns of VDAC1, Bax, Bak, Bim-EL and Bcl-2 in lysosome-enriched fractions obtained from control and CPT-treated U937 cells. c means total cellular extract. A SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 dye is shown as loading control. D) Expression patterns of VDAC1, Bax, Bak, Bik, Bim-EL, Bcl-2 and nuclear Lamin B in mitochondria- and lysosome-enriched fractions obtained from control and CPT-treated Namalwa cells. c means total cellular extract. A SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 dye is shown as loading control, and to represent the overall difference in protein expression patterns between the 2 fractions. All are representative of 3 independent experiments.

CHAPITRE 3.

**Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic
Bcl-2 family members in p53-defective cells**

Claudie Paquet, Estelle Schmitt, Myriam Beauchemin and Richard Bertrand

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal - Hôpital Notre-Dame
and Institut du Cancer de Montréal, Montréal (Qué.), Canada

Running title: p53-independent cell death induced by CPT

Key words: Bax; Bak; Bim; VDAC1; camptothecin

Article publié dans:

Apoptosis, vol. 9(6): 815-831, 2004

** C. Paquet est responsable d'environ 90 % de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. E. Schmitt a contribué aux travaux présentés à la fig.1, M.Beauchemin est responsable des travaux présentés à la fig.2 B et R. Bertrand a supervisé l'ensemble de l'étude.*



Claudie Paquet



Dr. Richard Bertrand
directeur de recherche

Résumé:

Les voies apoptotiques activées par un dommage génotoxique dans un contexte cellulaire p53-déficient sont très peu connues. Pourtant, la protéine p53 est mutée ou défectueuse dans plus de la moitié des tumeurs humaines. Il est donc important de mieux caractériser l'apoptose en l'absence de p53, afin d'améliorer les thérapies anti-cancéreuses. Notre étude s'intéresse aux mécanismes d'activation de la voie mitochondriale lors de l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN. Nous avons investigué plus particulièrement les modes d'action de certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et leur fonction et/ou participation dans l'induction de la voie mitochondriale. Les cellules p53-déficientes Namalwa (lymphome B) entrent rapidement en apoptose après l'induction d'un dommage à l'ADN par la camptothécine (CPT). La mort apoptotique des cellules Namalwa est caractérisée par le relargage du cytochrome c, accompagné d'une chute du $\Delta\Psi_m$, de l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN. Nous avons également observé une rapide induction du BH3-unique Bim, ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines Bim-EL, Bim-L, Bim-S et Bik après le traitement de CPT. Par contre, le niveau d'expression des protéines multi-domaines Bax- α et Bak demeure relativement constant. Toutefois, nos résultats démontrent que les protéines Bax- α , Bak, Bik, Bim-EL et Bim-L transloquent rapidement vers la mitochondrie après CPT. De plus, des expériences chromatographiques de filtration sur gel montrent que certains de ces Bcl-2-like s'oligomérisent en complexes protéiques de haut poids moléculaire. Nous avons par la suite analysé la composition de ces oligomères par des expériences de co-immunoprécipitation effectuées directement à partir de fractions mitochondriales, qui ont révélé la formation des complexes suivants: Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 et Bim/Bcl-2, après l'induction du dommage à l'ADN. C'est l'une des premières fois que la formation d'oligomères de protéines Bcl-2-like est détectée dans des cellules apoptotiques humaines, dans un contexte de protéines endogènes et non surexprimées. Selon ces résultats, nous suggérons que l'oligomérisation des Bcl-2-like au niveau de la mitochondrie pourrait contribuer à la perméabilisation mitochondriale. L'induction, la translocation mitochondriale et l'oligomérisation des protéines Bcl-2-like semblent corrélées avec l'activation rapide de la voie mitochondriale et l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique.

SUMMARY

In the p53-deficient human B lymphoma Namalwa cell line that quickly undergoes apoptosis after DNA topoisomerase I inhibitor (camptothecin, CPT) treatment, we observed rapid and slight induction of the pro-apoptotic BH3-only Bik, Bim-EL, Bim-L and Bim-S proteins. In contrast, the expression levels of Bad and multidomain Bax- α and Bak remained mostly unchanged after CPT treatment. However, multiple pro-apoptotic proteins, including Bax- α , Bak, Bik, Bim-EL and Bim-L, translocated rapidly to the mitochondria after CPT treatment. Gel filtration chromatography experiments demonstrated that some of the pro-apoptotic proteins assemble themselves into high molecular weight protein complexes. The protein composition of these oligomers was further analyzed by co-immunoprecipitation experiments performed on highly purified mitochondrial fractions, which revealed the formation of Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 and Bim/Bcl-2 complexes after DNA damage induction. Thus, it appeared that induction, mitochondrial translocation and assembly in multimeric protein complexes of several pro-apoptotic members of the Bcl-2 family correlated with the rapid activation of apoptosis in a p53-independent pathway after CPT-mediated DNA strand breaks.

INTRODUCTION

Apoptosis is a process of selective cell elimination that plays a crucial role in normal development, tissue homeostasis and immune function, as well as in various pathological diseases, including cancer (1, 2). p53 tumor suppressor protein is normally activated when cells are stressed or damaged, and integrates numerous signals that regulate cell life and death. By its ability to influence DNA repair, cell cycle checkpoints or stimulate apoptosis, p53 is pivotal in preventing tumorigenesis (3-6). However, most human tumors have lost the expression of a functional p53, and they likely represent difficult targets in cancer therapies. Understanding the molecular mechanisms underlying p53-independent apoptosis is thus crucial in developing therapeutic strategies that will efficiently target p53-defective tumors.

Members of the Bcl-2 family of proteins are critical regulators of apoptosis that either promote cell survival (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) or facilitate cell death. The latter ones are further subdivided into 2 classes: multidomain proteins that contain Bcl-2 homology (BH) domains 1-3 (e.g. Bax, Bak), and BH3-only proteins constituted of a unique BH3 motif (e.g. Bad, Bid, Bik, Bim, Hkr) (7). Relative amounts of death agonists and antagonists greatly influence the cell's ability to undergo apoptosis. Bcl-2 family proteins are mainly regulated through protein-protein interactions and subcellular localization.

Heterodimerization between pro- and anti-apoptotic counterparts may inhibit their respective functions, while their insertion into intracellular membranes, including the mitochondria, may greatly alter organelle functioning. Control of mitochondrial dysfunction is the major means by which Bcl-2 family proteins exert their apoptosis regulatory effects. As a site of convergence for multiple death-inducing stimuli, the mitochondria occupy a central place where Bcl-2 family

proteins play a great part in deciding whether a cell will live or die (8). After a variety of death signals, some pro-apoptotic proteins translocate to the mitochondria, change their function, and cause cytochrome *c* release from the mitochondrial intermembrane space toward the cytosol. Death inducers are thus mitochondrial troublemakers, while death antagonists act as protectors, preventing the release of apoptogenic factors in the cytosol (9, 10).

Once in the cytosol, cytochrome *c* triggers the death pathway through oligomerization with the adaptor molecule Apaf-1 and pro-caspase-9 to form apoptosomes, resulting in caspase-9 activation, which, in turn, cleaves and activates downstream effector caspases (11). Two major models have been proposed to account for cytochrome *c* release during apoptosis. One of them involves mitochondrial permeability transition pores (mPTP), or megachannels, which form at contact sites between outer (OMM) and inner mitochondrial membranes. The multidomain proteins Bax- α and/or Bak can bind to voltage-dependent anion channels (VDAC1), a component of mPTP, enhancing their channel activity to allow the passage of cytochrome *c* (12). mPTP opening also causes loss of mitochondrial transmembrane potential and swelling of the mitochondrial matrix, which eventually leads to OMM rupture with the subsequent nonselective release of intermembrane space contents (13). However, other studies argue that cytochrome *c* release does not require mPTP (14), and suggest instead that it might occur via specific OMM permeabilization evoked by Bcl-2 family members (15). As a typical model, after cleavage of the BH3-only Bid by caspase-8, the truncated Bid (tBid) fragment can bind to Bax- α and/or Bak, induce conformational changes and promote their activation/insertion in the OMM, where the proteins would homo- or hetero-oligomerize to form ion channels (16-18). This model proposes that pro-apoptotic proteins directly form pores in the OMM, which can mediate selective cytochrome *c*

release, while anti-apoptotic proteins like Bcl-2 and Bcl-xL prevent channel formation. A good candidate for the existence of such pores *in vivo*, in intact mitochondria, is the new mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) (19), which resembles Bcl-2 and Bax-forming channels in artificial liposomes (20-22).

Current models propose a distinction between 2 categories of BH3-only proteins: “sensitizing” proteins, such as Bik, Bad and Noxa, which are activated after death stimuli and function to neutralize pro-survival Bcl-2 and Bcl-xL, freeing the multidomains Bax- α and Bak to execute cell death through mitochondrial dysfunction; and “activating” molecules, like tBid, which bind directly to and activate Bax- α and Bak at the mitochondrial level (23). Loss-of-function studies have revealed that the absence of both Bax- α and Bak preserved the mitochondria and inhibited apoptosis after a variety of death signals, indicating apparent redundancy in their modes of action (24, 25).

The present experiments utilize a p53-defective human B lymphoma cancer cell line to investigate the molecular mechanisms of p53-independent apoptosis after DNA damage induced by a chemotherapeutic agent. Here, in cells undergoing apoptosis, we report the induction and/or translocation, to mitochondria, of several Bcl-2 family members, including the multidomain Bax- α and Bak, as well as the BH3-only Bik and Bim proteins. In addition, we show that some of these proteins form high molecular weight complexes after apoptosis induction. p53-independent induction, mitochondrial relocalization and oligomerization is associated with cytochrome *c* release in the cytosol, caspase-9 and -3 activation, DNA fragmentation and morphological changes typical of apoptosis. We suggest that multiple pro-apoptotic Bcl-2 family members may contribute to transduce cell death signals and participate in mitochondrial dysfunction after DNA strand break induction, triggering a p53-independent apoptotic pathway.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The radioactive precursors [2-¹⁴C]-thymidine (59 mCi/mmol) and [α -³²P]-dUTP (3,000 mCi/mmol) were purchased from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). 20-S-camptothecin lactone (CPT) and metrizamide were obtained from the Sigma-Aldrich Company (St.Louis, MO). The fluorogenic peptide derivatives acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC) and acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) were acquired from Calbiochem-Novobiochem Corporation (San Diego, CA). Percoll was obtained from Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from the Sigma-Aldrich Company, ICN BioMedicals or other local sources.

Cell culture, drug treatment and DNA labeling. Human B lymphoma Namalwa and human histiocytic lymphoma U-937 cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA), were 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). Exponentially-growing cells were used in all experiments at a concentration of 5 x 10⁵ cells/ml. After treatment with CPT at a concentration of 1.0 µM for 30 min at 37°C, the cells were grown in drug-free medium. For DNA labeling, cells were grown with [¹⁴C]-thymidine (0.02 µCi/ml) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to drug treatment (26).

Protein extraction and subcellular fractionation. To prepare whole-cell protein extracts, control and CPT-treated cells were homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 120 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate and a cocktail of protease inhibitors (Complete™, Roche Molecular Biochemicals, Laval, Qc, Canada). The supernatants were collected after centrifugation (10,000 x g for 15 min at 4°C). To obtain cytoplasmic (S-100) fractions, control and CPT-treated cells were swelled in deionized water for 4 min on ice. Next, the samples were adjusted to 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes-KOH (pH 7.4), 1.0 mM EDTA (isotonic buffer), and passed 10 times through a 30G1/2 needle adapted to a syringe, to disrupt the cells. Unbroken cells, nuclei and organelles were pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 20 min; the supernatants were saved and further clarified by centrifugation at 100,000 x g for 60 min at 4°C (S-100 fractions).

A density gradient protocol was modified from Storrie and Madden (27) for mitochondria isolation. First, cells were swelled in deionized water for 4 min on ice, and the samples adjusted in isotonic buffer. The cells were disrupted by passing the samples 30-fold through a 26G3/8 needle, and subsequently centrifuged at 1,000 x g for 15 min to pellet unbroken cells and nuclei. Supernatants containing mitochondria and other organelles were layered on top of the first gradient consisting, from bottom to top, of 2 ml of 35% (w/v) metrizamide, 2 ml of 17% (w/v) metrizamide, and 5 ml of 6% (v/v) Percoll in isotonic buffer. After centrifugation at 50,500 x g for 1 h at 4°C, a set of 2 discrete bands appears at the interfaces 17/35% metrizamide and 6% Percoll/17% metrizamide. The upper band, at the 6% Percoll/17% metrizamide interface, contains mitochondria and lysosomes that will need further separation by the second gradient to obtain pure organelle fractions. This interface is collected and

adjusted to 35% metrizamide by mixing with a 80% (w/v) metrizamide solution. The sample is then placed at the bottom of the second gradient and overlaid with 2 ml of 17% metrizamide and 5 ml of 5% metrizamide. The tube is filled to the top with the isotonic buffer, and centrifuged at 50,500 \times g for 1 h at 4°C. Two distinct bands appear: the upper one at the 5/17% metrizamide interface contains lysosomes, while the lower one, at the 17/35% metrizamide interface, contains highly pure mitochondria. To pellet the mitochondria, the interface is diluted with the largest possible volume of isotonic buffer and centrifuged at 53,000 \times g for 1 h at 4°C.

Western blot analysis. The primary antibodies used in this study included: anti-cytochrome *c* mouse monoclonal antibody (clone 7H8.2C12, BD PharMingen), anti-caspase-9 mouse monoclonal antibody (clone 2-22, BD PharMingen), anti-caspase-3 rabbit polyclonal antibody (556425, BD PharMingen), anti-NBK (-Bik) goat polyclonal antibody (N-19, Santa Cruz Biotechnology), anti-NBK (-Bik) rabbit polyclonal antibody (FL-160, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bim rabbit polyclonal antibody (68871N, BD PharMingen), anti-Bim rabbit polyclonal antibody (202000, Calbiochem), anti-Bak mouse monoclonal antibody (clone G317-2, BD PharMingen), anti-Bak rabbit polyclonal antibody (06-536, Upstate Biotechnology), anti-Bid rabbit polyclonal antibody (AF846, R & D Systems), anti-Bad mouse monoclonal antibody (clone 48, Transduction Laboratories), anti-Bax rabbit polyclonal antibody (N-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-2 mouse monoclonal antibody (100, Santa Cruz Biotechnology), anti-cytochrome *c* oxydase subunit IV (COX IV) mouse monoclonal antibody (clone 20E8-C12, Molecular Probes Inc.), anti-Porin 31 HL (VDAC1) mouse monoclonal antibody (clone 89-173/045, Calbiochem) and anti- β -actin mouse monoclonal antibody (clone AC-40, Sigma). The secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated sheep

anti-mouse immunoglobulin (Ig) and donkey anti-rabbit Ig secondary antibodies (Amersham Pharmacia Biotech), and horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology).

Caspase activity assays. LEHDase and DEVDase activities were measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence fluorometer (LS 50B, Perkin Elmer Biosystem). Reactions were carried out in cuvettes, and the temperature was maintained at 37°C in a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM Hepes (pH 7.5), 20% (v/v) glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 500 μ M Ac-LEHD-AFC or 200 μ M Ac-DEVD-AMC fluorogenic peptides. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg (28).

Analysis of the DNA fragmentation process. To visualize oligonucleosome-sized DNA fragments, cellular DNA was extracted by a salting-out procedure described previously (26). Electrophoresis was performed in 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0), after which DNA was visualized by ethidium bromide staining. The kinetics of DNA fragmentation were monitored and quantitated by DNA filter elution assays, as described elsewhere (26). The results are expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in control (untreated) cells (background) using the formula $(F-F_0/1-F_0) \times 100$, where F and F_0 represent DNA fragmentation in treated and control cells, respectively (26). DNA content after propidium iodide (PI) staining, was measured by flow cytometry using a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer. The results are expressed as the percentage of cells presenting hypoploid DNA content (sub-G1 peak).

Electron microscopy. Cells were fixed in 0.1 M Millonig's phosphate buffer (pH 7.4, 292 mOsm) containing 2.5% glutaraldehyde, stained with 2% uranyl acetate, and dehydrated with several ethanol treatments. Sections (500 to 700 Å) were mounted on copper grids and stained with lead citrate (29). The samples were examined by transmission electron microscopy, using a Ziess Em 10 CA microscope (JFE Enterprises, Brookeville, MD).

Analysis of mRNA expression. Total RNA was isolated with TRIzol reagent and RNase protection assays were performed with commercial RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay System (BD PharMingen), as specified by the manufacturer. For Northern blots, polyA⁺ RNA was isolated from control and CPT-treated cells, and 3.5-µg aliquots were loaded per lane. Membranes were hybridized with [α -³²P] dCTP-labeled Bim-EL or β -actin cDNA probes in 5x SSPE, 50% formamide, 5% Denhardt's solution, 1% SDS, 10% dextran sulfate and 100 µg/ml salmon sperm at 42°C for 16 h, followed by washes in 2x SSPE at 30°C, and 2x SSPE containing 2% SDS, at 65°C.

Gel filtration chromatography analysis. Gel filtrations were performed on a Superose 6-HR 16/50 column (Amersham Pharmacia Biotech), connected to a FPLC system. The equilibration, lysis and elution unique buffer contained 25 mM Hepes (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.2 mM DDT, 2% (w/v) CHAPS and a cocktail of protease inhibitors (Complete™, Roche Molecular Biochemicals). Cellular extracts were prepared from 5 x 10⁸ control and CPT-treated cells. Elution was performed at a flow rate of 500 µl/min, and 2.5-ml fractions were collected at 5-min intervals. The column was calibrated with gel filtration standard proteins from Amersham

Pharmacia Biotech. After chromatography, 80- μ l aliquots from each fraction were analyzed by Western blotting (30).

Co-immunoprecipitation experiments. Co-immunoprecipitation experiments were performed in mitochondria-enriched fractions. Namalwa control (untreated) and 3-h CPT-treated cells were swelled in deionized water for 4 min on ice, and the samples adjusted in isotonic buffer as described above. The cells were disrupted by passing the samples 30-fold through a 26G3/8 needle, and subsequently centrifuged at 1,000 x g for 15 min. The supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 15 min to obtain a mitochondria-enriched pellet. This mitochondrial pellet was resuspended in isotonic buffer containing 5 mM dithiobis[succinimidyl]propionate] (DSP) cross-linker agent (Pierce Biotechnology, Rockford IL) and incubated for 30 min by rotation at room temperature. The cross-linking reaction was quenched by the addition of Tris pH 7.5 to a final concentration of 50 mM. After centrifugation at 10,000 x g for 15 min, the supernatant containing DSP was discarded, and the mitochondrial pellet was lysed in the same 2% CHAPS buffer used for gel filtration experiments. After lysis and a final centrifugation step (10,000 x g for 15 min at 4°C), the supernatant served as a mitochondria-enriched fraction. For immunoprecipitation, 120 μ g of protein from mitochondria-enriched fraction was mixed with 0.02 μ g/ μ l of polyclonal anti-Bax antibody (N-20, Santa Cruz Biotechnology), or polyclonal anti-Bak antibody (06-536, Upstate Biotechnology), or polyclonal anti-Bim antibody (202000, Calbiochem), or nonspecific normal rabbit IgG (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology) as controls, followed by overnight incubation at 4°C. Immunocomplexes were captured with a protein A- and G-Sepharose mixture and the covalent amide bonds created by the DSP cross-linker

were cleaved by incubating the immunocomplexes in Laemmli buffer containing 75 mM DTT for 30 min at 37°C prior to electrophoresis.

RESULTS

Characterization of p53-independent apoptotic cell death in Namalwa cells after DNA damage induction.

Human B lymphoma Namalwa cells are p53 double mutant cells that contain 2 nonsynonymous mutations in exon 7 of p53 (31). These cells are unable to express a functional p53 protein, and constitute a suitable model to study p53-independent pathways of apoptosis. The Namalwa cell line is known to be highly sensitive to the induction of DNA injury by various agents. It has already been shown that these cells display DNA fragmentation patterns typical of apoptosis after short DNA-damaging drug treatments (30, 32, 33).

Figure 1 illustrates the kinetics of multiple apoptotic events monitored in Namalwa cells treated with CPT, an anticancer drug that induces cellular DNA strand breaks by evoking the stabilization of DNA topoisomerase I-cleavable complexes. DNA damage induction rapidly causes cytochrome *c* release from the mitochondrial intermembrane space toward the cytosol, as demonstrated by the detection of cytochrome *c* in the cytosol of Namalwa cells as soon as 2 h after CPT treatment (Fig. 1A, upper panel), followed by reduction of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) (Fig. 1A, lower panel).

The release of cytochrome *c* correlates with initiator and effector pro-caspase activation. It is well-known that pro-caspases must undergo proteolytic cleavage to become activated, so that the appearance of initiator caspase-9- and effector caspase-3-cleaved fragments in CPT-treated Namalwa cells suggests their activation (Fig. 1B, upper panels). Caspase activities were also monitored using specific fluorogenic peptides. Increasing LEHDase (caspase-9) and DEVDase (caspase-3-like) activities were measured after DNA damage induction in Namalwa

cells (Fig. 1B, lower panels). After caspase activation, DNA was fragmented in the typical ladder pattern of oligonucleosome-sized DNA fragments, beginning to appear between 3 to 4 h after CPT treatment (Fig. 1C, upper panel). The kinetics of the DNA fragmentation process in Namalwa cells were also monitored and quantitated by DNA filter elution assays; the percentage of fragmented DNA increased with time after drug treatment (Fig. 1C, lower panel). The percentage of cells undergoing apoptosis after CPT treatment were also estimated by measuring haploid DNA content after PI staining (sub-G1 peak) (Fig. 1C, lower panel). Namalwa cells treated with CPT also presented morphological signs of apoptotic death, such as cell shrinkage and chromatin condensation at the nuclear periphery (Fig. 1D). These apoptotic phenomena occurred in a well-ordered fashion, starting with the release of cytochrome *c* in the cytosol, reduction of $\Delta\psi_m$, and followed closely by activation of initiator caspase-9, then effector caspase-3. DNA fragmentation and the appearance of morphological changes came last. Cytochrome *c* release, loss of $\Delta\psi_m$ and caspase-9 activation suggest mitochondrial participation in this pathway. The importance of the mitochondria-driven events to signal apoptosis in these cells was also indicated by previous observations revealing that a high expression level of anti-apoptotic Bcl-xL and Bcl-xES proteins, achieved by transfection experiments, prevented apoptosis induced by various compounds, including CPT (30, 33, 34).

Induction of pro-apoptotic proteins after treatment with a DNA-damaging agent.

Pro-apoptotic members of the Bcl-2 family of proteins are well-known positive regulators of the mitochondrial pathway of apoptosis. To investigate their participation in the apoptotic events observed after CPT treatment, we looked at the expression pattern of various pro-apoptotic members of the family, both at the RNA and protein levels. We observed small increment of Bid mRNA levels at 4 and 5 h

after CPT treatment. For Bik and Bak mRNA levels, the increase was not statistically significant, and the amount of Bax mRNA stayed stable throughout the experiments (Fig. 2A). Bim-EL mRNA was the only one that showed significant induction, rising rapidly 2 h after CPT treatment (Fig. 2B).

Next, we assessed induction at the protein level. Immunoblot analysis revealed a rapid increase in the expression of some pro-apoptotic proteins (Fig. 3). The BH3-only proteins Bik, Bim-EL and Bim-L were detected in larger quantities as early as 1 h after CPT treatment, compared to their expression levels in control (untreated) cells, while the changes seen in the expression of multidomain Bak protein were not statistically significant (Fig. 3). Full-length Bid protein was found at a lower intensity in extracts prepared from 2-h and 4-h drug-treated cells, which suggested that it could undergo proteolytic cleavage after initiation of apoptosis. The expression levels of Bad and multidomain Bax- α proteins remained mostly unchanged (Fig. 3). The increase in protein expression of the BH3-only Bik and Bim isoforms preceded the release of cytochrome *c* in the cytosol, suggesting a role for these proteins in the initiation of p53-independent apoptosis after DNA damage induction.

Multiple pro-apoptotic proteins relocalize to the mitochondria after DNA damage induction.

Subcellular localization is of critical importance for the functioning of Bcl-2 family proteins. Several studies have reported activation by conformational changes and/or mitochondrial translocation of the pro-apoptotic Bax- α and Bak proteins after various death stimuli, including DNA damage. Because most of these observations were carried out in cellular contexts where p53 protein was functional, we wanted to

know if some proteins of Bcl-2 family members also target mitochondria after DNA injury in p53-defective cells.

Western blot analysis, performed in highly pure mitochondrial fractions prepared by the method of metrizamide/Percoll density gradients, revealed a clear mitochondrial redistribution for some proteins after the induction of DNA damage (Fig. 4). Pro-apoptotic Bax- α protein translocated to the mitochondria from 1 to 2 h after drug treatment, and Bak protein was detected in higher amounts in all mitochondrial fractions obtained from CPT-treated cells (Fig. 4). BH3-only Bik protein, and at least 2 of the 3 Bim isoforms tested, also relocated to the mitochondria soon after treatment (Fig. 4). Bim-EL and -L were the most abundant isoforms of Bim in B lymphoma Namalwa cells, while Bim-S was more difficult to find. Two other BH3-only proteins were finally tested for their mitochondrial expression, but neither Bad nor full-length Bid was detected in mitochondria from control or drug-treated cells (Fig. 4). This result was expected, at least for Bid, because the antibody used cannot detect tBid, the form most often reported to possess some pro-apoptotic activities. To assess the quality of the mitochondrial preparations, we examined the extracts for the presence of mitochondrial markers (Fig. 4). Cytochrome *c* disappeared gradually with time after CPT treatment (Fig. 4), in accordance with its corresponding emergence in the cytosol. The mitochondrial enzyme COX IV seemed to be up-regulated after drug treatment (Fig. 4), an observation that has been made in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells, where the authors found COX IV induction after treatment with teniposide, a DNA topoisomerase II inhibitor (35). Abundant mitochondrial VDAC1 was expressed equally in all fractions, demonstrating the purity of the mitochondrial preparations, as well as an equivalent protein load in each lane, also visualized by Coomassie Blue staining of the gels (Fig. 4). By being targeted to mitochondria shortly after DNA

damage induction, these proteins could participate in mitochondrial destabilization and the subsequent cascade of events leading to cell death.

Formation of high molecular weight complexes between members of the Bcl-2 family.

The formation of homo- and heterocomplexes between proteins of Bcl-2 family members has been well-described and may serve as a means to regulate their function. Recent studies have shown that the multidomain pro-apoptotic Bax and Bak proteins are essential to cell death by a variety of apoptotic stimuli. However, recent evidence suggests that after a death signal, BH3-domain only molecules may act as 'sensitizing' molecules: they bind to and sequester their anti-apoptotic counterparts like Bcl-2 and Bcl-xL, inhibiting their activities, or they rather behave as 'activating' proteins: they bind the multidomain Bax- α and Bak, inducing conformational changes that promote their translocation, insertion and activation in the OMM (23).

To explore the formation of multimeric protein complexes involving pro-apoptotic proteins that target the mitochondria in CPT-treated, p53-defective Namalwa cells, protein extracts obtained from control and CPT-treated cells were subjected to gel filtration chromatography (Fig. 5). Protein extracts were prepared in CHAPS, because this detergent has no effect on Bax- α quaternary structure compared to Triton X-100 (36, 37). Gel filtration chromatography, followed by Western blot analysis of the multiple collected fractions, allowed us to separate and monitor proteins of interest within a large range of molecular masses, revealing multi-oligomers and complex formation. For the detection of a given protein, a shift toward fractions of higher molecular weight (left on gels) indicates that the protein assembles in a larger complex during the course of apoptosis induced by CPT.

Similarly, a shift toward fractions of lower molecular weight (right on gels) implies that the protein assembles within a smaller protein complex.

The elution profiles of Bax- α , obtained after drug treatment, showed a shift of the molecule toward fractions of higher molecular weight (fractions 26-30), compared to its detection in control (untreated) cells (fractions 31-36) (Fig. 5). This suggested that Bax- α formed new homo- or hetero-oligomers with estimated molecular masses ranging from 200 to 500 kDa, as soon as 2 h after DNA damage induction. Some higher complexes could also be seen, 4 h after CPT treatment. In contrast, Bak, which was found at fractions 28 to 31 in control cells, shifted slightly by 1 fraction to the right after CPT treatment (Fig. 5). The non-overlapping Bax- α and Bak elution profiles in control (untreated) cells, and their co-elution in some fractions after CPT treatment (in fractions 28-32) indicate that fractions of the 2 molecules could be part of similar complexes after CPT. In control cells, the BH3-domain only Bik protein eluted in fractions 31-35 (Fig. 5), the latter corresponding to a small molecular mass close to the apparent molecular mass of monomeric Bik (26.5 kDa). Interestingly, Bik progressively disappeared from fractions 34-35 after CPT treatment, and after 4 h, it was no longer detected as a monomer, eluting mainly as a single peak, at an estimated molecular mass of 67 kDa (Fig. 5). This behaviour suggests that Bik preferentially forms dimeric or trimeric protein complexes with itself or with other Bcl-2 family members after apoptosis induction. In control cells, Bim-EL eluted within high molecular weight fractions, covering a range of approximately 400 to 600 kDa (fractions 25-28) (Fig. 5). This was partly anticipated, because Bim-EL has been reported to be associated with the large dynein motor complex in unstimulated cells, and is subsequently released after a variety of apoptotic stimuli (38). Unexpectedly, after CPT treatment, Bim-EL was found in

fractions of higher molecular mass (> 669 kDa). These new complexes formed with Bim-EL seem clearly distinct from those formed with Bak and Bik.

Anti-apoptotic Bcl-2 elution profiles were also monitored to investigate the potential hetero-oligomerization between pro- and anti-apoptotic counterparts. Interestingly, the behaviour of Bcl-2 after CPT treatment was similar to that observed with Bak and Bik, Bcl-2 shifting to lower molecular mass complexes after CPT treatment (Fig. 5). Nevertheless, the elution profile of Bcl-2 overlaps with fractions containing Bax- α , Bak, Bik and Bim after CPT treatment, so that hetero-oligomer formation between these proteins is possible.

Finally, because many pro-apoptotic proteins that translocate to the mitochondria could bind to mitochondrial VDAC1, a component of the mPTP, we also monitored the elution profiles of VDAC1. The antibody used to detect VDAC1 is specific for human VDAC1, with no significant cross-reactivity toward the other human isoform hVDAC2 (39, 40). In control cells, VDAC1 eluted in most fractions of molecular mass inferior to 669 kDa (fractions 25-36), reflecting the variable state of mPTP. However, after CPT treatment, VDAC1 shifted to molecular weight fractions superior to 669 kDa (fractions 16-24), in addition to its elution in almost all the other fractions (Fig. 5). These results suggested that early during apoptosis, VDAC1, and presumably mPTP, formed complexes with a higher degree of magnitude. Interestingly, Bim-EL and Bax were also found in fractions > 669 kDa after CPT treatment.

To further analyze the interaction between Bcl-2 protein family members, co-immunoprecipitation (IP) experiments were conducted to dissect the composition of the high molecular weight complexes obtained by gel filtration. The co-immunoprecipitation experiments were performed from mitochondria-enriched fractions prepared from Namalwa control and CPT-treated cells. Also, mitochondria-

enriched fractions were incubated with DSP cross-linker, to stabilize protein interactions and to ease the detection of other proteins in the Bax, Bak and Bim immunocomplexes. The results are presented in Figure 6. A higher amount of Bax protein was immunoprecipitated from mitochondrial extracts 3 h after CPT compared to the amount obtained from untreated mitochondria (Fig. 6A), which correlated with the mitochondrial relocation of Bax (Fig. 4). VDAC1 and Bak proteins co-precipitated with Bax, and the interactions between Bax, VDAC1 and Bak were clearly more pronounced 3 h after CPT treatment (Fig. 6A). The BH3-only Bik and Bim-EL, and anti-apoptotic Bcl-2 proteins, were absent from Bax immunocomplexes (Fig. 6A).

A greater amount of Bak was also immunoprecipitated after CPT treatment (Fig. 6B), in accordance with the mitochondrial translocation of Bak (Fig. 4). VDAC1 was co-detected with Bak immunocomplexes, and the interaction appeared to be slightly greater 3 h after CPT treatment (Fig. 6B). The Bak immunocomplexes obtained from CPT-treated mitochondria also contained Bax (Fig. 6B), correlating with the Bax/Bak interaction seen in Figure 6A. Interestingly, Bik, Bim-EL and Bcl-2 did not co-immunoprecipitate with Bak (Fig. 6B), similarly to their absence from Bax immunocomplexes.

The 3 major Bim isoforms, Bim-EL, -L and -S were immunoprecipitated from mitochondria-enriched fractions with the same rabbit polyclonal anti-Bim antibody (Fig. 6C). However, unlike the results obtained when Bax and Bak were immunoprecipitated (Fig. 6A and 6B), smaller amounts of Bim-EL immunocomplexes were detected after CPT treatment, compared to the amounts immunoprecipitated from untreated mitochondria (Fig. 6C). VDAC1 co-precipitated with Bim, and the intensity of the Bim-VDAC1 interaction correlated with the quantity of Bim immunoprecipitated before and after CPT treatment. The

multidomain Bax and Bak were absent from the Bim immunocomplexes (Fig. 6C), and the BH3-only Bik was not co-precipitated with Bim (Fig. 6C). Interestingly, the anti-apoptotic Bcl-2, which was absent from the Bax and Bak immunocomplexes, was co-precipitated with Bim, and the Bim/Bcl-2 interaction seemed more pronounced after CPT treatment, considering that less Bim is immunoprecipitated at this time point (Fig. 6C).

In these experiments, negative controls were performed with a mixture of normal rabbit IgG (Fig. 6A, B, C, first panels) and also, none of the Bcl-2 family members co-immunoprecipitated with the mitochondrial Cox IV protein (data not shown). Finally, Bik and Bcl-2 proteins could not be immunoprecipitated with the rabbit polyclonal *FL-160* antibody (Santa Cruz Biotechnology) and the mouse monoclonal *100* antibody (Santa Cruz Biotechnology), respectively.

Mitochondrial relocation of Bax- α after CPT treatment in p53^{-/-} human U-937 cells following DNA damage induction.

Bax- α translocation to mitochondria has been often associated with p53 after DNA damage. To investigate if the described mitochondrial relocation of the pro-apoptotic protein Bax- α is part of a general p53-independent death pathway or a phenomena inherent to Namalwa cells, the subcellular localization of pro-apoptotic Bax- α was analyzed in the p53-defective human histiocytic U-937 cell line, which showed rapid and similar kinetics of apoptosis after CPT treatment compared to Namalwa cells (41). Highly purified mitochondrial fractions were prepared according to the method of metrizamide/Percoll density gradients, and analyzed for the presence of Bax- α and VDAC1 proteins by Western blotting (Fig. 7). Our results demonstrated that 4 h after CPT treatment, Bax- α was already translocated to the

mitochondria of U-937 cells (Fig. 7), suggesting its participation in the mitochondrial events that lead to apoptotic death in p53-deficient U-937 cells.

DISCUSSION

Proteins of the Bcl-2 family are well-known regulators of apoptosis. The balance between pro- and anti-apoptotic members influences and may determine cell sensitivity toward many death-inducing stimuli, including anti-cancer drugs. The p53 tumor suppressor protein is another major determinant of the apoptotic response after radiotherapy and chemotherapy. The p53-mediated apoptotic pathways have been the subject of extensive research in the last several years, revealing molecular links between p53 activation after DNA damage and initiation of the apoptotic program (6).

Several pro-apoptotic genes have been shown to be under the transcriptional control of p53, and their activation may promote cell death in various ways. The *Bax* gene was one of the first p53-dependent apoptotic targets to be identified (42), then other members of the Bcl-2 family were reported to be p53-downstream targets, such as the BH3-only members *Puma* (43) and *Noxa* (44). In *Bax*^{-/-} and *p53*^{+/+} human colon carcinoma HCT116 cells, upregulation of Bak mRNA and protein was also observed recently after CPT and etoposide (VP-16) treatments (45). In all these cases, the activated proteins behaved principally to promote the mitochondrial pathway of apoptosis after p53 activation. Other studies have also revealed the p53-dependent induction of some cell death receptors after DNA damage, including *Fas* and *DR5* genes (46, 47), and a series of genes known as p53-inducible genes (*PIGs*). Some of these genes, such as *PIG3*, have the potential to increase the levels of reactive oxygen radicals, and thus induce oxidative stress and apoptosis (48).

In the field of cancer research, much less attention has been given to the apoptotic pathways that participate in the absence of p53. These p53-independent pathways are rather poorly understood, although the great majority of human tumors

are defective in functional p53 expression and most likely represent difficult targets in cancer therapies. Thus, the current study was undertaken to investigate the molecular mechanisms underlying the apoptotic pathways that are not mediated by the activation of p53 protein after cellular DNA damage. We demonstrate here, using a p53-defective human B lymphoma cancer cell line, that several pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family are rapidly induced and/or translocated to the mitochondria after DNA damage, where they assemble themselves in distinct multimeric protein complexes.

Our data show that the pro-apoptotic BH3-only Bik, Bim-EL, -L and -S proteins were rapidly induced in Namalwa cells as early as 1 h after CPT treatment. The increase in Bim-EL protein expression may be explained by the elevation of its coding mRNA, while the quick increment of Bik protein expression was not fully correlated with its measured mRNA levels, which did not rise significantly. These results suggest that transcriptional activation cannot by itself explain the sudden heightening of protein levels. In general, cells treated with CPT also exhibit a high degree of heterogeneity in their ubiquitin/proteasome pathway responses (49). The ubiquitin/proteasome system plays a major role in the degradation of cellular proteins involved in diverse cellular processes, including cell death regulation (50), and proteasome inhibitors induce apoptosis in a variety of cancer and transformed cell lines, including Namalwa and U-937 cells (34, 51). Low ubiquitin/proteasome activities slow DNA topoisomerase I down-regulation, increasing the stabilization of DNA topoisomerase I-CPT cleavable complexes (49, 52). In addition to the effect on DNA topoisomerase I enzyme, low ubiquitin/proteasome activities could alter the levels of Bik and Bim expression in Namalwa cells. Supporting evidence comes from studies that reported: 1. the rapid stabilization and accumulation of Bik at the mitochondria in T and B cells, including Namalwa cells, after proteasome inhibition

(34); 2. the accumulation of Bax- α protein, a direct target of the ubiquitin/proteasome system, upon proteasome inhibition in Jurkat T cells (53); and 3. the ubiquitination and degradation of the truncated Bid fragment by 26-S proteasome in COS-7 cells (54).

Heightened Bim expression, at the protein level, has also been reported previously. According to these studies, the BH3-only Bim protein is required for hematopoietic homeostasis, serves as a barrier to autoimmunity, and is necessary for the apoptotic response after certain death stimuli (55). Bim-EL and Bim-L proteins have been shown to increase on T-cell receptor stimulation and are included in complexes with the anti-apoptotic Bcl-xL, inhibiting its survival function, and triggering apoptosis in autoreactive T cells (56). Others have reported upregulation of Bim mRNA and Bim-EL, -L and -S proteins in Baf-3 murine lymphoid cells, upon interleukin-3 starvation, but also after etoposide treatment (57). This latter observation supported the participation of Bim in the apoptotic response after DNA damage. In sympathetic neurons, activation of the JNK/c-JUN pathway has been proposed to account for the increase in Bim mRNA and Bim-EL protein, making the *Bim* gene a new potential target for c-Jun transcription factor (58). More recently, FoxO3a and E2F1 transcriptional regulation of Bim was also associated with induction of apoptosis in MDA-231 breast cancer and NIH3T3 cell lines, respectively (59, 60).

Interestingly, no variation was noted in the expression pattern of multidomain Bax, neither at the mRNA nor at the protein level. Because numerous studies have demonstrated that the induction of *Bax* gene is under the control of p53 (42, 61), this observation was not surprising in the context of p53-deficient Namalwa cells. Similarly, mRNA and protein levels of multidomain Bak did not increase significantly after DNA damage.

The induction of few pro-apoptotic Bcl-2 family proteins was a first indication of their participation in the apoptotic response after CPT treatment. Although the up-regulation of Bik and Bim proteins suggested their involvement, their subcellular relocalization was a more crucial event to monitor. We observed that multidomain Bax- α relocalized to the mitochondria of p53-defective Namalwa cells after drug treatment. In addition, Bax- α formed new high molecular weight oligomers (200 to 500 kDa) in apoptotic cells. Antonsson et al. obtained a similar Bax- α elution profile by gel filtration, although they analyzed mitochondrial extracts of staurosporine-treated HeLa cells (62). Even though Bax- α expression was not up-regulated after CPT treatment in Namalwa cells, its targeting to the mitochondrial membrane, where it seems to assemble in large oligomers, surely contributed to disturb the mitochondria and caused cytochrome *c* release.

Unlike Bax- α , inactive Bak monomers appear to reside mostly in the mitochondria, and various death stimuli could induce conformational changes with its subsequent activation (17). The stronger Bak expression in mitochondria as early as 1 h after CPT treatment could result from the rapid insertion and stabilization of newly-synthesized Bak molecules in the mitochondrial membranes, possibly followed by changes in conformation and activation. Conformational modifications and/or activation may cause the small shift in elution profiles of Bak seen after CPT treatment. The co-elution of Bax- α and Bak in some fractions obtained by gel filtration chromatography also suggests that the two proteins may be part of the same complexes in apoptotic cells, where they could interact with mPTP and/or assemble themselves into mitochondrial channels. To further distinguish between these possibilities, the composition of the high molecular weight protein complexes observed by gel filtration chromatography was dissected in IP studies. The results demonstrated that soon after CPT treatment, multidomain Bax- α and Bak bind to

each other, and that Bax and Bak also interact with VDAC1, the most abundant protein of mPTP. Interestingly, the BH3-only Bim and Bik proteins are absent from the Bax and Bak immunocomplexes, as well as the anti-apoptotic Bcl-2. To the best of our knowledge, this was the first time that Bax/VDAC1 and Bak/VDAC1 endogenous protein complexes were detected in human cells after DNA damage induction. Moreover, the similarity between Bax and Bak binding partners supports the recent findings that Bax and Bak function in a similar and redundant manner after numerous death signals (24, 25). Thus, mitochondrial relocalization of the multidomain Bax- α and Bak proteins, as well as their assembly into multiprotein complexes, including mitochondrial VDAC1, may well represent a key event to destabilize the mitochondria and induce apoptosis in Namalwa cells.

We also noted that the BH3-only proteins Bik, Bim-EL, Bim-L and possibly Bim-S targeted the mitochondria in the first h after drug treatment. In addition to interacting with the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL, Bik has been proposed to promote cell death independently of such interactions (34, 63, 64). The early relocalization of Bik protein to the mitochondria and the complete disappearance of Bik as a monomer in CPT-treated cells suggest that Bik may also participate in mitochondrial dysfunction through its assembly with other Bik molecules or with distinct proteins. Bik is clearly absent from the Bax, Bak and Bim immunocomplexes, and, unfortunately, we failed to immunoprecipitate Bik from mitochondria-enriched fractions as well as from whole cell extracts (*data not shown*) with the FL-160 antibody. Thus, Bik did not bind to Bax, Bak, or Bim and the action of Bik at the mitochondria remains to be further defined.

Bim-EL and Bim-L are known to be released from the microtubule-associated dynein motor complex upon apoptotic signals, and like other BH3-only molecules, once unleashed, they have been proposed to translocate to the

mitochondrial membrane and/or interact with anti-apoptotic proteins to inhibit their activity (38). Yamaguchi and Wang have recently reported that Bim-EL, analogous to its tBid counterpart, once translocated to the mitochondria, is able to trigger Bax conformational change and subsequent insertion in the mitochondrial membrane, followed by cytochrome c release and apoptotic death (65). In addition, Bim-EL may also participate in inducing apoptosis by interacting directly with mitochondrial VDAC1 to enhance its channel activity (66). In contrast, others have reported that the second most abundant isoform of Bim, Bim-L, cannot directly activate Bax and induces apoptosis only by binding to and inhibiting anti-apoptotic proteins, which freed multidomain Bax and Bak and permitted them to be activated at the mitochondrial level (67). From these studies, it is clear that Bim is a potent apoptosis inducer, and the mitochondrial translocation that we observed for Bim-EL and Bim-L proteins, as well as the formation of high molecular weight Bim-EL oligomers in apoptotic cells, strongly indicates that Bim is involved in the apoptotic response of Namalwa cells after CPT treatment.

The IP experiments revealed, for the first time, an association between endogenous Bim and VDAC1 in human cells. Interestingly, the anti-apoptotic Bcl-2 was also co-precipitated with Bim, while the multidomain Bax- α and Bak proteins did not associate with Bim or the BH3-only Bik. Thus, the BH3-only Bim behaved differently from the multidomain Bax- α and Bak after DNA damage induction in p53-deficient cells. Our results suggest that after DNA damage induction Bim binds to Bcl-2, probably to inhibit its anti-apoptotic function and to facilitate the execution of apoptotic death. Thus, Bim acts as a BH3-only “sensitizer” molecule rather than an “activator” protein in these cells. The anti-Bim antibodies used in this study precipitated the 3 isoforms of Bim (-EL, -L, -S), so that it is difficult to assess a specific role for each isoform. According to the elution profile of Bim-EL, VDAC1

and Bcl-2, after gel filtration chromatography, the IP of VDAC1 with Bim-EL was expected while the IP of Bim-EL with Bcl-2 was unexpected. Hence it is possible that either Bim-L or Bim-S binds to Bcl-2. In addition, interaction of the BH3-only proteins with other anti-apoptotic members (e.g. Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w) cannot be ruled out. Our study demonstrates that Bim does not interact with multidomain Bax and Bak. However, Bim could possibly promote mPTP opening via its direct association with VDAC1 (66, 68), or through its sole insertion into the mitochondrial membrane, where it could destabilize the lipid bilayer and cause outer mitochondrial membrane rupture (69).

In conclusion, mitochondrial relocation of some BH3-only proteins with the multidomain Bax and Bak, followed by their assembly in specific high molecular weight complexes, including Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim-VDAC1 and Bim-Bcl-2, may contribute to the mitochondrial destabilization events leading to apoptosis after DNA damage in p53-deficient cells.

ABBREVIATIONS

The abbreviations used are: Ac-DEVD-AMC, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl coumarin; Ac-LEHD-AFC, acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin; BH, Bcl-2 homology; COX IV, cytochrome *c* oxydase subunit IV; CPT, 20-S-camptothecin lactone; DSP, dithiobis[succinimidylpropionate]; Ig, immunoglobulin; IMM, inner mitochondrial membrane; IP, immunoprecipitation; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; OMM, outer mitochondrial membrane; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential; tBid, truncated Bid; VDAC, voltage-dependent anion channels.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society to R.B. R.B is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. C.P. obtained a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. The authors thank Mr. Ovid Da Silva (Research Support Office, Research Centre, CHUM) for the editorial work on this manuscript.

REFERENCES

1. 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.
2. Rudin, C. M. and Thompson, C. B. (1997) Apoptosis and disease. Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med*. 48: 267-281.
3. Kohn, K. W., Jackman, J., and O'Connor, P. M. (1994) Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J Cell Biochem*. 54: 440-452.
4. Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., and Housman, D. E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 74: 957-967.
5. Lowe, S. W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H. E., Fisher, D. E., Housman, D. E., and Jacks, T. (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 266: 807-810.
6. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002) Apoptosis. A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108: 153-164.
7. Cory, S., Huang, D. C., and Adams, J. M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22: 8590-8607.
8. Martinou, J. C. and Green, D. R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 63-67.
9. Kluck, R. M., Bossywetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275: 1132-1136.

10. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science*. 275: 1129-1132.
11. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91: 479-489.
12. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399: 483-487.
13. Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 67-71.
14. Bossywetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998) Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J*. 17: 37-49.
15. Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13: 1899-1911.
16. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 144: 891-901.
17. Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes Bak to release cytochrome c. *Genes Dev*. 14: 2060-2071.

18. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20: 929-935.
19. Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol.* 155: 725-732.
20. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 277: 370-372.
21. Schendel, S. L., Xie, Z. H., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J. C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 94: 5113-5118.
22. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 94: 11357-11362.
23. Letai, A., Bassik, M., Walensky, L., Sorcinelli, M., Weiler, S., and Korsmeyer, S. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2: 183-192.
24. Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. (2000) The

- combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*. 6: 1389-1399.
25. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292: 727-730.
 26. 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.
 27. Storrie, B. and Madden, E. A. (1990) Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol*. 182: 203-225.
 28. 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.
 29. Bertrand, R., Solary, E., Jenkins, J., and Pommier, Y. (1993) Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp Cell Res*. 207: 388-397.
 30. 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.
 31. O'Connor, P. M., Jackman, J., Jondle, D., Bhatia, K., Magrath, I., and Kohn, K. W. (1993) Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res*. 53: 4776-4780.

32. Sané, A. T., Schmitt, E., Steyaert, A., Meyer, D., and Bertrand, R. (1997) The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis: relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation. *Biochem Cell Biol.* 75: 359-368.
33. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J., and Bertrand, R. (2000) Characterization of Bax- σ , a novel cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem Biophys Res Commun.* 270: 868-879.
34. Marshansky, V., Wang, X., Bertrand, R., Luo, H., Duguid, W., Chinnadurai, G., Kanaan, N., Vu, M. D., and Wu, J. (2001) Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J Immunol.* 166: 3130-3142.
35. Sanchez-Alcazar, J. A., Khodjakov, A., and Schneider, E. (2001) Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res.* 61: 1038-1044.
36. Hsu, Y. T. and Youle, R. J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem.* 273: 10777-10783.
37. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* 345: 271-278.
38. Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is

- regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 3: 287-296.
39. Winkelbach, H. and Walter, G. (1994) Studies on human porin. *Biochem Med Metab Biol.* 52: 120-127.
 40. Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J., and Korsmeyer, S. J. (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science.* 301: 513-517.
 41. 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.
 42. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 9: 1799-1805.
 43. Nakano, K. and Vousden, K. H. (2001) Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 7: 683-694.
 44. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288: 1053-1058.
 45. LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D., and Ashkenazi, A. (2002) Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med.* 8: 274-281.
 46. Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., and Kruzel, E.

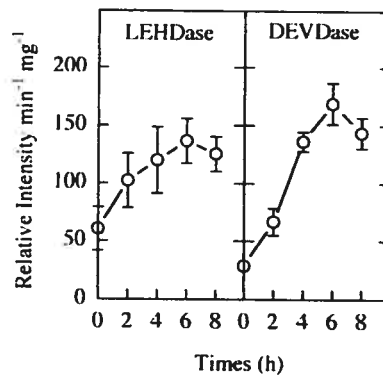
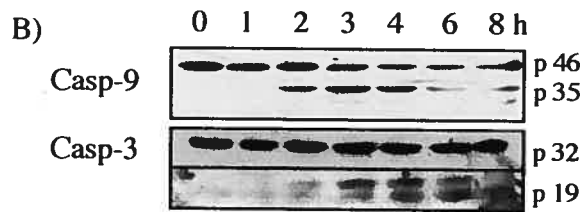
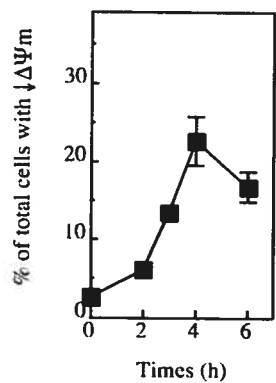
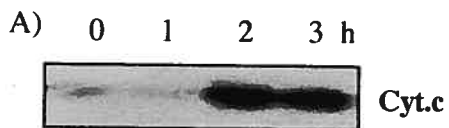
- (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 15: 3032-3040.
47. Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D.-D., Zhou, J.-Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W. S. (1997) Killer/DR5 is a DNA-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet.* 17: 141-143.
48. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) A model for P53-induced apoptosis. *Nature.* 389: 300-305.
49. Desai, S. D., Li, T. K., Rodriguez-Bauman, A., Rubin, E. H., and Liu, L. F. (2001) Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res.* 61: 5926-5932.
50. Dou, Q. P. and Li, B. (1999) Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Update.* 2: 215-223.
51. Imajohohmi, S., Kawaguchi, T., Sugiyama, S., Tanaka, K., Omura, S., and Kikuchi, H. (1995) Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 217: 1070-1077.
52. Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D., and Liu, L. F. (2000) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 4046-4051.
53. Li, B. and Dou, Q. P. (2000) Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 3850-3855.

54. Breitschopf, K., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2000) Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem.* 275: 21648-21652.
55. Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., and Strasser, A. (1999) Proapoptotic bcl-2 relative bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286: 1735-1738.
56. Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature.* 415: 922-926.
57. Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P. J., Look, A. T., Ozawa, K., and Inaba, T. (2001) Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol.* 21: 854-864.
58. Whitfield, J., Neame, S. J., Paquet, L., Bernard, O., and Ham, J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron.* 29: 629-643.
59. Sunters, A., Fernandez de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J. J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C. A., Coffey, P. J., Medema, R. H., Coombes, R. C., and Lam, E. W. (2003) FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem.* 278: 49795-49805.

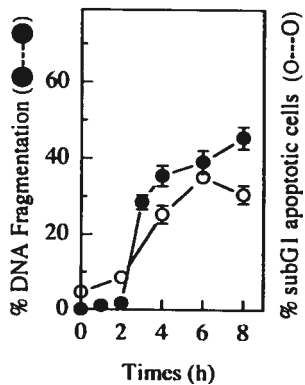
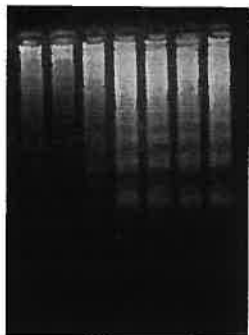
60. Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem.* 279: 8627-8634.
61. Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene.* 9: 3743-3751.
62. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 276: 11615-11623.
63. Elangovan, B. and Chinnadurai, G. (1997) Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik: heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem.* 272: 24494-24498.
64. Germain, M., Mathai, J. P., and Shore, G. C. (2002) BH-3-only Bik functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem.* 277: 18053-18060.
65. Yamaguchi, H. and Wang, H. G. (2002) Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome c release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem.* 277: 41604-41612.
66. Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (2002) Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene.* 21: 4944-4956.
67. Terradillos, O., Montessuit, S., Huang, D. C., and Martinou, J. C. (2002) Direct addition of BimL to mitochondria does not lead to cytochrome c release. *FEBS Lett.* 522: 29-34.

68. Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. (2000) Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 97: 577-582.
69. Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y. T., Zimmerberg, J., and Youle, R. J. (1999) Bax, but not Bcl-x(L), decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 96: 5492-5497.

Fig.1



C) 0 1 2 3 4 6 8 h



D)



Namalwa control



Namalwa + CPT

Fig. 1. Kinetics of apoptosis after camptothecin (CPT) treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

A. Cytochrome *c* release and loss of mitochondrial transmembrane potential.

Upper panel : Analysis of cytochrome *c* release in Namalwa cells treated with CPT. Cytosolic fractions (S-100) were prepared, as described in Materials and Methods, from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). S-100 fractions were analyzed for the presence of cytochrome *c* by SDS-PAGE (50 μ g of proteins per lane) and electrophoretic transfer. Cytochrome *c* expression was detected using anti-cytochrome *c*-specific antibodies, then visualized by enhanced chemiluminescence and film exposure.

Lower panel : Disruption of mitochondrial transmembrane potential was assessed by JC-1 staining. At the indicated times (h) after CPT treatment, 1×10^6 cells were incubated with 10 μ g/ml JC-1 in complete culture medium for 15 min prior to flow cytometry analysis. Points represent the mean \pm SE of 4 independent experiments.

B. Kinetics of pro-caspase-9 and pro-caspase-3 activation.

Upper panels : Active caspase-9- and -3-cleaved fragments were detected by Western blotting experiments in Namalwa cells treated with CPT. Whole-cell extracts were prepared, as indicated in Materials and Methods, from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). After SDS-PAGE and electrophoretic transfer, the caspase pro-forms and cleaved fragments were revealed using anti-caspase-9- and anti-caspase-3-specific antibodies, then visualized by enhanced chemiluminescence and film exposure.

Lower panels: Kinetics of LEHDase (pro-caspase-9) and DEVDase (pro-caspase-3-like) activities were determined from cytosolic extracts prepared, as described, from control (0 h) and treated cells at the times indicated (x axis) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). LEHDase and DEVDase activities were monitored continuously at

37°C by detecting fluorescence emission in the presence of Ac-LEHD-AFC (500 μM) at an excitation wavelength of 400 nm and an emission wavelength of 505 nm, and in the presence of Ac-DEVD-AMC (200 μM) at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm, respectively. Caspase activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg. Points represent the mean \pm SE of 5 (caspase-9) and 8 (caspase-3) independent experiments.

C. DNA fragmentation.

Upper panel: Analysis of DNA fragmentation in CPT-treated Namalwa cells by agarose gel electrophoresis. At the times indicated (h) after CPT treatment (1.0 μM for 30 min), total DNA was extracted and oligonucleosome-sized DNA fragments were visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

Lower panel: Kinetics and extent of DNA fragmentation in CPT-treated Namalwa cells. ^{14}C -Thymidine-labeled cells were treated with 1.0 μM CPT for 30 min. At the times (h) indicated after CPT treatment (x axis), DNA fragmentation was determined by DNA filter elution assays (close circle). The results are expressed as the percentage of DNA fragmentation. The points represent the means \pm SE of 3 independent experiments. In parallel, the percentage of cells presenting hypoploid DNA content was measured in CPT-treated Namalwa cells.. Cells were treated with CPT (1.0 μM for 30 min), stained with PI and analyzed by flow cytometry (open circle). The results are expressed as the percentage of cells showing sub-G1 DNA content. The points represent the means \pm SE of 3 independent experiments.

D. Morphological changes. Morphological changes of CPT-treated Namalwa cells were visualized by electron microscopy. Electron micrographs show the cellular morphology of control and treated cells (1.0 μM CPT for 30 min), collected and processed 4 h after treatment.

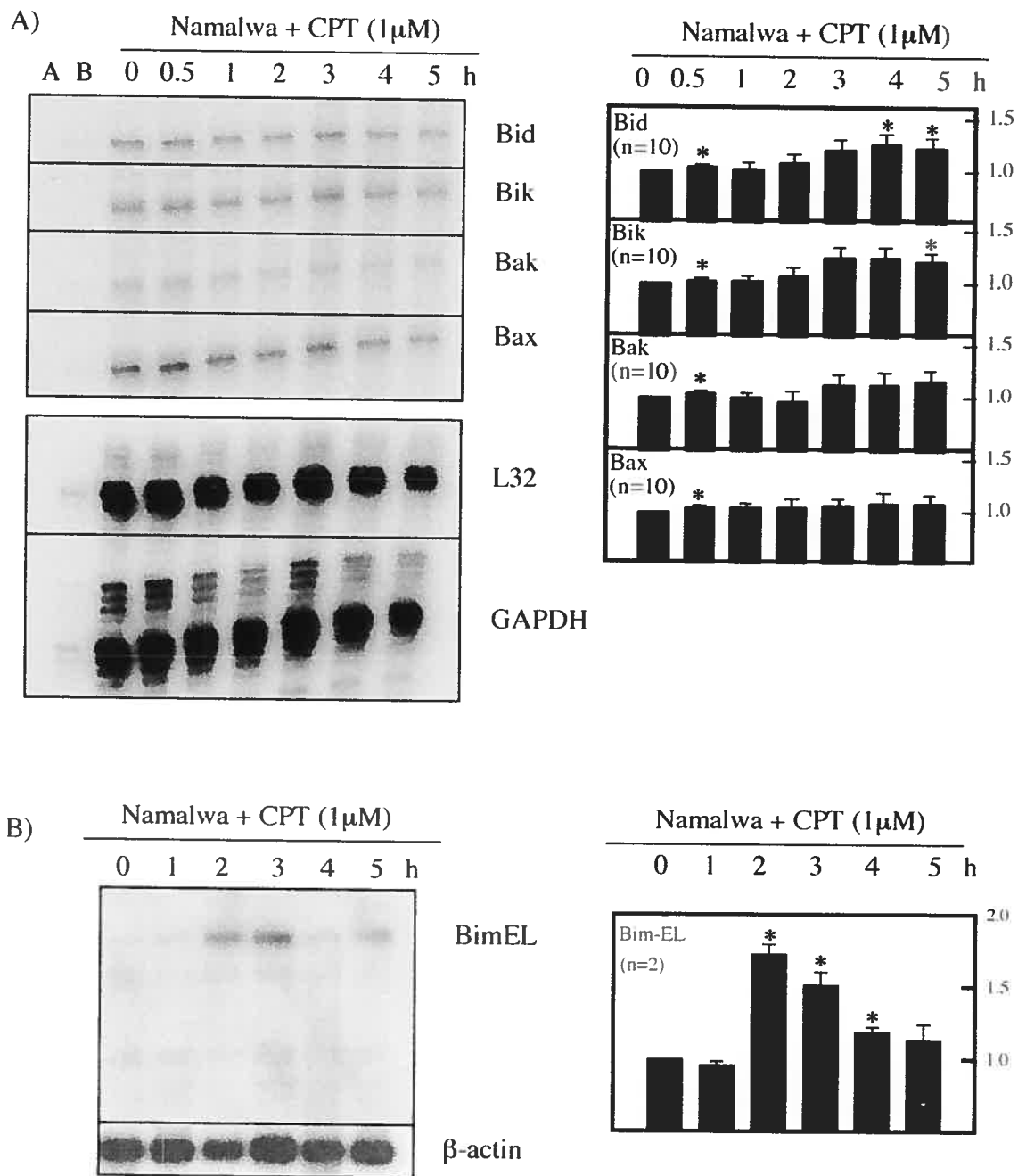
Fig.2

Fig. 2. Kinetics of Bcl-2 family member mRNA expression following CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

A. Left panels: Analysis of Bid, Bik, Bak, and Bax mRNA levels by RNase protection assays in CPT-treated Namalwa cells. Total RNA was isolated, as described in Materials and Methods, from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). [α - 32 P] dUTP-labeled multi-cRNA probes were hybridized with 15 μ g total RNA for 16 h per assay. After digestion and precipitation, the protected fragments were separated on 5% polyacrylamide urea gel by electrophoresis and visualized by autoradiography. L32 and GAPDH were used as loading controls. Lane A shows multi-cRNA probes digested with the RNase cocktail. Lane B shows Pharmingen control RNA subjected to RNase protection assay

Right panels: Relative densitometry analysis of autoradiographs based on integrated density value (IDV). The relative amount of each protected RNA fragment after CPT treatment was quantitated and normalized to the amount of protected RNA fragment in control cells using the formula (IDV/IDV_o) , where IDV and IDV_o represent the IDV of protected RNA fragments obtained from treated and control cells, respectively. The data are expressed as relative intensity values normalized to GAPDH and L32 intensity levels and represent the means \pm SE of n autoradiographs from 5 independent experiments. Significance with unpaired Student's t -test: * $p < 0.05$.

B. Left panels: Analysis of Bim-EL mRNA levels by Northern blotting experiments. PolyA⁺ RNA was isolated from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min), and 3.5- μ g aliquots were loaded per lane. Membranes were hybridized with [α - 32 P] dATP-labeled Bim-EL or β -actin

cDNA probes in 5x SSPE, 50% formamide, 5% Denhardt's solution, 1% SDS, 10% dextran sulfate and 100 $\mu\text{g/ml}$ salmon sperm at 42°C for 16 h, followed by washes in 2x SSPE at 30°C, and 2x SSPE containing 2% SDS, at 65°C.

Right panels: Relative densitometry analysis of autoradiographs based on integrated density value (IDV). The data are expressed as relative intensity values normalized to β -actin intensity levels and represent the means \pm SE of n autoradiographs from 2 independent experiments. Significance with unpaired Student's t -test: * $p < 0.05$.

Fig.3

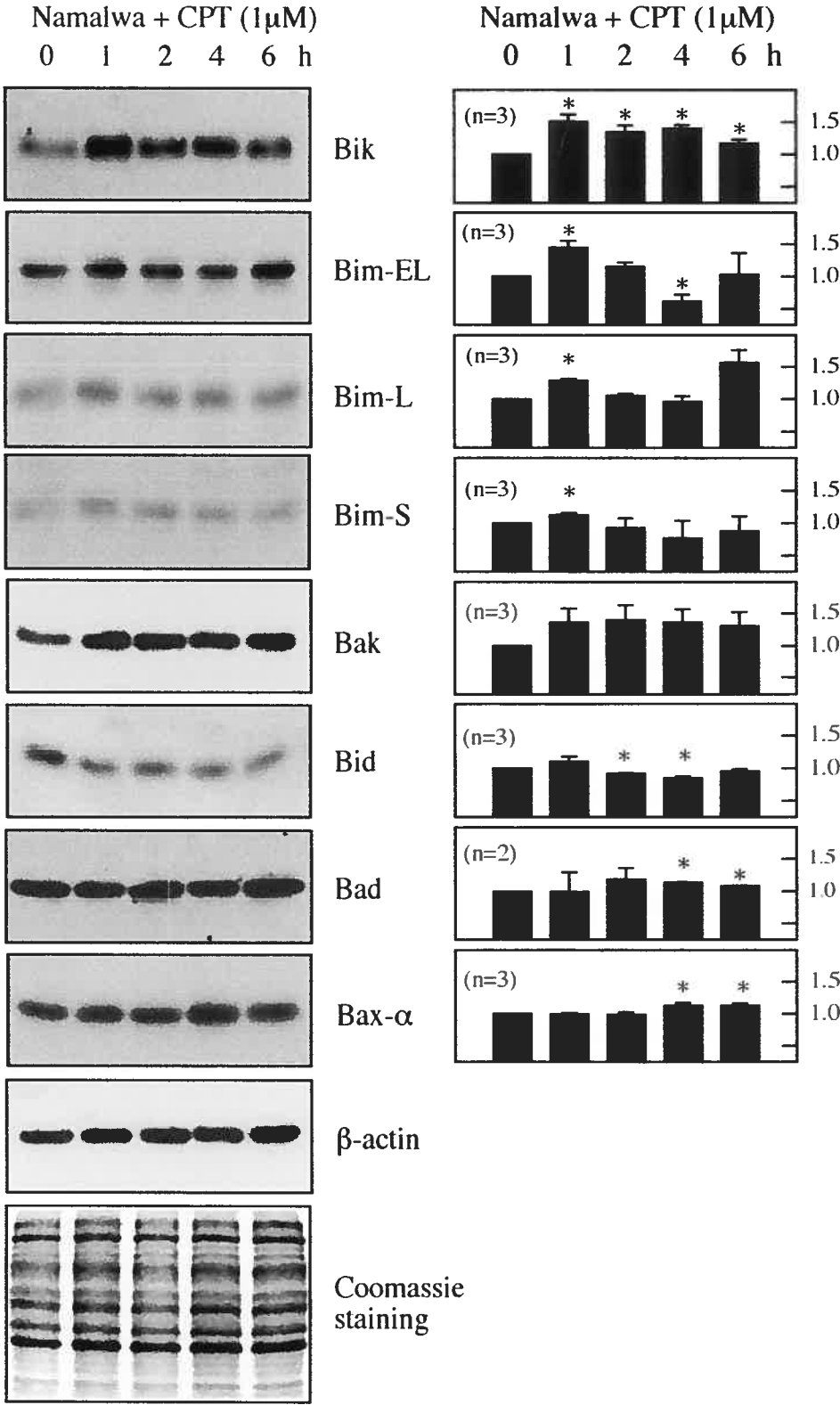


Fig. 3. Kinetics of expression of pro-apoptotic Bcl-2 family member after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

Left panels : The expression level of pro-apoptotic Bik, Bim-EL, Bim-L, Bim-S, Bak, Bid, Bad and Bax- α proteins in CPT-treated Namalwa cells was monitored by Western blotting. Whole-cell extracts were prepared from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min), and analyzed on SDS-PAGE (100 μ g total proteins per lane) and by Western blotting with specific antibodies. Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence and film exposure. The bottom panel is a loading control showing SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 dye. Representative of 3 independent experiments.

Right panels: Relative densitometric analysis of autoradiographs based on integrated density value (IDV). The data represent the means \pm SE of n independent experiments. Significance with unpaired Student's t -test: * $p < 0.05$.

Fig.4

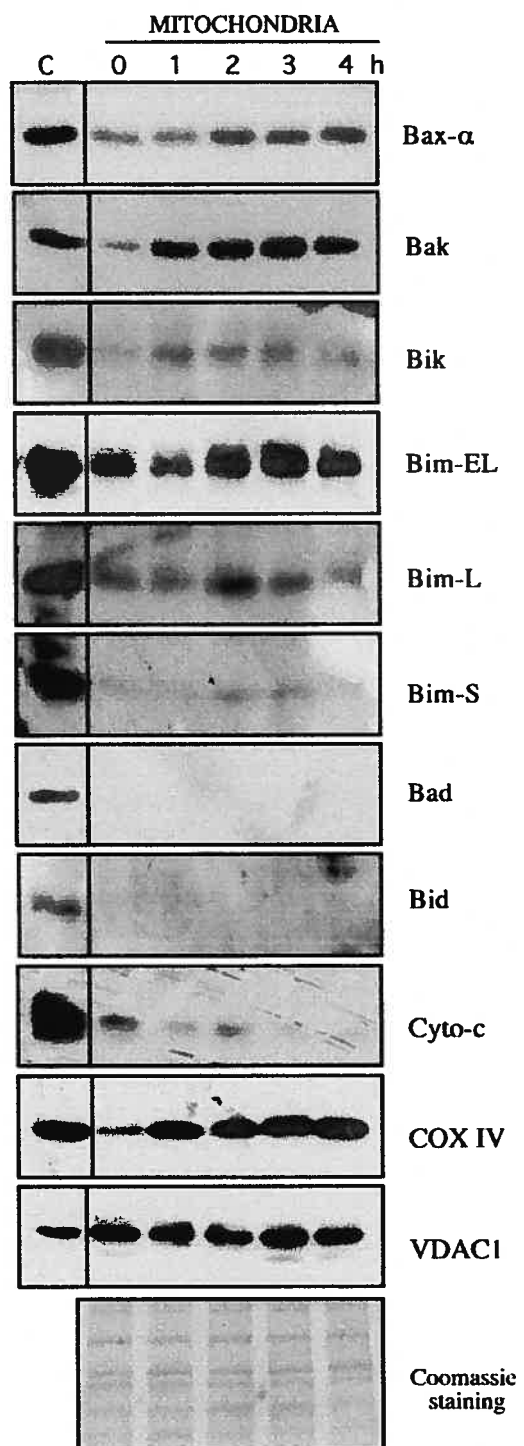


Fig. 4. Mitochondrial relocation of pro-apoptotic Bcl-2 family members after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

Western blot analysis of pro-apoptotic Bax, Bak, Bik, Bim-EL, Bim-L, Bim-S, Bad and Bid expression in mitochondria isolated from Namalwa cells treated with CPT. Cytochrome *c*, cytochrome oxidase subunit IV (COX IV) and voltage-dependant anion channels (VDAC1) were used as mitochondrial markers. Mitochondrial fractions were prepared according to the method of metrizamide/Percoll density gradients detailed in Materials and Methods, from control (0 h) and treated cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). Lane C shows protein expression in whole-cell extracts prepared from control Namalwa cells. Mitochondrial fractions were analyzed by SDS-PAGE (10 μ g of proteins per lane); proteins of interest were detected by blotting with specific antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence and film exposure. The bottom panel is a loading control showing SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 dye. Representative of 3 independent experiments.

Fig.5

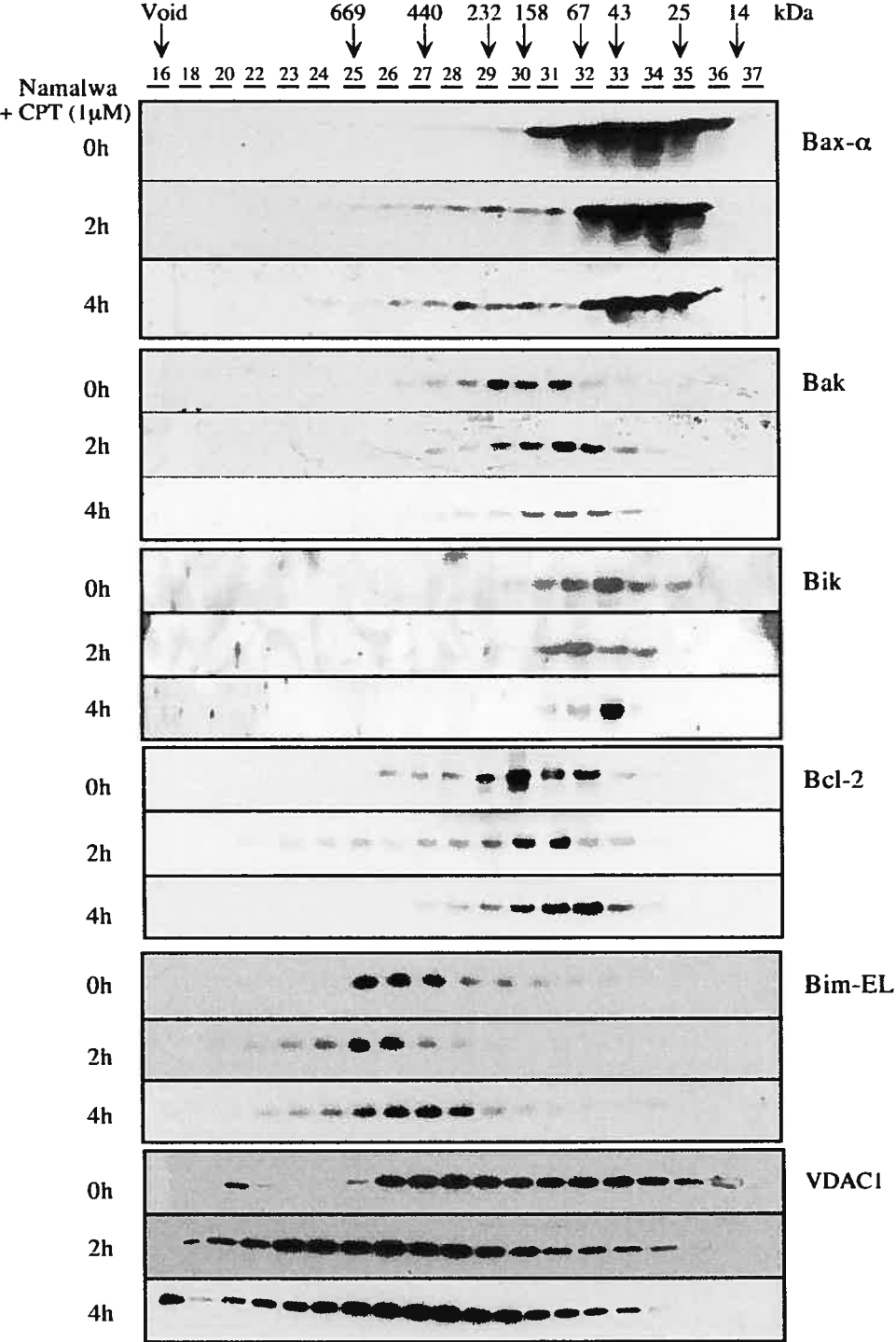


Fig. 5. FPLC elution profiles of high molecular weight protein complexes of Bax- α , Bak, Bik, Bim-EL, Bcl-2 and VDAC1 on Superose 6-HR 16/50 after CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

Cellular extracts were prepared with 2% CHAPS, as described in Materials and Methods, from control (0 h) and treated cells at the indicated times after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). 500 μ l of the soluble fraction was loaded on the column and eluted at a flow rate of 500 μ l/min. Fractions of 2.5 ml were collected every 5-min, and an 80- μ l portion of each fraction was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with appropriate specific antibodies. Immunocomplexes were revealed by enhanced chemiluminescence and film exposure.

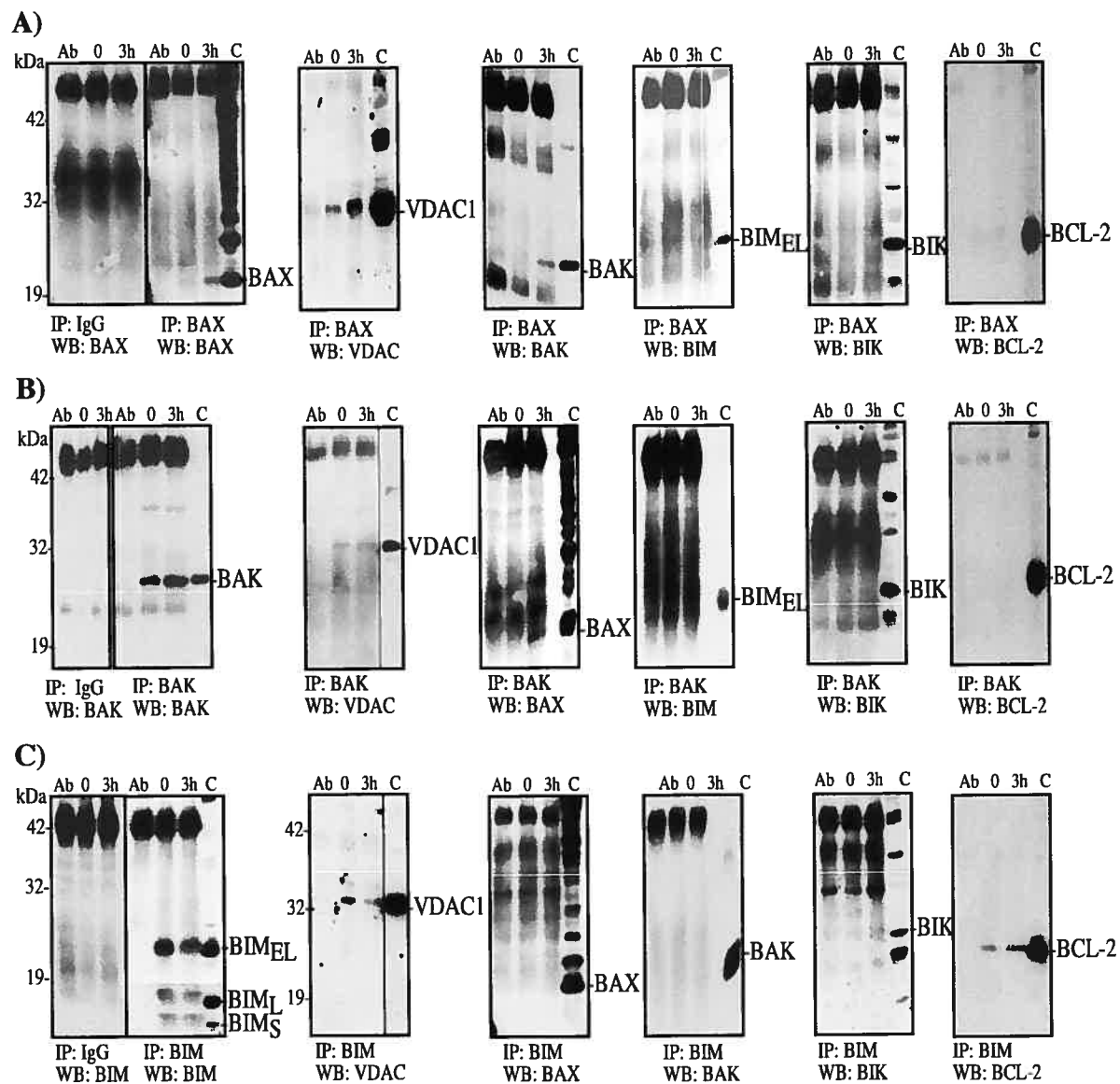
Fig.6

Fig. 6. Co-immunoprecipitation of mitochondrial Bax, Bak and Bim oligomers induced by CPT treatment in p53-deficient human B lymphoma Namalwa cells.

Mitochondria-enriched fractions were prepared as described in Materials and Methods, from control (0 h) and 3 h CPT-treated Namalwa cells, incubated with DSP cross-linker and lysed in 2% CHAPS-containing buffer. Protein concentration was quantitated, and a 120- μ g protein fraction was incubated with either polyclonal rabbit anti-Bax (*A*), -Bak (*B*) or -Bim (*C*) antibodies. After capture of the immunocomplexes, the covalent bonds created by DSP were cleaved under reducing conditions. Incubation with the immunoprecipitating antibody alone (*lane Ab*, on each panel) and immunoprecipitation with nonspecific normal rabbit IgG (*A, B, C*, left panels) were performed as control experiments. Lane *C* shows protein expression in a whole-Namalwa cell extract by Western blotting. Representative of 3 independent experiments.

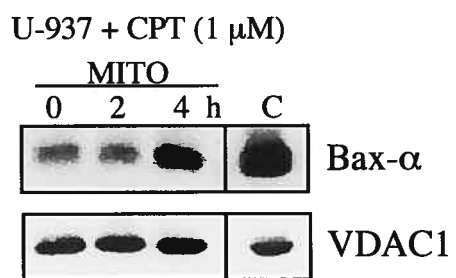
Fig.7

Fig. 7. Mitochondrial relocation of Bax- α after CPT treatment in p53-deficient human histiocytic lymphoma U-937 cells.

Western blotting analysis of pro-apoptotic Bax- α in mitochondria isolated from U-937 cells treated with CPT. Mitochondrial fractions were prepared by the method of metrizamide/Percoll density gradients, as described in Materials and Methods, from control (0 h) and treated U-937 cells at the indicated times (h) after CPT treatment (1.0 μ M for 30 min). Mitochondrial fractions were analyzed by SDS-PAGE (10 μ g of proteins per lane), Bax- α protein was detected by Western blotting with anti-Bax antibody, while the upper part of the membrane was hybridized with anti-VDAC1 antibody, to show purity and the equal protein load of the mitochondrial fractions. Lane C shows protein expression in whole-cell extracts prepared from control U-937 cells. Representative of 3 independent experiments.

CHAPITRE 4.

Étude des facteurs de transcription impliqués dans l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN

Cette quatrième partie est un chapitre de recherche supplémentaire constitué de résultats préliminaires non-publiés. Ce chapitre sera présenté sous la forme suivante:

- section 4.1 Résumé
- section 4.2 Matériels et méthodes
- section 4.3 Présentation et description des résultats

L'introduction et la recension de la littérature concernant cette étude sont intégrées dans le Chapitre 1 - Introduction. Les résultats sont analysés et discutés dans le Chapitre 5 - Discussion.

4.1 Résumé

L'objectif principal de ce projet est de déterminer le rôle de certains facteurs de transcription dans l'activation des voies apoptotiques p53-indépendantes après l'induction d'un dommage à l'ADN. Nous avons investigué la fonction des facteurs de transcription NF- κ B, c-Jun/AP1, p73 et p63 dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante, induite par un traitement de CPT dans les cellules de lymphome B humain Namalwa p53-déficientes. Les facteurs NF- κ B, c-Jun/AP1, p73 et p63 ont tous été associés à l'induction de l'apoptose dans certains modèles et des fonction anti-apoptotiques ont aussi été attribuées à NF- κ B et c-Jun/AP1 (voir section: 1.4.2 - *Les facteurs de transcription activés par le dommage à l'ADN*). Comme méthodologie, nous avons transfecté les cellules Namalwa de façon stable avec des dominants négatifs pour chaque facteur de transcription, dans le but d'inhiber l'activité de ces facteurs et d'investiguer la conséquence de cette perte d'activité sur la cinétique d'apoptose des cellules Namalwa traitées avec la CPT. Comme mesure d'apoptose, nous avons quantifié le pourcentage (%) de fragmentation d'ADN dans

les cellules Namalwa contrôle (non-transfectées), Namalwa-mock (transfectées avec le vecteur seulement) et Namalwa transfectées avec le vecteur contenant un dominant négatif, après le traitement de CPT. Les résultats obtenus suggèrent que les facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1 ont une fonction anti-apoptotique dans notre modèle, alors que les facteurs p73 et p63 semblent posséder une activité pro-apoptotique. Les facteurs p73 et p63 pourraient donc contribuer à l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique.

4.2 Matériels et méthodes

Produits utilisés. Les précurseurs radio-actifs [γ - 32 P]ATP (3 mCi/mmol) et [2- 14 C]-thymidine (59 mCi/mmol) proviennent de ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). 20-S-camptothecin lactone (CPT) provient de Sigma-Aldrich Company (St-Louis, MO, USA). Le matériel utilisé pour les essais de changement de mobilité électrophorétique (*EMSA* ou *electromobility shift assay*), incluant T4 polynucleotide kinase, T4 polynucleotide kinase 10X buffer, gel shift binding 5X buffer et les oligonucléotides consensus pour NF- κ B, AP1 et TFIID, provient de Promega Corporation (Madison, WI, USA). Tous les autres produits chimiques ou réactifs utilisés proviennent soit de Sigma-Aldrich Company, soit de ICN BioMedicals ou de fournisseurs locaux.

Culture cellulaire. La lignée cellulaire de lymphome B humain Namalwa provient de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Les cellules Namalwa sont cultivées en suspension à 37°C en présence de 5 % de dioxyde de carbone (CO₂), dans un milieu de culture de type RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal désactivé par la chaleur, 2 mM de glutamine, 100 U/ml de péniciline et 100 μ g/ml de streptomycine (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Transfection. Les dominants négatifs I κ B(SR), Tam67DN, Δ Np73 α et Δ Np73 β , ainsi que Δ Np63 α et Δ Np63 β ont été fournis généreusement par Dr. Karen H. Vousden, Dr. Michael J. Birrer, Dr. William G. Kealin Jr. et Dr. Motonobu Osada, respectivement. Les vecteurs pRcCMV-I κ B(SR), pcDNA3.1(-)-mock, pcDNA3.1(-)-Tam67DN, pcDNA3.1(+)-mock, pcDNA3.1(+)- Δ Np73 α , pcDNA3.1(+)- Δ Np73 β , pcDNA3.1/Hygro(+)-mock, pcDNA3.1/Hygro(+)- Δ Np63 α et pcDNA3.1/Hygro(+)-

Δ Np63 β ont été transfectés dans les cellules Namalwa par électroporation à 0.27 kVolts (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA). Pour obtenir des lignées stables, les cellules transfectées ont été sélectionnées pendant au moins 2 mois avec les antibiotiques suivants: 1.5 mg/ml de G418 (neomycin) (Gibco-BRL Life Technologies) pour les vecteurs pRcCMV et pcDNA3.1(+/-), et 1.5 mg/ml d'hygromycin B (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Qc., Canada) pour le vecteur pcDNA3.1/Hygro(+).

Marquage de l'ADN au [¹⁴C]-thymidine et traitement des cellules. Pour marquer au [¹⁴C] l'ADN des cellules Namalwa, les cellules sont cultivées en présence de [¹⁴C]-thymidine (0.02 μ Ci/ml) dans le milieu de culture pour une période de 24 h, les cellules sont par la suite centrifugées et resuspendues dans le même volume de milieu de culture complet sans [¹⁴C]-thymidine (*chasing*) pendant une nuit [21]. Les cellules Namalwa en phase exponentielle de croissance (environ 5×10^5 cellules/ml) sont traitées avec 1 μ M de CPT pour une période de 30 min à 37°C, suite à laquelle les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues dans le même volume de milieu de culture complet, sans CPT.

Préparation des extraits nucléaires et essais de changement de mobilité électrophorétique (EMSA). La technique d'EMSA est utilisée pour évaluer l'activité de liaison à l'ADN des facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1, dans le but de déterminer l'efficacité des dominants négatifs I κ B(SR) et Tam67DN, qui inhibent l'activité de NF- κ B et c-Jun/AP1, respectivement. Les EMSA sont effectués à partir d'extraits nucléaires provenant des différentes lignées de cellules Namalwa transfectées de façon stable et non-transfectées. Les cellules non-traitées et traitées avec la CPT sont récoltées par centrifugation (1000 x g) après le nombre d'heures indiqué (environ 20×10^6 cellules par point), puis lavées 2 fois dans le PBS (*phosphate-buffered saline*). Les cellules sont ensuite lysées 2 min sur glace dans le tampon suivant, assemblé dans H₂O contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CompleteTM, Roche Molecular Biochemicals): 25 % (v/v) glycerol, 10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride et 1 mM sodium orthovanadate. L'échantillon est ensuite centrifugé (1000 x g), le surnageant est jeté et le culot, contenant des noyaux et des cellules intactes, est conservé. Ce culot est lysé une deuxième fois 2 min sur glace dans le même tampon, afin de briser les cellules toujours intactes après la première étape de lyse. Après

centrifugation (1000 x g), le surnageant est jeté et le culot de noyaux est immédiatement lysé 30 min par rotation à 4°C dans le tampon suivant, assemblé dans H₂O contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases: 25 % (v/v) glycerol, 0.1 % (v/v) Igepal, 20 mM Hepes pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride et 1 mM sodium orthovanadate. Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 000 x g) et le surnageant constitue l'extrait nucléaire. Les extraits nucléaires sont finalement dosés par la méthode de Bradford pour déterminer leur concentration en protéines et dilués à une concentration de 5 µg de protéines/µl avec le tampon suivant, assemblé dans H₂O contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases: 20 % (v/v) glycerol, 20 mM Hepes pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride et 1 mM sodium orthovanadate. Les extraits nucléaires sont conservés à -80°C et utilisés pour les EMSA dans les 10 jours suivants. Les sondes utilisées pour les EMSA sont des oligonucléotides à double brins d'ADN marqués au [γ -³²P]ATP, qui représentent des séquences consensus des sites de liaison à l'ADN de NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') et c-Jun/AP1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'). Les oligonucléotides sont phosphorylés avec [γ -³²P]ATP via la réaction suivante: 2 µl d'oligonucléotide consensus (1.75 pmol/µl), 1 µl de T4 polynucleotide kinase 10X buffer, 1 µl de [γ -³²P]ATP (3 mCi/mmol à 10 mCi/ml), 5 µl d'H₂O sans nucléase et 1 µl de T4 polynucleotide kinase. Cette réaction est incubée à 37°C pendant 10 min, puis arrêtée en ajoutant 1 µl de 0.5 M EDTA. Ensuite, 39 µl de tampon TE (10 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) est ajouté et la sonde est purifiée sur une colonne de Sephadex G-25 (Roche Molecular Biochemicals). Les réactions de liaison à l'ADN sont assemblées comme suit: 2 µl d'extrait nucléaire, 2 µl gel shift binding 5X buffer et 5 µl d'H₂O sans nucléase, incubées 10 min à la température de la pièce. Ensuite, 1 µl de la sonde-[γ -³²P]ATP (spécifique à NF- κ B ou AP1) est ajouté dans chaque réaction qui sont incubées 20 min à la température de la pièce. Pour les essais contrôles, des oligonucléotides consensus « froids », c'est-à-dire non marqués au [γ -³²P]ATP, sont aussi ajoutés: 1 µl d'oligonucléotide consensus NF- κ B ou c-Jun/AP1 (1.75 pmol/µl) pour le contrôle de compétiteur spécifique et TFIID pour le contrôle de compétiteur non-spécifique. La composition du complexe ADN-NF- κ B est analysée par des essais de « supershift » avec des anticorps spécifiques à p50 et à p65, les deux principales sous-unités du facteur NF- κ B. Pour les essais de supershift, 2 µg d'anti-p50 (anticorps

polyclonal de lapin, H-119, # sc-7178, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) ou 2 µg d'anti-p65 (anticorps polyclonal de lapin, A, # sc-109, Santa Cruz Biotechnology Inc.) est ajouté à la réaction de liaison à l'ADN, suivi d'une incubation de 30 min sur glace. Les complexes [γ - 32 P]ADN-protéines sont finalement analysés par électrophorèse sur un gel 6 % non-dénaturant acrylamide: bisacrylamide (60:1), dans un tampon 0.5X TBE (Tris-acide borique-EDTA). Les gels sont ensuite séchés et visualisés par autoradiographie.

Immunobavardage. Les immunobavardages de type « *Western blot* » sont effectués à partir d'extraits de protéines cellulaires totales, qui sont préparés comme suit: les cellules non-traitées ou traitées à la CPT sont collectées par centrifugation, lavées dans le PBS puis homogénéisées dans un tampon de lyse constitué de 1 % Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 5mM sodium pyrophosphate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride et 1 mM sodium orthovanadate, assemblés dans H₂O contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les cellules sont lysées dans ce tampon pendant 30 min à 4°C et les échantillons sont par la suite centrifugés (10 000 x g, 15 min, 4°C). Les surnageants constituent les extraits de protéines totales. Ils sont dosés par la méthode de Bradford pour déterminer leur concentration en protéines et conservés à -80°C. Pour les expériences d'immunobavardage « *Western blot* », les échantillons de protéines totales (100 µg de protéines/puit) sont séparés par SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) standard, suivi d'un transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Les membranes sont ensuite bloquées 1 h dans 5 % lait écrémé en poudre dilué dans PBST (PBS, 0.1 %Tween 20), puis incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire. Les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 h à la température de la pièce. La détection des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech) s'effectue avec les réactifs ECL (*enhanced chemiluminescence*) d'Amersham Pharmacia Biotech. Les anticorps primaires utilisés sont: anticorps polyclonal de lapin anti-c-Jun/API (# PC06, Oncogene Research Products, Boston, MA, USA), anticorps monoclonal de souris anti-p73 (clone ER-15, # OP109, Oncogene Research Products) et anticorps monoclonal de souris anti-p63 (clone 4A4, # OP132, Oncogene Research Products).

Analyse du processus de fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose est quantifiée par la technique d'élution d'ADN sur filtre, ou FBA (*filter binding assay*). Cette technique a déjà été décrite par Dr. Richard Bertrand [21]. 5×10^6 cellules marquées au [^{14}C]-thymidine sont déposées sur des filtres adsorbants (filtres de copolymère vinyl/acrylic, Metrical membrane, taille des pores $0.8\text{-}\mu\text{m}$, diamètre du filtre 25 mm, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) et lavées avec 5 ml de PBS. Dès que la solution de lavage a traversé le filtre par gravité (cette solution est récoltée et constitue la fraction 1), les cellules sont lysées directement sur le filtre avec 5 ml de solution de lyse (0.2 % SDS, 2 M NaCl, 0.04 M EDTA pH 10.0), qui passe à travers le filtre par gravité et constitue la fraction 2. Le filtre est ensuite lavé avec 5 ml de 0.02 M EDTA pH 10.0, qui s'écoule par gravité et représente la fraction 3. Le filtre lui-même est finalement récolté et constitue la fraction 4. Brièvement, cette technique se base sur le principe que l'ADN fragmenté passe à travers le filtre et se retrouve dans les fractions 2 et 3, alors que l'ADN non-fragmenté demeure à la surface du filtre et sera donc détecté dans la fraction 4. Étant donné que l'ADN est marqué au [^{14}C]-thymidine, la quantité d'ADN- ^{14}C -thymidine dans chacune des fractions peut être quantifiée. Au filtre de la fraction 4, 1 ml de 1 N HCl est ajouté, puis la fraction 4 est chauffée à 60°C pendant 1 h, afin de dépuriner l'ADN. Ensuite, 2.5 ml de 0.4 N NaOH est ajouté à la fraction 4, suivi d'un repos à la température de la pièce pendant 1 h, pour libérer l'ADN- ^{14}C -thymidine des filtres. 10 ml d'Aquassure (Packard, Meriden, CT, USA) est ensuite ajouté à chacune des fractions et la radioactivité de chaque fraction est quantifiée dans un compteur à scintillation liquide. La fragmentation de l'ADN est déterminée comme suit: la quantité d'ADN de fraction 1 + fraction 2 + fraction 3, divisée par la quantité totale d'ADN (fraction 1 + fraction 2 + fraction 3 + fraction 4). Les résultats sont exprimés en % d'ADN fragmenté dans les cellules traitées à la CPT, par rapport à la quantité d'ADN fragmenté dans les cellules contrôles non-traitées (bruit de fond), avec la formule suivante: $(F - F_0 / 1 - F_0) \times 100$, où F représente l'ADN fragmenté dans les cellules traitées et F_0 est l'ADN fragmenté dans les cellules contrôles.

4.3 Présentation et description des résultats

4.3.1 Une fonction anti-apoptotique pour les facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1

Le facteur de transcription NF- κ B est surtout associé à un rôle de protection de la cellule contre diverses insultes cytotoxiques, mais des fonctions pro-apoptotiques ont aussi été attribuées à NF- κ B (*voir section: 1.4.2.4 - Le facteur NF- κ B*). La voie signalétique des JNK et du facteur de transcription c-Jun/AP1 est aussi associée à des fonctions pro- ou anti-apoptotiques, dépendamment de l'environnement cellulaire et du type de stimulus cytotoxique initiateur (*voir section: 1.4.2.5 - Autres facteurs de transcription*). Nous avons donc voulu déterminer le rôle des facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1 dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN.

Le facteur NF- κ B est normalement séquestré dans le cytosol par un inhibiteur de la famille I κ B, dont les principaux membres sont I κ B α et I κ B β . La phosphorylation de I κ B par les kinases IKK stimule la dégradation de I κ B et libère ainsi NF- κ B qui transloque dans le noyau et induit la transcription de gènes-cibles [614]. Pour investiguer le rôle de NF- κ B, nous avons bloqué son activation en surexprimant dans les cellules Namalwa une forme mutée d'I κ B α , le I κ B α super-repressor ou I κ B(SR), qui ne peut pas être phosphorylé par les kinases IKK et demeure donc lié à NF- κ B, le séquestrant de façon constitutive dans le cytosol [638, 702, 703]. Nous avons transfecté les cellules Namalwa par électroporation avec le vecteur pRcCMV-I κ B(SR) et les cellules transfectées ont été sélectionnées avec le G418 pendant au moins deux mois pour obtenir des lignées stables surexprimant le dominant négatif I κ B(SR). En même temps, les cellules Namalwa ont aussi été transfectées avec un vecteur vide, le pcDNA3.1(-), dérivé de pRcCMV, et sélectionnées dans les mêmes conditions. Les cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1(-) sont appelées Namalwa-mock et servent de lignées contrôles. Une fois les lignées transfectées stables obtenues, l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est évaluée par EMSA. La **fig. 1A** montre trois résultats représentatifs d'EMSA. Des cellules Namalwa non-transfectées et les lignées stables Namalwa-mock et Namalwa-I κ B(SR) ont été traitées avec la CPT, des extraits nucléaires ont été préparés après le nombre d'heures de traitement indiqué et les extraits nucléaires ont été soumis aux expériences d'EMSA. Dans la **fig.1A**, panneau de gauche, la quantité de complexes ADN-NF- κ B est plus importante

dans les cellules Namalwa après le traitement de CPT, ce qui signifie que NF- κ B est activé suite à l'induction de dommage à l'ADN. L'activation de NF- κ B par la CPT avait été reportée précédemment par Huang et al. [704]. Le panneau de gauche démontre également qu'il y a moins de complexes ADN-NF- κ B dans les Namalwa surexprimant I κ B(SR), comparativement à l'intensité des bandes représentant les complexes ADN-NF- κ B dans les Namalwa non-transfectées, ce qui signifie que le dominant négatif I κ B(SR) semble fonctionner: il y a une réduction de l'activation de NF- κ B dans les Nam-I κ B(SR). Le panneau de droite montre l'activité de NF- κ B dans les Nam-mock, ainsi qu'un second EMSA avec la lignée Nam-I κ B(SR). NF- κ B est activé par la CPT dans les Nam-mock et une très bonne réduction de l'activité NF- κ B est observée dans les Nam-I κ B(SR), ce qui démontre encore une fois l'efficacité de la surexpression du dominant négatif I κ B(SR). Les colonnes marquées des symboles + et - représentent des essais de compétition spécifique (+) et non-spécifique (-) pour démontrer la spécificité de liaison de NF- κ B à sa séquence oligonucléotidique marquée au [γ -³²P]. La bande représentant les complexes ADN-NF- κ B disparaît complètement en présence d'un excès d'oligonucléotide non-marqué spécifique à NF- κ B et la bande réapparaît en présence d'un excès d'oligonucléotide non-marqué spécifique au facteur TFIID. La fig. 1A, panneau du bas, montre encore une fois un EMSA pour l'activité de NF- κ B dans les cellules Namalwa non-transfectées traitées avec la CPT, ainsi que deux essais de « supershift » réalisés en ajoutant un excès d'anticorps anti-p50 ou anti-p65 dans la réaction de liaison à l'ADN. Les protéines p50 et p65 sont les deux sous-unités principales qui constituent le complexe NF- κ B. La disparition de la bande identifiée comme étant les complexes ADN-NF- κ B dans les essais de « supershift » p50 et p65 indique que les sous-unités p50 et p65 de NF- κ B font bel et bien partie de ces complexes. La liaison des anticorps p50 et p65 aux complexes ADN-NF- κ B augmente le poids de ceux-ci, qui migrent alors plus lentement et se retrouvent à une position supérieure dans le gel. C'est effectivement ce qui est observé pour le méga-complexe ADN-NF- κ B-anticorps p50, qui semble apparaître plus haut dans le gel. Par contre, le méga-complexe ADN-NF- κ B-anticorps p65 n'est pas visualisé sur ce gel, bien que la bande représentant les complexes ADN-NF- κ B disparaisse en présence de l'anticorps p65. Ensuite, la conséquence d'une réduction de l'activité NF- κ B sur la cinétique d'apoptose fut investiguée, en utilisant comme paramètre la quantification de l'ADN fragmenté après le traitement de CPT. Les cellules non-transfectées, les cellules Namalwa-mock et Namalwa-

I κ B(SR) ont donc été traitées avec la CPT et la **fig. 1B** indique le % de fragmentation de l'ADN dans chacune des lignées, mesuré après le nombre d'heures de traitement indiqué. On constate à la **fig. 1B** que la fragmentation de l'ADN est plus importante dans les Namalwa-I κ B(SR) que dans les cellules non-transfectées et transfectées avec le vecteur vide. Ces résultats indiquent que l'inhibition de NF- κ B sensibilise les cellules à l'apoptose, du moins à la fragmentation de l'ADN. Ces résultats suggèrent que NF- κ B agit pour protéger les cellules de la mort après l'induction de dommage à l'ADN par la CPT, NF- κ B jouerait donc un rôle anti-apoptotique dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante.

Une méthodologie similaire fut utilisée pour investiguer le rôle du facteur c-Jun/AP1. Les cellules Namalwa ont été transfectées avec un mutant de c-Jun, le Tam67DN, dont le domaine de transactivation a été délété des résidus 3 à 122. La protéine Tam67DN possède des domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation fonctionnels mais est incapable de transactiver les gènes-cibles. Le mutant Tam67DN interfère avec l'activité du facteur c-Jun/AP1 endogène et agit comme un inhibiteur de type dominant négatif lorsque surexprimé [705]. Des cellules Namalwa transfectées avec le vecteur pcDNA3.1 (-)-Tam67DN et avec le vecteur vide (pcDNA3.1(-)-mock) ont été sélectionnées pendant au moins deux mois avec le G418 et des lignées stables ont ainsi été obtenues. À la **fig. 2A**, un immunobavardage de type « Western blot » indique la présence de la protéine transfectée Tam67DN dans deux lignées stables Nam-Tam67DN, ainsi que l'expression du facteur c-Jun/AP1 endogène dans toutes les lignées. L'anticorps utilisé reconnaît une portion du domaine de liaison à l'ADN de c-Jun/AP1 et détecte donc aussi le mutant Tam67DN chez qui ce domaine est intègre. À noter que le traitement de CPT ne semble pas affecter le niveau d'expression de c-Jun/AP1 et de Tam67DN, similaires avant (0 h) et 4 h après le traitement. L'activité de liaison à l'ADN de c-Jun/AP1 a ensuite été évaluée par EMSA. Des extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules Namalwa-mock et Namalwa-Tam67DN traitées avec la CPT, puis analysés pour l'activité de c-Jun/AP1 par EMSA. La **fig. 2B** montre un résultat d'EMSA représentatif, où on voit les complexes ADN-c-Jun/AP1 dans les cellules contrôles mock et dans les cellules qui surexpriment le dominant négatif Tam67DN. Il semble y avoir un peu plus de complexes ADN-c-Jun/AP1 dans les Nam-mock 1 h après le traitement de CPT, comparativement aux cellules Nam-mock non-traitées (0 h), mais cette différence d'activité de c-Jun/AP1 obtenue 1 h après le traitement ne semble pas être soutenue à des temps ultérieurs. Selon ces résultats, l'activation de c-Jun/AP1 par la CPT dans notre système semble transitoire. Il ne semble

pas non plus y avoir ni de réduction importante de l'activité basale de c-Jun/AP1, ni d'activation de c-Jun/AP1 1 h après CPT dans les cellules surexprimant Tam67DN. Les expériences de compétition spécifique (+) et non-spécifique (-) démontrent toutefois la spécificité de la liaison du facteur AP1 à sa séquence oligonucléotidique, indiquant que l'expérience d'EMSA semble fonctionner. Malgré la faible activation transitoire de c-Jun/AP1 après le dommage génotoxique induit par la CPT, les différentes lignées ont quand même été soumises au test de quantification de la fragmentation de l'ADN. À la **fig. 2C**, on constate que la fragmentation de l'ADN induite par la CPT est beaucoup plus importante dans les Nam-Tam67DN que dans les lignées contrôles. Ces résultats indiquent que les cellules semblent être plus sensibles à la fragmentation de l'ADN et à l'apoptose lorsqu'elles surexpriment Tam67DN. Bien que nos expériences d'EMSA ne démontrent pas de façon absolue que c-Jun/AP1 soit fortement activé par la CPT, nos résultats suggèrent qu'un des membres de la famille AP1 soit quand même impliqué dans l'apoptose p53-indépendante, jouant un rôle anti-apoptotique, de façon similaire à NF- κ B. Les essais d'EMSA ne sont pas spécifiques pour la liaison de c-Jun et il est possible que d'autres membres de la famille AP1 forment des facteurs de transcription actifs dans les cellules Namalwa et lient la séquence consensus AP1 dans les essais d'EMSA. Des variations dans l'activité de c-Jun pourraient ainsi être masquées par l'activité des autres facteurs AP1. Des essais de « supershift » réalisés avec des anticorps spécifiques aux différents membres de la famille AP1 pourraient permettre d'identifier les facteurs qui lient la séquence consensus AP1 dans les cellules Namalwa.

4.3.2 Une fonction pro-apoptotique pour les facteurs p73 et p63

Les facteurs de transcription p73 et p63, les deux autres membres de la famille de p53, sont aussi connus pour être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, bien que leurs fonctions soient en général moins bien définies que celles de p53. Nous avons donc voulu déterminer le rôle des facteurs p73 et p63 dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante. Il existe plusieurs isoformes endogènes de p73 et p63, dont des formes tronquées en position N-terminale, appelées Δ N, qui sont inactives en tant que facteurs de transcription et agissent comme des inhibiteurs de type dominant négatif de l'activité de p73 et p63 [600, 706]. Nous avons donc surexprimé dans les cellules Namalwa deux formes tronquées du facteur p73, les protéines Δ Np73 α et Δ Np73 β , et deux formes

tronquées de p63, les $\Delta Np63\alpha$ et $\Delta Np63\beta$. Ces dominants négatifs ont été transfectés dans les cellules Namalwa par électroporation et des lignées stables ont été obtenues en sélectionnant les cellules transfectées avec l'antibiotique requis pendant au moins deux mois. En même temps, des cellules transfectées seulement avec les vecteurs vides correspondants (mock) ont aussi été établies, afin de servir de lignées contrôles. À la **fig. 3A**, les protéines p73 sont détectées par immunobavardage « Western blot » dans les différentes lignées avant (0 h) et 4 h après le traitement de CPT. L'anticorps anti-p73 utilisé est dirigé contre les acides aminés 380-395, présents dans les isoformes p73 α et p73 β , ainsi que dans leurs formes tronquées respectives. La **fig.3A** montre la surexpression des dominants négatifs $\Delta Np73\alpha$ et $\Delta Np73\beta$ dans les lignées transfectées. En surexposant la portion supérieure de la membrane, on voit également apparaître d'autres isoformes endogène de p73. À noter que le traitement de CPT ne semble pas influencer le niveau d'expression des dominants négatifs, ni des formes endogènes. À la **fig. 3C**, un immunobavardage « Western blot » montre l'expression des dominants négatifs $\Delta Np63\alpha$ (environ 64 kDa) et $\Delta Np63\beta$ (environ 51 kDa) dans les lignées cellulaires transfectées. L'anticorps anti-p63 utilisé reconnaît un fragment de la portion N-terminale des isoformes $\Delta Np63$ et est supposé détecter la majorité des formes de p63. La détection des formes de p63 s'est toutefois avérée plus difficile que celle des formes de p73. L'expression d'isoformes endogènes de p63 n'a pas été détectée dans les cellules Namalwa avec l'anticorps utilisé. L'expression du dominant négatif $\Delta Np63\beta$ semble diminuer après le traitement de CPT. La **fig. 3B** indique que l'amplitude de la fragmentation de l'ADN est similaire dans les cellules non-transfectées et dans les cellules mock, alors que la fragmentation de l'ADN est significativement moindre dans les cellules qui surexpriment les dominants négatifs de p73. L'effet protecteur est encore plus marqué dans les Nam- $\Delta Np73\beta$, qui ne présentent presque pas de fragmentation de l'ADN dans les 4 premières heures de traitement. Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'activité de p73 α et p73 β semble protéger les cellules de l'apoptose, suggérant que p73 α et p73 β joueraient un rôle pro-apoptotique dans notre système. Pour ce qui est de p63, la **fig. 3D** montre que les cellules qui surexpriment l'isoforme $\Delta Np63\beta$ présentent elles aussi très peu de fragmentation d'ADN, indiquant que l'inhibition de p63 β protège également les cellules de l'apoptose. Par contre, il n'est pas clair si un effet protecteur se produit dans les cellules Nam- $\Delta Np63\alpha$, chez qui le % de fragmentation d'ADN est plus faible que les chez les

Nam-mock, mais équivalent à la fragmentation d'ADN dans les cellules non-transfectées. Ces résultats sont des données préliminaires qui devront être répétées afin de clarifier le rôle de l'isoforme $\Delta Np63\alpha$. Des expériences d'EMSA devront également être effectuées pour déterminer si les facteurs p73 et p63 sont activés suite au traitement de CPT et dans quelle mesure la surexpression des formes tronquées inhibe cette activation. Quoiqu'il en soit, nos résultats préliminaires démontrent que p73, et possiblement p63, semblent posséder une fonction pro-apoptotique. Ces deux facteurs représentent donc des candidats intéressants pour médier l'apoptose en l'absence de p53.

Fig.1

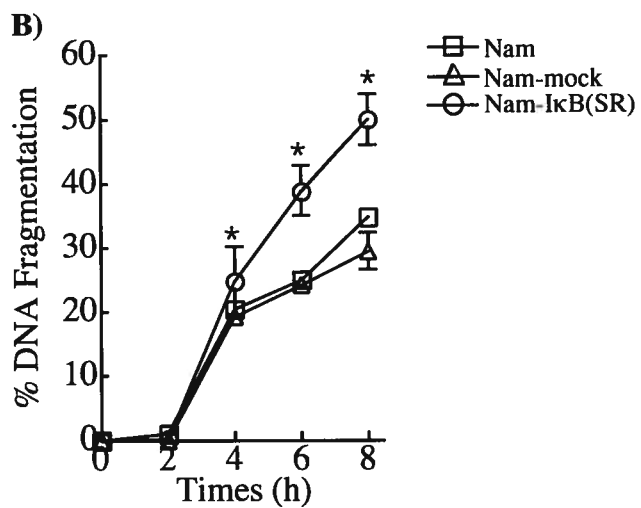
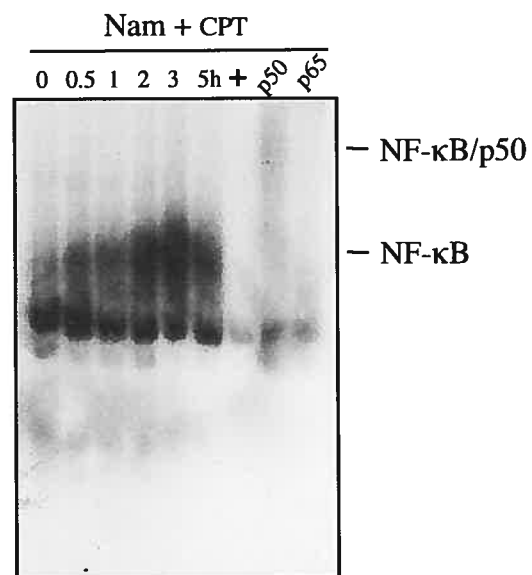
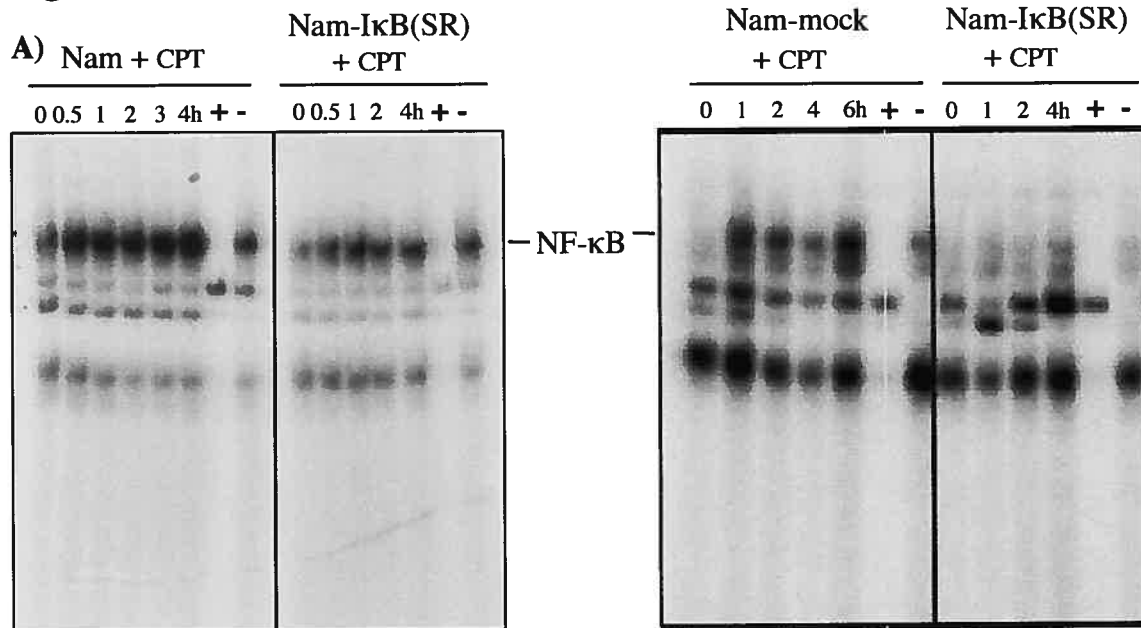


Fig. 1 L'inhibition du facteur de transcription NF- κ B sensibilise les cellules Namalwa à la fragmentation de l'ADN induite par la CPT.

A) *Panneaux du haut:* L'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est évaluée par EMSA dans les cellules Namalwa et Namalwa-pRcCMV-I κ B(SR) (*panneau de gauche*) et dans les cellules Namalwa-pcDNA3.1(-)-mock et Namalwa-pRcCMV-I κ B(SR) (*panneau de droite*). Le mutant I κ B(SR) est un inhibiteur de l'activation de NF- κ B. Les cellules sont traitées à la CPT (1 μ M pendant 30 min) et des extraits nucléaires sont préparés à partir de cellules non-traitées et traitées, après le nombre d'heures (h) indiqué. Les extraits nucléaires sont mis en présence d'une sonde oligonucléotidique marquée au [γ - 32 P], constituée d'une séquence consensus pour la liaison de NF- κ B. La spécificité de liaison de NF- κ B à sa séquence oligonucléotidique est démontrée par des essais de compétition spécifique (+) et non-spécifique (-), effectués avec les extraits nucléaires correspondant au temps de traitement 2 h, dans lesquels sont ajouté un excès (1 μ l) d'oligonucléotide froid, non-marqué, spécifique à NF- κ B (+) ou à TFIID (-). Suite à la réaction de liaison à l'ADN, les complexes [γ - 32 P]ADN-NF- κ B sont séparés par électrophorèse sur un gel non-dénaturant et visualisés par autoradiographie. ***Panneau du bas:*** La composition des complexes [γ - 32 P]ADN-NF- κ B est analysée par des essais de « supershift » avec des anticorps spécifiques à p50 et p65, les deux principales sous-unités de NF- κ B. Les cellules Namalwa sont traitées à la CPT (1 μ M pendant 30 min), des extraits nucléaires sont préparés après le nombre d'heures (h) indiqué et soumis aux réactions d'EMSA. Pour les essais de « supershift », 2 μ g d'anticorps anti-p50 ou 2 μ g d'anticorps anti-p65, est ajouté à la réaction de liaison à l'ADN (correspondant au temps de traitement 2 h) et les échantillons sont incubés 30 min sur glace, suivi d'électrophorèse sur gel non-dénaturant et autoradiographie.

B) Les lignées Namalwa, Namalwa-pcDNA3.1(-)-mock et Namalwa-pRcCMV-I κ B(SR) sont traitées avec la CPT (1 μ M pendant 30 min) puis le processus de fragmentation d'ADN associé à l'apoptose est quantifié par des essais d'élution d'ADN sur filtre. Les résultats sont exprimés en % d'ADN fragmenté dans les cellules traitées à la CPT, par rapport au % d'ADN fragmenté dans les cellules contrôles (0 h) et représentent la moyenne \pm l'erreur standard, d'au moins 3 expériences indépendantes. * signifie que les résultats sont significatifs à $p < 0.05$ par un test t de Student.

Fig.2

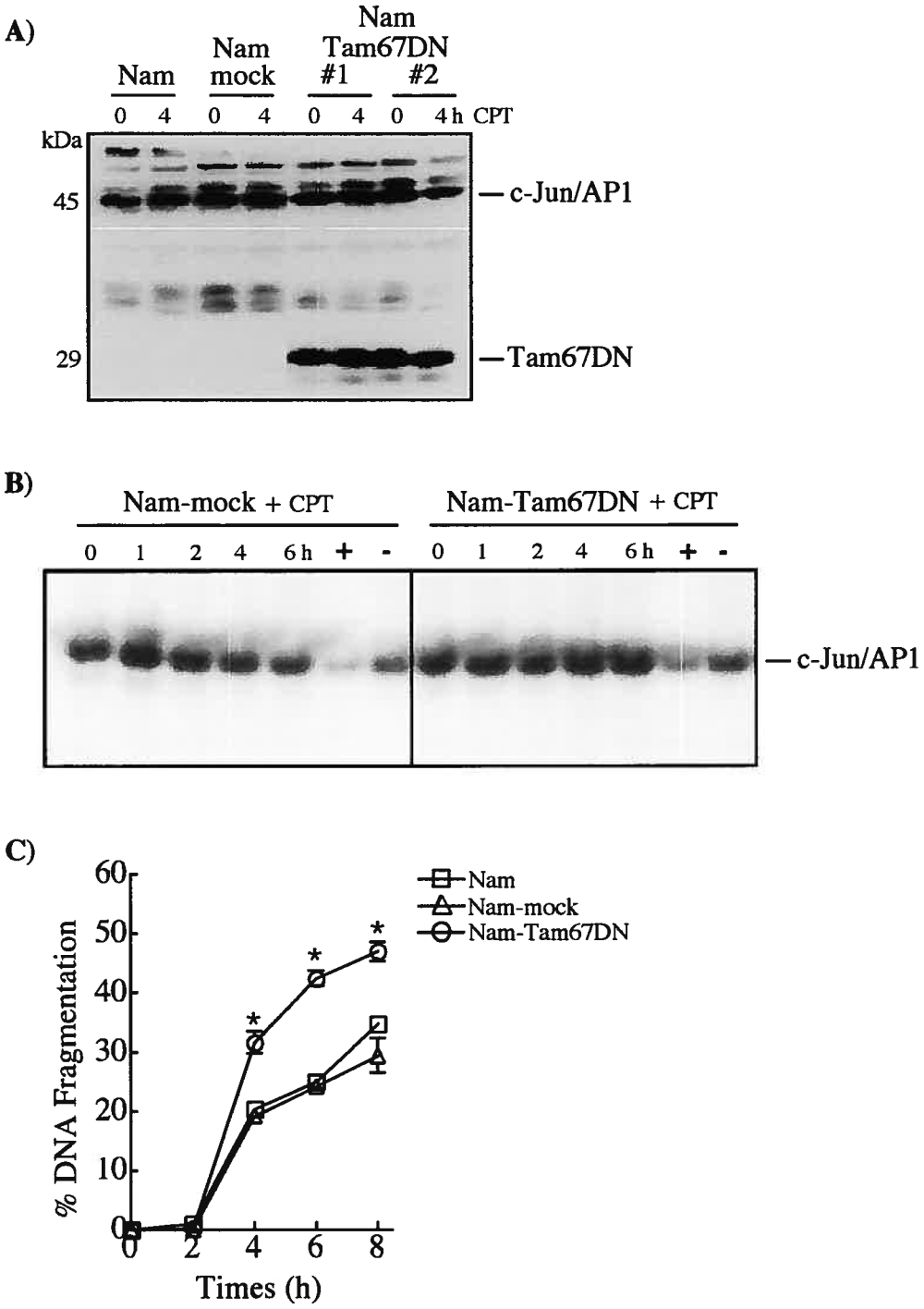


Fig. 2 L'inhibition du facteur de transcription c-Jun/AP1 sensibilise les cellules Namalwa à la fragmentation de l'ADN induite par la CPT.

A) Expression de la protéine mutée Tam67DN par immunobavardage « Western blot ». Les cellules Namalwa, Namalwa-pcDNA3.1-mock et deux lignées distinctes de Namalwa-pcDNA3.1-Tam67DN (#1 et #2) sont traitées avec la CPT (1 μ M pendant 30 min) et l'expression de la protéine transfectée Tam67DN est visualisée dans les cellules non-traitées (0 h) et 4 h après le traitement de CPT. Le mutant Tam67DN est un inhibiteur de l'activité du facteur c-Jun/AP1. L'anticorps anti-c-Jun/AP1 utilisé détecte également le facteur c-Jun/AP1 endogène, dont le niveau d'expression apparaît stable dans toutes les lignées contrôles et traitées. Le mutant Tam67DN est surexprimé uniquement dans les deux lignées transfectées.

B) L'activité de liaison à l'ADN de c-Jun/AP1 est évaluée par EMSA dans les cellules Namalwa-pcDNA3.1-mock et Namalwa-pcDNA3.1-Tam67DN (lignée #2). Les cellules sont traitées à la CPT (1 μ M pendant 30 min) et des extraits nucléaires sont préparés à partir de cellules non-traitées et traitées, après le nombre d'heures (h) indiqué. Les extraits nucléaires sont mis en présence d'une sonde oligonucléotidique marquée au [γ -³²P], constituée d'une séquence consensus pour la liaison de c-Jun/AP1. La spécificité de liaison d'API à sa séquence oligonucléotidique est démontrée par des essais de compétition spécifique (+) et non-spécifique (-), effectués avec les extraits nucléaires correspondant au temps de traitement 2 h, dans lesquels sont ajouté un excès (1 μ l) d'oligonucléotide froid, non-marqué, spécifique au facteur API (+) ou à TFIID (-). Suite à la réaction de liaison à l'ADN, les complexes [γ -³²P]ADN-NF- κ B sont séparés par électrophorèse sur un gel non-dénaturant et visualisés par autoradiographie.

C) Les lignées Namalwa, Namalwa-pcDNA3.1-mock et Namalwa-pcDNA3.1-Tam67DN (lignée #2) sont traitées avec la CPT (1 μ M pendant 30 min) puis le processus de fragmentation d'ADN associé à l'apoptose est quantifié par des essais d'élution d'ADN sur filtre. Les résultats sont exprimés en % d'ADN fragmenté dans les cellules traitées à la CPT, par rapport au % d'ADN fragmenté dans les cellules contrôles (0 h) et représentent la moyenne \pm l'erreur standard, d'au moins 3 expériences indépendantes. * signifie que les résultats sont significatifs à $p < 0.05$ par un test t de Student.

Fig.3

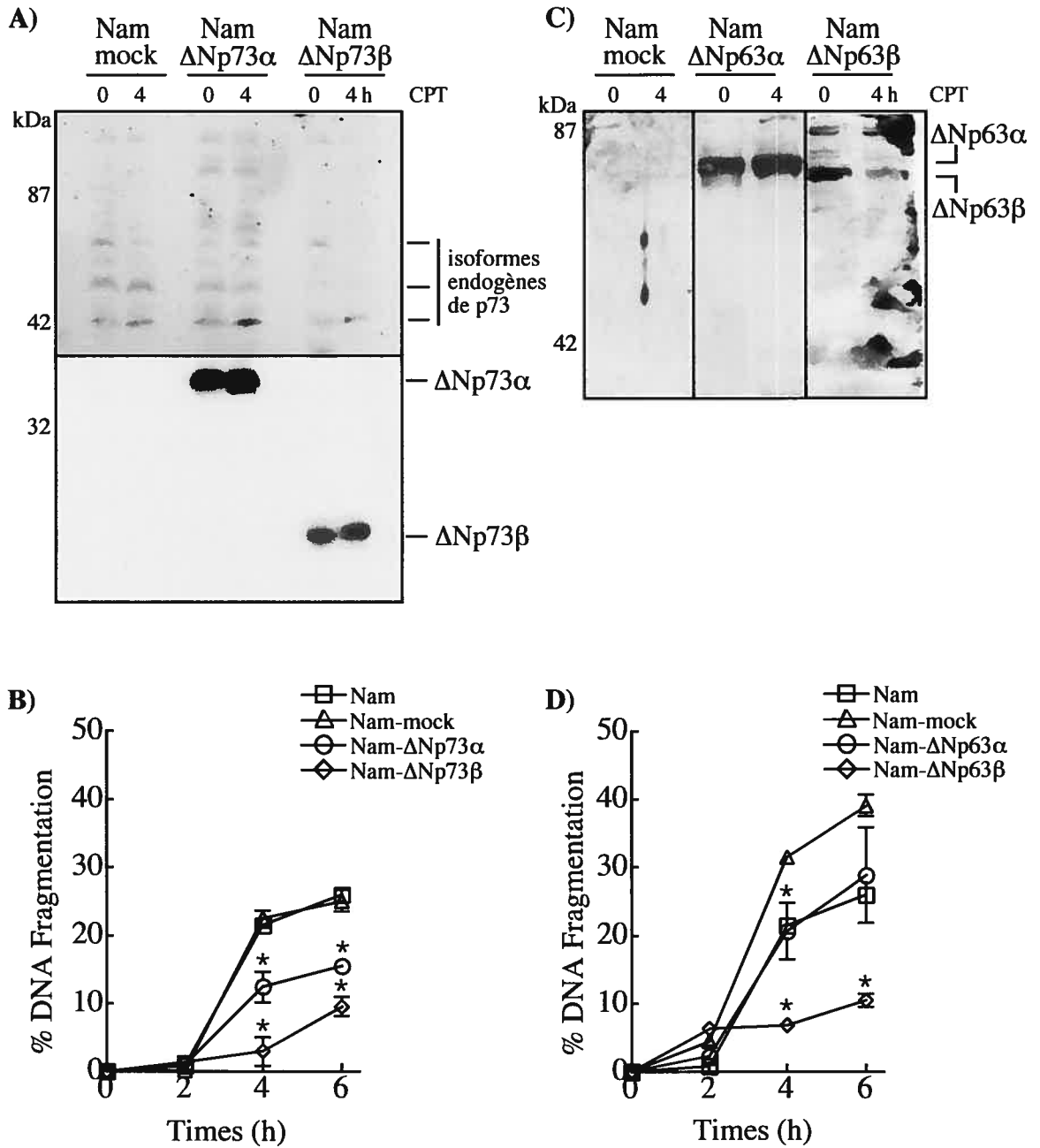


Fig. 3 L'inhibition des facteurs de transcription p73 et p63 protège les cellules Namalwa de la fragmentation de l'ADN induite par la CPT.

A) Expression des protéines tronquées $\Delta Np73\alpha$ et $\Delta Np73\beta$ par immunobavardage « Western blot ». Les cellules Namalwa-pcDNA3.1-mock, Namalwa-pcDNA3.1- $\Delta Np73\alpha$ et Namalwa-pcDNA3.1- $\Delta Np73\beta$ sont traitées avec la CPT (1 μM pendant 30 min) et l'expression des protéines transfectées $\Delta Np73\alpha$ et $\Delta Np73\beta$ est visualisée dans les cellules non-traitées (0 h) et 4 h après le traitement de CPT. Les protéines tronquées $\Delta Np73\alpha$ et $\Delta Np73\beta$ agissent comme inhibiteurs de type dominant négatif de l'activité du facteur p73 lorsqu'elles sont surexprimées. L'anticorps anti-p73 utilisé détecte les protéines tronquées ainsi que des isoformes endogènes de p73, lorsque la partie supérieure de la membrane est surexposée. Les protéines $\Delta Np73\alpha$ et $\Delta Np73\beta$ sont surexprimées uniquement dans leur lignée transfectée respective et leur niveau d'expression semble équivalent avant (0 h) et après (4 h) le traitement de CPT.

B) Les lignées Namalwa, Namalwa-pcDNA3.1-mock, Namalwa-pcDNA3.1- $\Delta Np73\alpha$ et Namalwa-pcDNA3.1- $\Delta Np73\beta$ sont traitées avec la CPT (1 μM pendant 30 min) puis le processus de fragmentation d'ADN associé à l'apoptose est quantifié par des essais d'éluion d'ADN sur filtre. Les résultats sont exprimés en % d'ADN fragmenté dans les cellules traitées à la CPT, par rapport au % d'ADN fragmenté dans les cellules contrôles (0 h) et représentent la moyenne \pm l'erreur standard, de 3 expériences indépendantes. * signifie que les résultats sont significatifs à $p < 0.05$ par un test t de Student.

C) Expression des protéines tronquées $\Delta Np63\alpha$ et $\Delta Np63\beta$ par immunobavardage « Western blot ». Les cellules Namalwa-pcDNA3.1/Hygro-mock, Namalwa-pcDNA3.1/Hygro- $\Delta Np63\alpha$ et Namalwa-pcDNA3.1/Hygro- $\Delta Np63\beta$ sont traitées avec la CPT (1 μM pendant 30 min) et l'expression des protéines transfectées $\Delta Np63\alpha$ et $\Delta Np63\beta$ est visualisée dans les cellules non-traitées (0 h) et 4 h après le traitement de CPT. Les protéines tronquées $\Delta Np63\alpha$ et $\Delta Np63\beta$ agissent comme inhibiteurs de type dominant négatif de l'activité du facteur p63 lorsqu'elles sont surexprimées. Les protéines $\Delta Np63\alpha$ et $\Delta Np63\beta$ sont surexprimées uniquement dans leur lignée transfectée respective.

D) Les lignées Namalwa, Namalwa-pcDNA3.1/Hygro-mock, Namalwa-pcDNA3.1/Hygro- $\Delta Np63\alpha$ et Namalwa-pcDNA3.1/Hygro- $\Delta Np63\beta$ sont traitées avec la CPT (1 μM pendant 30 min) puis le processus de fragmentation d'ADN associé à l'apoptose est quantifié par

des essais d'élution d'ADN sur filtre. Les résultats sont exprimés en % d'ADN fragmenté dans les cellules traitées à la CPT, par rapport au % d'ADN fragmenté dans les cellules contrôles (0 h) et représentent la moyenne \pm l'erreur standard, de 3 expériences indépendantes. * signifie que les résultats sont significatifs à $p < 0.05$ par un test t de Student.

CHAPITRE 5. DISCUSSION

5.1 Pertinence du projet de doctorat par rapport au domaine du cancer, de la chimiothérapie et de l'apoptose

La mort cellulaire apoptotique est un processus très complexe, contrôlé de manière très précise à plusieurs niveaux. Des anomalies dans le programme apoptotique ou dans ses mécanismes de régulation sont associées à de nombreuses conditions pathologiques, dont le cancer. En effet, le processus de tumorigenèse n'est pas uniquement la conséquence d'une prolifération excessive des cellules, mais est aussi associé à la perte de la capacité des cellules à enclencher ou à mener à terme le programme apoptotique et à mourir par apoptose. En oncologie, l'intérêt porté à l'apoptose provient d'observations indiquant que les thérapies anti-cancéreuses telles que les radiations ionisantes et les agents chimiothérapeutiques agissent en activant le programme apoptotique des cellules, provoquant ainsi leur élimination par apoptose. L'efficacité des agents anti-tumoraux dépend donc de leur capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses et des défauts du programme apoptotique peuvent être la cause de la résistance de certaines tumeurs envers les traitements anti-cancéreux.

La protéine suppresseur de tumeur p53 est impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique, dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans l'activation de l'apoptose. En réponse à divers traitements anti-cancéreux, la protéine p53 est activée et peut induire l'apoptose des cellules tumorales. L'apoptose médiée par p53 est un phénomène relativement bien caractérisé qui a fait l'objet de nombreuses études. Toutefois, la protéine p53 est mutée ou non-fonctionnelle dans plus de la majorité des tumeurs humaines qui représentent des cibles difficiles pour les thérapies anti-cancéreuses actuelles [591, 592]. Il est donc primordial de mieux comprendre et définir les mécanismes des voies apoptotiques activées en l'absence de p53. Selon de nombreuses études, la mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose et la voie apoptotique mitochondriale est la principale voie activée après un stress génotoxique [324, 329, 707, 708]. Cependant, la voie mitochondriale a surtout été étudiée et définie dans un contexte cellulaire où la protéine p53 est fonctionnelle et son activation et ses caractéristiques en l'absence de p53 demeurent peu connues. De plus, des évidences récentes ont démontré l'activation d'une nouvelle voie apoptotique impliquant les lysosomes après certains types d'insultes cytotoxiques,

principalement lorsque la cellule subit un stress oxydatif. Les caractéristiques et les mécanismes de la voie lysosomiale ne sont pas encore très bien définis et l'implication des lysosomes dans l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN n'a jamais été investiguée.

Mon projet de doctorat s'est donc intéressé à l'étude de l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique dans les cellules tumorales humaines, plus particulièrement à l'implication potentielle d'une voie lysosomiale et à une meilleure caractérisation de la voie mitochondriale en l'absence de p53. Premièrement, nous avons mis en évidence l'existence d'une nouvelle voie apoptotique impliquant les lysosomes qui est rapidement activée après l'induction du dommage à l'ADN et qui contribue à la voie mitochondriale et à la mort apoptotique p53-indépendante des cellules. Ensuite, nous avons investigué plus précisément les mécanismes d'activation et de régulation de la voie apoptotique mitochondriale p53-indépendante. Nous avons démontré que plusieurs protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont activées et s'assemblent sous forme de complexes protéiques distincts après le dommage à l'ADN, ce qui pourrait contribuer à l'induction des perturbations mitochondriales et à l'apoptose induite par le dommage génotoxique. Finalement, nous avons étudié le rôle d'autres facteurs de transcription dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante et nous avons démontré que les facteurs p73 et p63 sont des candidats potentiels qui pourraient médier l'activation des voies apoptotiques en l'absence de p53. L'ensemble de ces travaux permet donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des voies apoptotiques mitochondriale et lysosomiale induites par un stress génotoxique dans un contexte cellulaire p53-déficient.

Deux autres études sont ajoutées en annexe, concernant la fonction de deux nouvelles protéines de la famille Bcl-2, Bax- σ et Bcl-xES, clonées dans notre laboratoire. Les protéines Bax- σ et Bcl-xES ont été surexprimées dans la lignée cellulaire Namalwa et leur fonction fut analysée dans un contexte d'apoptose p53-indépendante, induite entre autres par un traitement de CPT. Ces études révèlent un rôle pro-apoptotique pour l'isoforme Bax- σ , similaire à celui de Bax- α , accélérant l'apoptose des cellules Namalwa traitées avec divers agents anti-néoplasiques, dont la CPT. La protéine Bcl-xES possède une fonction anti-apoptotique et protège les cellules Namalwa de l'apoptose induite par une variété de stimuli de mort cellulaire incluant un traitement avec la CPT. Ces études démontrent également que Bcl-xES retarde l'oligomérisation de Bax et interagit avec Apaf-1, inhibant l'activation de la pro-caspase-9, ce qui bloque le programme apoptotique.

Ces études supplémentaires ont donc permis de définir la fonction et d'analyser le mode d'action des nouvelles protéines Bax- σ et Bcl-xES dans l'apoptose p53-indépendante.

5.2 Caractérisation d'une voie apoptotique lysosomiale

5.2.1 La camptothecine induit une perméabilisation lysosomiale et active la cathepsine-B

Les cellules leucémiques monocyte-like U937 et les cellules de lymphome de Burkitt's Namalwa (lymphome à cellules B) sont deux lignées cellulaires cancéreuses humaines avec des délétions ou des mutations dans le gène p53 [591, 698]. Ces cellules n'expriment pas de protéine p53 fonctionnelle et constituent donc un modèle adéquat pour étudier les voies apoptotiques p53-indépendantes. Malgré leur déficience pour la protéine p53, les cellules U937 et Namalwa demeurent sensibles au stress génotoxique. Ces cellules meurent rapidement par apoptose suite à l'induction d'un dommage à l'ADN causé par un traitement de courte durée avec divers agents anti-cancéreux, dont les inhibiteurs de topoisomérases. Par exemple, des études effectuées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que les cellules U937 et Namalwa traitées avec la CPT, un inhibiteur des topoisomérases I, démontrent rapidement des caractéristiques de mort apoptotiques, telles que l'oligomérisation d'Apaf-1, l'activation des caspases, la fragmentation de l'ADN et un aspect morphologique particulier aux cellules apoptotiques [78, 699, 700, 709]. Mes travaux de doctorat présentés dans le chapitre 3 ont aussi démontré que l'apoptose des cellules Namalwa traitées avec la CPT est associée à la translocation mitochondriale et à l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et au relargage cytosolique du cytochrome c, qui sont des événements reliés à l'activation de la voie mitochondriale. Récemment, une perméabilisation partielle de la membrane lysosomiale accompagnée d'une fuite du contenu du lysosome dans le cytosol, appelée ss Δ LL, a été observée dans certains modèles d'apoptose, surtout dans des conditions de stress oxydatif [458, 461, 462, 710]. Ce nouveau phénomène est appelé la voie apoptotique lysosomiale. Nous avons investigué l'existence d'une telle voie lysosomiale dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique. Les résultats reportés dans le chapitre 2 démontrent que les lysosomes sont perméabilisés et que la protéase lysosomiale cathepsine-B est activée rapidement dans les cellules U937 et Namalwa, c'est-à-dire entre 2 à 3 h après le traitement de CPT. De plus, ces deux phénomènes typiques de

l'activation d'une voie lysosomiale surviennent simultanément avec la perméabilisation mitochondriale (chute du $\Delta\Psi_m$) et l'activation des caspases dans les deux lignées cellulaires étudiées (*Chap.2, Fig. 1 A, B, C, D*). Ces résultats suggèrent qu'en plus de la voie mitochondriale, une voie lysosomiale est aussi activée par le dommage à l'ADN.

Étant donné que la perméabilisation lysosomiale et le ssALL ont été observés principalement dans des cellules subissant un stress oxydatif quelconque, nous avons évalué la possibilité qu'un stress oxydatif soit généré dans les cellules traitées avec la CPT, bien que la production de RLO n'est habituellement pas associée à l'apoptose induite par la CPT. Nous avons donc mesuré la production d'anion superoxyde dans les cellules et nos résultats démontrent qu'il n'y a pas d'augmentation de la génération de superoxyde dans les cellules U937 et Namalwa après le traitement de CPT (*Chap.2, Fig. 1 E, F*). La mesure de la production de RLO par le DHE est une technique fiable et largement utilisée pour évaluer le stress oxydatif cellulaire [711, 712]. Selon nos résultats, la rupture lysosomiale induite par la CPT ne résulte donc pas d'un stress oxydatif subit par les cellules U937 et Namalwa.

Plusieurs modèles d'apoptose nécessitent l'activité de l'enzyme lysosomiale cathepsine-B [258-260]. La cathepsine-B est rapidement activée après le traitement de CPT dans les lignées cellulaires U937 et Namalwa (*Chap.2, Fig. 1 C, D*). La rapide activation de la cathepsine-B suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'apoptose. Afin d'évaluer l'implication de la cathepsine-B dans notre modèle d'apoptose induite par la CPT, nous avons bloqué l'activité de la cathepsine-B avec un inhibiteur peptidique, le Z-FA-DMK. L'inhibition de la cathepsine-B dans les cellules U937 résulte en une réduction significative de l'activation des caspase-3-like, de la proportion de cellules démontrant une perméabilisation mitochondriale (chute du $\Delta\Psi_m$) et lysosomiale (ssALL) et du % de cellules ayant une quantité hypoploïde d'ADN (sub-G₁) (*Chap.2, Fig. 5*). Ces résultats démontrent que la cathepsine-B participe de façon active à la propagation de l'apoptose induite par la CPT, peut-être en générant une boucle d'amplification du signal apoptotique. Le Z-FA-DMK inhibe aussi l'activité de la cathepsine-L, alors que la cathepsine-D n'est pas affectée [470, 475]. Par conséquent, la réduction de l'apoptose observée dans les cellules U937 incubées en présence de Z-FA-DMK n'est peut-être pas seulement due à l'inhibition de la cathepsine-B et pourrait aussi impliquer un blocage de la cathepsine-L. Toutefois, l'activation de la cathepsine-L n'a pas été investiguée dans notre étude. Par contre, bien que l'activité de la cathepsine-B soit bloquée par le Z-FA-DMK de manière

aussi efficace dans les cellules Namalwa, l'inhibition de la cathepsine-B ne cause pas d'effet significatif sur la propagation de l'apoptose dans les cellules Namalwa (*données non-montrées*). Les souris déficientes à la fois pour la cathepsine-B et la cathepsine-L (double knock-out) présentent de graves anomalies alors que les souris déficientes pour une seule des deux protéases sont très peu affectées [713, 714]. Ces études génétiques suggèrent une certaine redondance dans les fonctions des diverses cathepsines, tout comme la redondance connue des différents membres des caspases. La perte de l'activité de la cathepsine-B dans les cellules Namalwa pourrait donc être compensée par l'action d'autres cathepsines, d'où l'absence d'effet significatif du Z-FA-DMK sur l'apoptose des cellules Namalwa. Il a été reporté que l'inhibiteur peptidique Z-FA-DMK peut aussi inhiber l'activité de la caspase-3 lorsqu'utilisé en concentration élevée. En effet, la IC_{50} du Z-FA-DMK, c'est à dire la concentration nécessaire pour produire 50 % de l'effet maximal, est évaluée à 100 μ M pour inhiber la caspase-3 [470]. Dans nos études, nous avons utilisé une concentration de 10 μ M de Z-FA-DMK, il est donc très peu probable que cette faible dose ait directement provoqué une certaine réduction des activités caspase-3-like. De plus, si le Z-FA-DMK avait inhibé la caspase-3 dans notre système, nous aurions probablement mesuré une réduction des activités caspase-3-like aussi dans les cellules Namalwa, ce qui ne fut pas le cas, car l'amplitude des activités caspase-3 induite par la CPT n'était pas affectée par le Z-FA-DMK dans les cellules Namalwa.

Selon certaines études, la protéine Bcl-2-like pro-apoptotique Bid peut être clivée par certaines cathepsines, dont la cathepsine-B, le fragment tronqué tBid peut ensuite transloquer vers la mitochondrie et induire le relargage de cytochrome c, connectant ainsi la rupture lysosomiale à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale [407, 474]. Par contre, nous n'avons obtenu aucune évidence dans notre étude que Bid subit un clivage dans les cellules U937 et Namalwa pendant l'apoptose induite par la CPT (*Chap.2, Fig. 6 A*). La translocation d'un fragment tBid vers les compartiments mitochondrial et lysosomal est donc peu probable dans notre modèle d'apoptose, écartant ainsi Bid d'un rôle potentiel de connecteur entre les voies lysosomiale et mitochondriale. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs cruciaux du processus apoptotique. Suite à un signal de mort cellulaire, ces protéines subissent des changements de conformation qui stimulent et/ou facilitent leur insertion dans les membranes des organites intracellulaires, particulièrement dans la mitochondrie, où les Bcl-2-like modulent le phénomène de perméabilisation mitochondriale [64]. Certains Bcl-2-like ont aussi été localisés dans la

membrane du RE où ils agissent, encore une fois, de régulateurs de l'apoptose en étant surtout impliqués dans les mécanismes d'homéostasie du calcium [490]. Il est donc tentant de spéculer que les protéines de la famille Bcl-2 pourraient aussi transloquer vers le compartiment lysosomal et y promouvoir la rupture de la membrane du lysosome. Toutefois, aucune évidence expérimentale supportant un tel phénomène n'est actuellement disponible dans la littérature. Nous avons donc investigué cette possibilité et nos résultats abondent dans la même direction, c'est-à-dire que nous n'avons pas été en mesure de démontrer de manière convaincante que certains Bcl-2-like ciblent les lysosomes pendant l'apoptose. Bien qu'il soit apparemment difficile d'obtenir des fractions d'organites purifiées très pures, nos résultats suggèrent que les protéines de la famille Bcl-2, du moins celles que nous avons étudiées, sont absentes du compartiment lysosomal pendant l'apoptose induite par la CPT dans les cellules U937 et Namalwa (*Chap.2, Fig. 6 B, C, D*). La translocation lysosomiale des Bcl-2-like demeure donc au stade hypothétique et d'autres types d'approches expérimentales devront être entreprises afin de clarifier cette question.

Nous avons donc mis en évidence l'activation d'une voie lysosomiale après l'induction d'un dommage génotoxique par la CPT. Cette voie est caractérisée par une perméabilisation des lysosomes (ss Δ LL) et par l'activation de la cathepsine-B, laquelle semble contribuer activement à la propagation de l'apoptose. Des investigations futures sont nécessaires pour disséquer le mode d'action exact de la cathepsine-B dans notre modèle d'apoptose et pour déterminer l'importance des autres cathepsines dans la promotion ou l'amplification de l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage à l'ADN.

5.2.2 La rupture lysosomiale dépend de la perméabilisation des mitochondries

La perméabilisation mitochondriale survient après la rupture lysosomiale dans plusieurs modèles de mort cellulaire apoptotique, incluant l'apoptose induite par un stress oxydatif [715], par un traitement avec le TNF- α [466] et la staurosporine [475], par des petites doses de sphingosine [272], par certains agents lysosomotropiques [465, 474, 476] et par la réactivation de la fonction de p53 [716]. À l'opposé, au meilleur de notre connaissance, aucune évidence expérimentale n'a fait état d'une rupture lysosomiale et d'un ss Δ LL se produisant après ou en tant que conséquence de la perméabilisation

mitochondriale. Selon nos résultats, les mitochondries et les lysosomes semblent être endommagés simultanément pendant les premières heures de l'apoptose induite par la CPT dans les cellules U937 et Namalwa (*Chap.2, Fig. 1 A, B, C, D*). À eux seuls, ces seuls résultats ne permettent donc pas de suspecter lequel des deux événements dépend de l'autre, si dépendance il y a. Donc, pour investiguer la hiérarchie potentielle entre la rupture lysosomiale et le dommage mitochondrial, nous avons utilisé des inhibiteurs du méga-pore mitochondrial mPTP afin d'empêcher la perméabilisation des mitochondries après le traitement de CPT et d'évaluer l'effet de cette protection sur l'intégrité des lysosomes. Les deux agents utilisés pour bloquer l'ouverture du mPTP sont la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de l'enzyme cyclophilin D, un constituant du mPTP, et l'acide bongkrekiac (BkA), qui inhibe directement la portion ANT du mPTP. Nos résultats démontrent que le blocage du mPTP diminue effectivement la perméabilisation mitochondriale et réduit de manière équivalente le $\text{ss}\Delta\text{LL}$ dans les cellules U937 (*Chap.2, Fig. 2 A, B*). Ces résultats suggèrent donc que la rupture lysosomiale dépend d'abord de la perméabilisation des mitochondries. Étant donné que des structures de canaux ou de méga-pores analogues au mPTP n'ont jamais été décrits dans la membrane du lysosome, il est improbable que les agents CsA et BkA agissent directement sur le lysosome pour moduler sa perméabilisation. Par ailleurs, nous avons observé que les cellules Namalwa incubées avec les inhibiteurs CsA et BkA subissent quand même une chute du $\Delta\Psi\text{m}$ et un $\text{ss}\Delta\text{LL}$ après le traitement de CPT (*données non-montrées*). Ces données suggèrent que dans les cellules Namalwa, la dissipation du $\Delta\Psi\text{m}$ peut survenir indépendamment de l'ouverture du mPTP ou de la fonction d'ANT, qui représente la cible de l'action inhibitrice des agents CsA et BkA. Il a été effectivement démontré que la chute du $\Delta\Psi\text{m}$ peut avoir lieu en l'absence d'une ouverture du mPTP, entre autres lors de l'apoptose induite par granzyme B [717]. Un peptide mimant le domaine BH3 des protéines Bcl-2-like cause aussi une chute du $\Delta\Psi\text{m}$ et l'apoptose indépendamment de la fonction d'ANT [718].

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL promouvoient la survie cellulaire principalement en protégeant les mitochondries de la perméabilisation [324, 329, 719]. Surexprimer des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 constitue donc une autre approche pour empêcher la perméabilisation mitochondriale. Bien qu'une protection contre la rupture lysosomiale ait été observée par le groupe de Zhao et al. dans des cellules surexprimant Bcl-2 après une insulte oxydative [487, 488], aucune donnée expérimentale n'a démontré que les protéines anti-apoptotiques protègent directement les lysosomes. Il

semble plus probable que l'effet lyso-protecteur de la surexpression de Bcl-2 reporté par Zhao et al.[487, 488] soit dû à l'action protectrice de Bcl-2 sur la mitochondrie. Dans le même ordre d'idées, l'équipe de Boya et al. a démontré que la surexpression de Bcl-2 est incapable d'empêcher la rupture lysosomiale et le ss Δ LL induit par l'agent lysosomotropique ciprofloxacine, qui cible et perturbe directement les lysosomes [465]. Dans notre étude, la surexpression de Bcl-xL confère une protection complète contre la perméabilisation des mitochondries et des lysosomes dans les cellules Namalwa, alors que dans les cellules U937, la protection causée par Bcl-xL est partielle mais équivalente pour les deux types d'organites (*Chap.2, Fig. D, E*). Les deux types de lignées cellulaires surexpriment des niveaux similaires de protéines Bcl-xL 4 h après le traitement de CPT (*Chap.2, Fig. C*), la protection incomplète conférée par Bcl-xL dans les cellules U937 n'est donc pas due à des différences dans les niveaux d'expression de Bcl-xL. Il apparaît donc que les signaux de mort cellulaire qui induisent la chute du $\Delta\Psi_m$ et le ss Δ LL ne sont pas entièrement bloqués par la surexpression de Bcl-xL dans les cellules U937, ce qui concorde avec des observations précédentes indiquant que Bcl-xL protège de façon partielle seulement cette lignée cellulaire de l'apoptose [699]. Bien que dans notre modèle, la possibilité que Bcl-xL agisse directement sur le lysosome pour préserver son intégrité ne puisse pas être complètement écartée, il est plus probable que l'effet lyso-protecteur de Bcl-xL soit une conséquence de son action protectrice sur la mitochondrie. De plus les études de relocalisation lysosomiale ont montré que Bcl-2, un confrère très homologue de Bcl-xL, ne semble pas être présent dans le compartiment lysosomal dans notre modèle d'apoptose, éloignant davantage les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL d'un rôle lyso-protecteur direct (*Chap.2, Fig. 6 B, C, D*).

Selon les résultats que nous avons obtenus, la rupture lysosomiale et le ss Δ LL survenant après l'induction du dommage génotoxique semble nécessiter préalablement la perméabilisation des mitochondries. C'est donc la première fois, au meilleur de notre connaissance, que la rupture lysosomiale est reportée en tant que conséquence du dommage mitochondrial. De plus, nos résultats suggèrent que l'activation de cette voie lysosomiale, du moins l'activité de la cathepsine-B, contribue activement à la propagation de l'apoptose dans notre modèle. Ces données font ressortir l'importance de la contribution lysosomiale pour la voie mitochondriale de l'apoptose induite par un dommage à l'ADN.

5.2.3 Les caspases sont essentielles aux voies mitochondriale et lysosomiale

Notre étude démontre que l'activation des caspases est une étape cruciale de la mort cellulaire apoptotique induite par le dommage génotoxique. En effet, bloquer l'activation des caspases avec un inhibiteur général, le peptide Z-VAD-FMK, protège totalement les mitochondries et les lysosomes de la perméabilisation induite par la CPT dans les U937 et les Namalwa (*Chap.2, Fig.3 A, B*). Donc, l'activité des caspases est absolument nécessaire pour qu'il y ait chute du $\Delta\Psi_m$ et rupture lysosomiale dans les deux types de lignées cellulaires. Ces résultats étaient plutôt inattendus, étant donné que l'activation des caspases, surtout les caspase-9-like initiatrices et caspases-3-like effectrices, est habituellement située en aval de la dysfonction mitochondriale dans les principaux modèles d'apoptose causée par un dommage à l'ADN [229, 427, 429, 431].

Selon de récentes évidences, un nouveau complexe d'activation de caspases pourrait agir en amont de la mitochondrie et jouer un rôle prépondérant dans l'activation de la voie mitochondriale (*voir section: 1.2.4.1 - Les voies d'activation des caspases*) [231]. La caspase-2 pourrait faire partie de ce nouvel apoptosome et son activation précoce serait impliquée activement dans l'induction de la perméabilisation mitochondriale [234, 240-244]. Pour investiguer le rôle de la caspase-2 dans notre modèle d'apoptose, nous avons dérivé des cellules Namalwa exprimant des siRNA afin de bloquer l'expression de la caspase-2L, l'isoforme longue pro-apoptotique aussi appelée tout simplement la caspase-2. Nos résultats démontrent que la perte d'expression de la caspase-2 dans les cellules Namalwa (*Chap.2, Fig.3 C, panneau de gauche*) diminue de façon significative l'activité DEVDase des caspase-3-like médiée par la CPT (*Chap.2, Fig.3 C, panneau de droite*), indiquant que la caspase-2 est impliquée dans l'activation de la cascade des caspases. De plus, nous avons démontré que la perte d'expression de la caspase-2L réduit fortement la chute du $\Delta\Psi_m$ et le ssALL induits par la CPT (*Chap.2, Fig.3 D*), protégeant ainsi les deux organites de la perméabilisation. Ces données suggèrent que la caspase-2 agit en amont des perturbations mitochondriales et lysosomiales dans les cellules apoptotiques. Il semble donc qu'une caspase initiatrice, probablement la caspase-2, soit activée de manière précoce, en amont du dommage mitochondrial dans notre modèle d'apoptose. Il est d'ailleurs possible que le peptide Z-VAD-FMK inhibe cette caspase initiatrice, empêchant ainsi la perméabilisation des mitochondries et des lysosomes. L'activation de la caspase-2 pourrait donc être une étape cruciale dans l'induction de l'apoptose générée par un

dommage génotoxique. À noter que nous n'avons pas été en mesure de dériver un modèle de cellules U937 exprimant des siRNA contre l'expression de la caspase-2. Les cellules U937 se sont avérées très sensibles à la transfection du vecteur Cep4-U6-SiRNA-caspase-2 et à la sélection avec l'hygromicin B, démontrant un taux de mortalité très élevé. Il est aussi important de mentionner que nos résultats ne permettent pas de discriminer entre les deux possibilités suivantes: 1) la protection lysosomiale conférée par le Z-VAD-FMK et observée lors de l'inhibition de l'expression de la caspase-2 est une conséquence de la préservation de l'intégrité mitochondriale suite à l'inhibition des caspases, et/ou 2) des caspases spécifiques, telle que la caspase-2, sont directement impliquées dans l'induction de la rupture lysosomiale et l'inhibition de ces caspases protège directement les lysosomes.

Une autre possibilité pour expliquer la protection des organites conférée par le Z-VAD-FMK est que les caspases pourraient aussi être directement impliquées dans l'induction de la chute du $\Delta\Psi_m$. Le modèle de dissipation du $\Delta\Psi_m$ en deux étapes proposé par Marzo et al. [373] stipule que l'activation des caspases est requise pour la phase majeure de dissipation du $\Delta\Psi_m$, agissant comme un système d'amplification des perturbations mitochondriales. De plus, il a déjà été démontré que l'inhibition des caspases par le Z-VAD-FMK peut prévenir entièrement la chute du $\Delta\Psi_m$ et la perméabilisation mitochondriale dans certains systèmes de mort cellulaire apoptotique [368, 374]. Récemment, Ricci et al. ont reporté que les caspases actives, profitant de l'augmentation de la perméabilité mitochondriale pendant les premières phases de l'apoptose, pouvaient pénétrer dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et cliver la sous-unité p75 du complexe I de la chaîne de transport des électrons, provoquant la chute du $\Delta\Psi_m$ [720]. Cette étude supporte un rôle direct pour les caspases dans l'induction de la perte de $\Delta\Psi_m$.

Il est également possible que la dose de 100 μM de Z-VAD-FMK utilisée dans notre étude cause une réduction de l'activité de certaines cathepsines, dont la cathepsine-B [470], ainsi que de l'activité des protéases calcium-dépendantes calpaïnes [254], ce qui pourrait contribuer à l'effet protecteur du Z-VAD-FMK.

Notre étude démontre donc que l'activation des caspases est essentielle pour qu'il y ait perméabilisation des mitochondries et des lysosomes. Les caspases, dont la caspase-2, semblent jouer un rôle crucial dans l'activation des voies mitochondriale et lysosomiale de l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique.

5.2.4 L'implication des sphingosines dans le mécanisme de rupture de la membrane lysosomiale

Actuellement, les mécanismes moléculaires menant à la rupture de la membrane lysosomiale sont encore obscurs. La sphingosine, un métabolite de la voie des sphingomyélines et des céramides, est localisée particulièrement dans la membrane lysosomiale. En effet, à cause de sa portion polaire impliquée dans un mécanisme de capture de protons, la sphingosine est attirée sélectivement par l'acidité du compartiment lysosomal. Une fois dans la membrane lysosomiale, la sphingosine pourrait agir comme un détergent et causer la rupture de la membrane [272, 478] (*voir section: 1.3.2.3 - Les mécanismes de perméabilisation mitochondriale*). Il a été démontré que l'addition de petites quantités de sphingosine exogène à des cellules provoque une rupture lysosomiale et l'apoptose [272, 478] et que la fabrication de sphingosine augmente pendant l'apoptose induite par le TNF- α [721], une condition qui fut par la suite associée à la perméabilisation des lysosomes [466]. Nous avons donc investigué le rôle de la sphingosine dans la perméabilisation lysosomiale observée dans notre modèle d'apoptose induite par la CPT. Le catabolisme des céramides en sphingosine par l'action de l'enzyme céramidase acide est la source majeure de sphingosine dans les cellules [722, 723]. Les cellules ont été incubées avec un inhibiteur chimique de la céramidase acide, le N-oleoylethanolamine (NOE), afin de diminuer les niveaux intracellulaires de sphingosine. Nos résultats démontrent que l'inhibition de la céramidase acide diminue de manière significative le ssALL induit par la CPT, et réduit aussi la perte du $\Delta\Psi_m$ de manière équivalente dans les cellules U937 (*Chap.2, Fig.4 A*). De plus, nous avons mesuré une augmentation des niveaux de sphingosine dans les cellules U937 pendant les premières heures suivant le traitement de CPT, ce qui coïncide avec le début de la perméabilisation des lysosomes et des mitochondries (*Chap.2, Fig.4 B*). Les cellules U937 incubées avec une petite dose de sphingosine synthétique ont aussi démontrées une certaine perméabilisation des lysosomes et des mitochondries (*données non-montrées*). Ces données indiquent que l'augmentation des niveaux de sphingosine pourrait faire partie du mécanisme de rupture lysosomiale dans notre modèle d'apoptose des U937. De plus, l'observation que le NOE cause aussi une protection de la mitochondrie suggère, pour la première fois dans notre étude, que la rupture lysosomiale pourrait aussi contribuer à perméabiliser les mitochondries, suggérant l'existence d'une voie signalétique fatale bi-directionnelle entre les deux organites pendant

l'apoptose induite par un dommage à l'ADN. À l'inverse, l'inhibition de la céramidase acide dans les cellules Namalwa n'empêche pas le ss Δ LL ni la chute du $\Delta\Psi_m$ induits par la CPT (*données non-montrées*). Deux autres formes de céramidase, la céramidase neutre/alcaline et la céramidase alcaline, ont aussi été clonées à partir de cellules humaines [724, 725]. Il est donc possible que l'inhibition de la céramidase acide soit compensée par l'activité des autres formes de céramidase, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet significatif du NOE dans les cellules Namalwa et la protection de type uniquement partiel dans les cellules U937.

Dans le compartiment lysosomal, la portion hydrophile de la sphingosine subit une protonation due au faible pH. Sous cette forme chargée, la sphingosine devient un détergent beaucoup plus puissant que lorsqu'elle est non-chargée, ce pourquoi la sphingosine lysosomiale déstabilise la membrane et cause une rupture des lysosomes [272, 726]. Donc, la possibilité que la sphingosine induise directement une déstabilisation de la membrane mitochondriale via un mécanisme similaire est plutôt improbable, parce que dans la membrane mitochondriale, la sphingosine serait surtout sous sa forme non-chargée, donc beaucoup moins menaçante pour l'intégrité membranaire de la mitochondrie.

Récemment, Taha et al. ont démontré une réduction de l'activité de la sphingosine kinase-1, l'enzyme qui convertit la sphingosine en sphingosine-1-phosphate, accompagnée d'une élévation des niveaux intracellulaires de sphingosine, pendant l'apoptose induite par plusieurs agents qui endommagent l'ADN, par un mécanisme dépendant des protéases sensibles au Z-VAD [481]. De plus, Werneburg et al. ont reporté que l'activité de la cathepsine-B accroît la rupture lysosomiale causée par la sphingosine [482], ce qui supporte le rôle actif joué par la cathepsine-B dans notre modèle d'apoptose. Il est donc possible que l'activité de la sphingosine kinase-1 soit aussi affectée dans notre modèle, peut-être via l'activité protéolytique des caspases, possiblement la caspase-2, ce qui contribue à augmenter les niveaux de sphingosine après le traitement de CPT. La cathepsine-B pourrait à son tour contribuer à l'activation des caspases et à la perméabilisation des organites, peut-être en agissant comme une boucle d'amplification des phénomènes apoptotiques. L'ensemble de ces données suggère donc l'existence d'un réseau d'interactions complexe entre l'activité des caspases, des cathepsines et de la voie des sphingosines, qui semble moduler la perméabilisation des lysosomes et des mitochondries pendant l'apoptose.

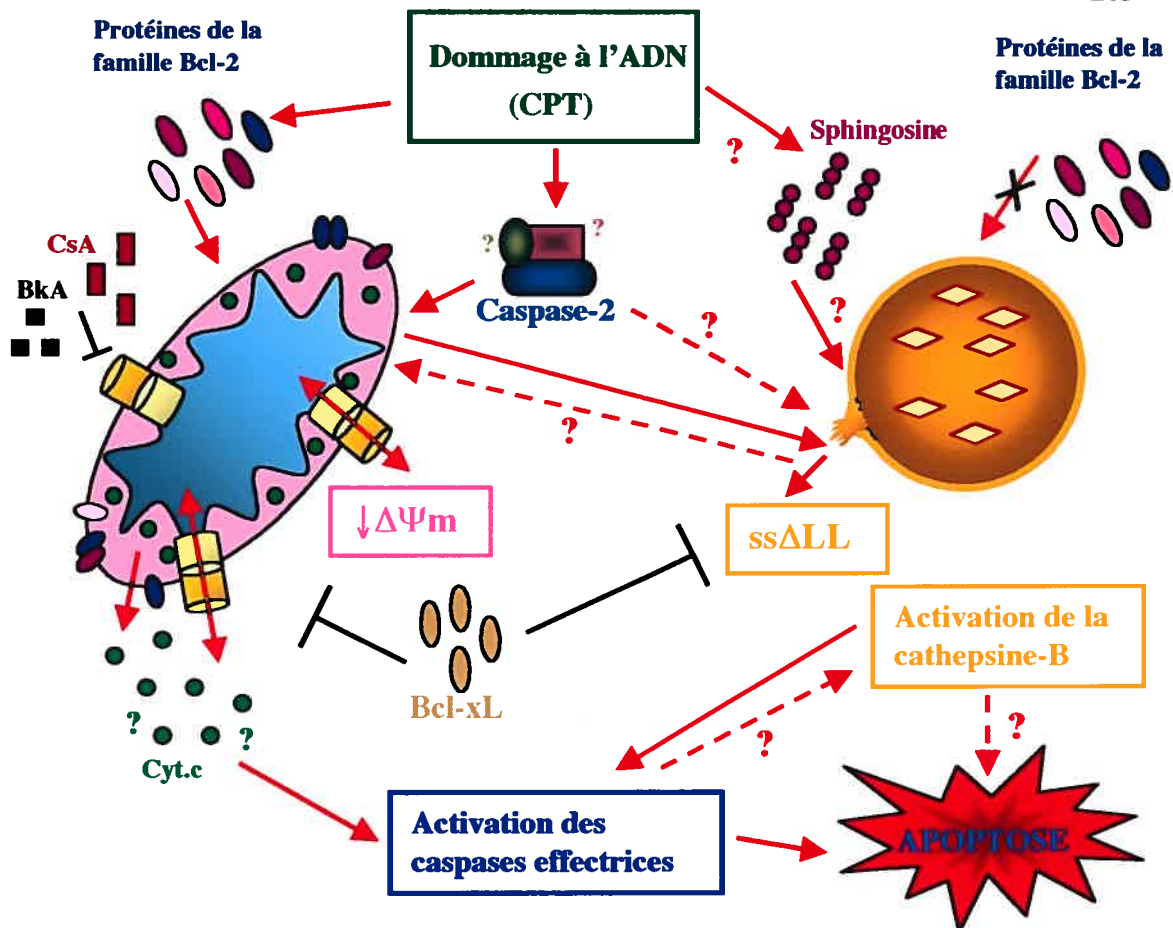


Fig.6 Caractéristiques de la voie apoptotique lysosomiale induite par la CPT.

L'induction de dommage à l'ADN par la camptothécine (CPT) mène à l'activation d'une voie apoptotique lysosomiale caractérisée par une perméabilisation des lysosomes (ssΔLL) et par l'activation de la cathepsine-B. L'inhibition de la cathepsine-B résulte en une réduction significative de l'activation des caspases-3-likes et du % de cellules démontrant une chute du potentiel transmembranaire mitochondriale ($\downarrow\Delta\Psi_m$), un ssΔLL et une quantité hypoploïde d'ADN (sub-G₁), ce qui indique que la cathepsine-B participe activement à la propagation de l'apoptose induite par la CPT. La rupture lysosomiale et l'activation de la cathepsine-B surviennent simultanément avec la $\downarrow\Delta\Psi_m$ et l'activation des caspases effectrices. L'activité des caspases, plus particulièrement de la caspase-2, est essentielle pour que la CPT induise le ssΔLL et la $\downarrow\Delta\Psi_m$, suggérant que la caspase-2 serait activée de manière précoce et agirait en amont des perturbations mitochondriales et lysosomiales dans les cellules apoptotiques p53-déficientes. L'inhibition de l'ouverture du mPTP avec la cyclosporine A (CsA) et l'acide bongkreikic (BkA), ainsi que la surexpression de l'anti-apoptotique Bcl-xL, diminuent de façon équivalente la $\downarrow\Delta\Psi_m$ et le ssΔLL causés par la CPT, suggérant que la rupture lysosomiale nécessite au préalable la perméabilisation des mitochondries. L'inhibition de la céramidase acide, l'enzyme responsable de la génération de sphingosine, mène à une réduction du ssΔLL induit par la CPT, ainsi qu'à une réduction similaire de la $\downarrow\Delta\Psi_m$, et il y a une hausse des niveaux intracellulaires de sphingosine peu de temps après le traitement de CPT, suggérant que les sphingosines pourraient être impliqués dans la rupture lysosomiale. L'activation d'une voie lysosomiale est donc un nouvel élément dans l'apoptose p53-indépendante induite par une lésion génotoxique.

Dans notre étude, nous remarquons de façon générale que la protection contre la perméabilisation conférée par les inhibiteurs BkA (*Chap.2, Fig.2 B*), Z-FA-DMK (*Chap.2, Fig.5*) et NOE (*Chap.2, Fig.4 A*) est significative seulement pendant les 4 à 5 premières heures de l'apoptose, après lesquelles l'effet protecteur est habituellement perdu. Nous pensons que des boucles d'amplification et de rétroaction positive, générées entre autres par l'activité des protéases, pourraient être responsable d'une intensification de la dysfonction mitochondriale ainsi que d'une amplification globale des signaux de mort cellulaire, d'une façon si forte que l'action d'un seul agent inhibiteur finit par être surpassée.

En conclusion, l'étude présentée dans le chapitre 2 démontre l'activation rapide d'une voie lysosomiale pendant l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique. La rupture lysosomiale et l'activation de la cathepsine B surviennent en même temps que la perméabilisation mitochondriale et l'activation des caspases. Nos résultats suggèrent que la rupture lysosomiale nécessite l'activation des caspases, dont la caspase-2, la perméabilisation des mitochondries et l'accumulation intracellulaire de sphingosine (*voir Fig.6 - Caractéristiques de la voie apoptotique lysosomiale induite par la CPT*). La voie lysosomiale pourrait aussi contribuer à son tour à la propagation et à l'amplification de l'apoptose dans les cellules apoptotiques.

5.3 Rôles des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la voie mitochondriale de l'apoptose p53-indépendante

5.3.1 Induction et/ou augmentation de l'expression des BH3-unique Bik et Bim après l'induction d'un dommage à l'ADN

L'apoptose induite par un dommage génotoxique est caractérisée principalement par l'activation de la voie mitochondriale [324, 329, 707, 708]. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs cruciaux de l'apoptose et agissent surtout au niveau de l'activation et du contrôle des événements apoptotiques mitochondriaux, tels que la perméabilisation de la membrane externe et le relargage du cytochrome c. La régulation de l'activation de la voie mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2 a surtout été étudiée dans un contexte cellulaire où la protéine p53 est fonctionnelle. En effet, l'activation de la protéine p53 par les divers traitements de chimiothérapie et de

radiothérapie enclenche les réponses cellulaires dont l'activation du programme apoptotique [727]. L'induction de gènes pro-apoptotiques par le facteur p53 constitue son mode d'action pro-apoptotique principal. Parmi les cibles de p53 on retrouve des membres de la famille Bcl-2 dont les gènes pro-apoptotiques *bax*, *puma*, *noxa* et *bid* (voir section: 1.4.2.1 - *Le facteur p53*). Ces protéines peuvent ensuite promouvoir l'apoptose de diverses façons, principalement en transloquant vers le compartiment mitochondrial, où elles stimulent la perméabilisation de la mitochondrie et/ou inhibent l'action protectrice de leurs homologues anti-apoptotiques (voir section: 1.3.1.3 - *La translocation mitochondriale et l'action des protéines de la famille Bcl-2*). La régulation de la voie mitochondriale et le comportement moléculaire des protéines de la famille Bcl-2 lors de l'apoptose induite par un dommage génotoxique, mais survenant en l'absence d'une protéine p53 fonctionnelle, demeurent actuellement peu connus. Pourtant, un environnement cellulaire tumoral p53-déficient est représentatif de plus de la moitié des néoplasmes humains. Nous avons donc entrepris une étude visant à mieux définir l'apoptose activée indépendamment de p53, en investiguant plus précisément les fonctions des protéines Bcl-2-like dans l'apoptose p53-indépendante et les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 3.

En utilisant, comme modèle expérimental, la lignée cellulaire Namalwa p53-déficiente, nous avons démontré une augmentation de l'expression et/ou une translocation mitochondriale de certaines protéines pro-apoptotiques Bcl-2-like après l'induction du dommage à l'ADN par la CPT. Les protéines de type BH3-unique Bik et les isoformes Bim-EL, Bim-L et Bim-S subissent une augmentation d'expression aussi tôt qu'une heure après le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.3*). L'apoptose dans les cellules Namalwa est très rapide, le cytochrome c apparaît dans le cytosol entre 2 h et 3 h après le traitement, le pic de la chute de $\Delta\Psi_m$ se situe entre 3 h et 4 h après le traitement, les caspase-9-like (LEHDase) et -3-like (DEVDase) sont activées entre 2 h et 4 h après CPT, le pic d'activation se situant à 6 h, la fragmentation de l'ADN débute entre 3 h et 4 h après le traitement et la cellule présente des caractéristiques morphologiques typiquement apoptotiques dès 4 h suivant le traitement (*Chap.3, Fig.1*). Il semble donc que la voie mitochondriale soit activée dans les 3 premières heures suivant le traitement de CPT et que le processus apoptotique se déroule entièrement pendant une période de 6 à 8 h après l'induction du dommage à l'ADN. Le BH3-unique Bik est plus fortement exprimé tout au long du processus apoptotique, alors que l'expression de Bim-EL et Bim-L est plus forte 1 h après le traitement et est par la suite variable (*Chap.3, Fig.3*). La hausse de l'expression

de Bim-S est faible et son niveau d'expression est aussi variable après le traitement (*Chap.3, Fig.3*). Bim-EL est la seule protéine pour laquelle une induction au niveau de l'ARNm a été détectée, bien que cette augmentation des niveaux d'ARNm codant pour Bim-EL apparaisse uniquement dans les 2 h à 4 h après le traitement (*Chap.3, Fig.2 B*), alors que l'augmentation de l'expression de la protéine survient 1 h après le traitement (*Chap.3, Fig.3*). De plus, l'augmentation de l'expression de la protéine Bik (*Chap.3, Fig.3*) ne corrèle pas avec une induction au niveau de l'ARNm, les quantités d'ARNm codant pour Bik n'augmentent pas de manière significative pendant les premières heures de l'apoptose (*Chap.3, Fig.2 A*). Ces résultats suggèrent que l'augmentation d'expression soudaine des Bcl-2-like ne peut pas être uniquement due à une activation transcriptionnelle. De façon générale, les cellules traitées à la CPT montrent une grande hétérogénéité et complexité dans leurs réponses cellulaires, incluant la voie du système ubiquitine/protéosome [728], qui joue un rôle majeur dans la dégradation de nombreuses protéines impliquées dans divers processus cellulaires incluant la régulation de la mort cellulaire [729]. Il a été démontré que des inhibiteurs de la voie ubiquitine/protéosome peuvent induire l'apoptose dans une variété de lignées cellulaires tumorales et transformées, incluant les cellules Namalwa et U937 [572, 728]. Une étude récente de Sun et al. démontre qu'en cours d'apoptose, les caspases peuvent cliver certaines sous-unités régulatrices du protéosome, diminuant ou inactivant ainsi la voie de dégradation par le système ubiquitine/protéosome [206]. Selon d'autres études, les protéines de la famille Bcl-2, dont Bax, Bak, tBid, Bik, Bcl-2 et Bcl-xES, sont très sensibles à la voie de dégradation du système ubiquitine/protéosome [78, 199-203]. Une baisse d'activité du système de dégradation ubiquitine/protéosome pourrait donc résulter en une augmentation de l'expression de certains Bcl-2-like et faciliter ainsi l'apoptose. L'augmentation d'expression de Bik et Bim que nous avons observée dans les cellules Namalwa pourrait aussi être le résultat d'une altération du système ubiquitine/protéosome après le traitement de CPT. Marshansky et al. ont reporté que l'inhibition du protéosome dans des cellules T et B, incluant la lignée Namalwa, mène rapidement à la stabilisation et à l'accumulation de Bik dans les mitochondries [201]. Cette étude supporte l'hypothèse que l'expression de Bik, et possiblement de son homologue Bim, pourrait être affectée par la voie du système ubiquitine/protéosome dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante.

Une induction de Bim, au niveau de l'ARNm et de la protéine, a aussi été reportée dans d'autres modèles d'apoptose. De plus, Bim semble jouer un rôle important dans le

maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique et est essentiel à la réponse apoptotique après certains stimuli de mort cellulaire [730]. Une hausse de l'expression protéique de Bim-EL et Bim-L a été reportée suite à la stimulation du récepteur à cellule T [731]. Dans ce modèle, Bim-EL et Bim-L ont été retrouvés dans des complexes avec Bcl-xL et déclenchent la mort apoptotique des cellules T auto-réactives, possiblement en inhibant la fonction pro-survie de Bcl-xL [731]. Une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour Bim et une hausse de l'expression des protéines Bim-EL, Bim-L et Bim-S ont aussi été observées dans des cellules murines Baf-3 suite à une carence en IL-3, ainsi qu'après l'induction d'un dommage à l'ADN par un traitement avec l'étoposide [732], suggérant un rôle pour Bim dans la réponse apoptotique après un dommage génotoxique. Dans notre étude, nous n'avons pas encore déterminé les mécanismes ou les facteurs de transcription qui pourraient être responsables de l'induction de Bim. Dans les neurones sympathiques, l'activation de la voie JNK-c-Jun stimulerait l'expression de Bim [643], le gène *bim* pourrait donc être une nouvelle cible potentielle du facteur de transcription c-Jun. Le rôle du facteur c-Jun dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante a été investigué. Nos résultats, reportés dans le chapitre 4 et discutés dans une section ultérieure (*voir section: 5.7 - Un rôle pro-apoptotique pour les facteurs de transcription p73 et p63*), suggèrent toutefois que c-Jun joue un rôle anti-apoptotique dans notre modèle. Récemment, la régulation transcriptionnelle positive de Bim par les facteurs FoxO3a [661] et E2F1 [656] a été associée à l'induction de l'apoptose dans les cellules de cancer du sein MDA-231 et dans la lignée cellulaire NIH3T3, respectivement. Ces deux facteurs s'ajoutent donc à la liste de facteurs potentiellement impliqués dans l'induction de Bim dans notre modèle.

Il est intéressant de noter que nous n'avons observé aucune variation significative dans le patron d'expression du multi-domaines Bax- α , ni au niveau de l'ARNm, ni au niveau de la protéine (*Chap.3, Fig.2 A et Fig.3*). À noter que l'isoforme Bax- α est la forme la plus abondante, tout simplement appelée Bax dans la majorité des études. Cette observation n'est peut-être pas surprenante, considérant que le gène *bax* semble surtout être sous le contrôle transcriptionnel de p53 [519, 576, 577], absent dans notre modèle. De façon similaire, l'expression du multi-domaines Bak ne subit pas de variations significatives pendant l'apoptose induite par la CPT, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (*Chap.3, Fig.2 A et Fig.3*). Il semble donc que les deux catégories de protéines pro-apoptotiques se comportent différemment dans notre modèle d'apoptose: les protéines

de type BH3-unique (Bik, Bim) subissent des variations dans leur niveau d'expression, alors que le patron d'expression des protéines de type multi-domaines (Bax, Bak) demeure plutôt stable pendant l'apoptose induite par la CPT.

5.3.2 Translocation mitochondriale et oligomérisation des protéines Bcl-2-like après l'induction d'un dommage à l'ADN

L'augmentation d'expression des protéines Bik et Bim est une première indication de leur participation potentielle dans la réponse apoptotique après le traitement de CPT. Bien que cette hausse d'expression suggère l'implication de Bik et Bim, c'est surtout la localisation sous-cellulaire des Bcl-2-like qui est déterminante dans l'apoptose. Effectivement, une protéine peut être impliquée dans des phénomènes cellulaires sans nécessairement subir au préalable une induction, pourvu qu'elle soit exprimée de manière suffisante. Par exemple, les protéines multi-domaines Bax et Bak sont abondamment exprimées dans les cellules Namalwa tout au long du processus apoptotique (*Chap.3, Fig.3*). Nous avons donc investigué la relocalisation sous-cellulaire des protéines Bik et Bim, ainsi que des multi-domaines Bax et Bak, après le traitement de CPT. L'étude présentée au chapitre 2 a déjà démontré que les protéines Bcl-2-like sont apparemment exclues du compartiment lysosomal pendant l'apoptose induite par la CPT (*Chap.2, Fig.6*). Nous avons préparé des fractions mitochondriales par une technique de fractionnement sous-cellulaire et de doubles gradients de densité metrizamide/Percoll, à partir de cellules non-traitées et traitées jusqu'à 4 h avec la CPT, étant donné que l'activation de la voie mitochondriale semble survenir dans les 3 premières heures suivant le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.1*). Cette technique de purification est la même que celle utilisée dans l'étude de caractérisation de la voie lysosomiale après CPT, présentée dans le chapitre 2, qui permet de séparer les lysosomes des fractions mitochondriales.

Nos résultats démontrent que les protéines multi-domaines Bax- α et Bak transloquent à la mitochondrie entre 1 h à 2 h après le traitement de CPT dans les cellules p53-déficientes (*Chap.3, Fig.4*). Il est intéressant de constater que nous avons obtenu un patron de translocation mitochondriale similaire pour Bax- α dans une deuxième lignée cellulaire p53-déficiente, les cellules humaines monocyte-like U937 (*Chap.3, Fig.7*). Étant donné que les protéines de la famille Bcl-2 fonctionnent principalement par oligomérisation avec leurs homologues, nous avons investigué la formation de complexes

protéiques par les différents membres des Bcl-2 qui ciblent le compartiment mitochondrial en cours d'apoptose, en utilisant tout d'abord une technique chromatographique de filtration sur gel, qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (*Chap.3, Fig.5*). En plus de se relocaliser à la mitochondrie, Bax- α forme de nouveaux oligomères de haut poids moléculaire (200 à 500 kDa) dans les cellules Namalwa apoptotiques (*Chap.3, Fig.5*). En effet, nos résultats montrent que Bax- α se déplace vers la gauche après le traitement de CPT, ce qui signifie que Bax- α se complexifie davantage (*Chap.3, Fig.5*). À noter que le déplacement de Bax- α vers les fractions de haut poids moléculaire n'est pas total, c'est-à-dire que 2 h et 4 h après le traitement, on détecte encore du Bax- α dans les mêmes fractions que les cellules non-traitées (*Chap.3, Fig.5*). Cependant, nous travaillons toujours avec une population mixte de cellules, qui sont très hétérogènes dans leur réponse aux agents inducteurs de dommage à l'ADN. Ces cellules n'entrent pas toutes en apoptose au même moment, par exemple, 4 h après le traitement de CPT, il y a environ 30 % des cellules de notre population qui sont en apoptose, tel que démontré par le pourcentage de cellules qui présentent un contenu hypoploïde d'ADN ou pic sub-G1 (*Chap.3, Fig.1*). Le traitement de CPT affecte donc une proportion de la population de cellules seulement, ce qui explique pourquoi le déplacement de Bax- α est partiel et graduel dans le temps. Antonsson et al. ont obtenu un profil d'élution de Bax- α similaire dans un modèle d'apoptose différent, dans lequel ils ont analysé des extraits mitochondriaux provenant de cellules HeLa traitées avec la staurosporine [399]. Donc, même si le patron d'expression de Bax- α ne varie pas après le traitement de CPT, sa relocalisation vers la mitochondrie et son assemblage en de gros complexes protéiques contribuent possiblement à perturber la mitochondrie et à faciliter ainsi le relargage de cytochrome c.

Contrairement à Bax- α , le profil d'élution de Bak ne varie pas beaucoup après le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.5*). Il a été suggéré que Bak est une protéine qui réside principalement dans le compartiment mitochondrial où il est apparemment inactif dans des cellules saines. Suite à des signaux de mort cellulaire, Bak subit des changements de conformation et/ou des étapes d'oligomérisation qui stimulent son activation dans la membrane mitochondriale [141, 156, 403]. Des changements de conformation de Bak pourraient être responsables de son petit déplacement observé après CPT (*Chap.3, Fig.5*). La co-élution de Bax- α et de Bak dans certaines fractions (*Chap.3, Fig.5*) suggère aussi

que ces deux protéines peuvent faire partie des mêmes complexes protéiques dans les cellules apoptotiques, où Bax- α et Bak pourraient interagir avec le méga-pore mitochondrial mPTP, ou encore s'assembler sous forme de canaux mitochondriaux. Nous avons donc disséqué la composition des complexes protéiques de haut poids moléculaire observés par filtration chromatographique sur gel en effectuant des expériences d'immunoprécipitations (IP), directement à partir de fractions mitochondriales (*Chap.3, Fig.6*). Nos résultats démontrent que peu de temps après le traitement de CPT, Bax- α et Bak interagissent l'un avec l'autre (*Chap.3, Fig.6 A, B*). De plus, Bax- α et Bak se lient aussi à VDAC1, la protéine la plus abondante du mPTP (*Chap.3, Fig.6 A, B*). Il est intéressant de constater que les protéines de type BH3-unique Bim et Bik, ainsi que l'anti-apoptotique Bcl-2, sont absents des immunocomplexes formés par Bax- α et Bak (*Chap.3, Fig.6 A, B*). Au meilleur de notre connaissance, c'est la première fois que des complexes endogènes Bax/Bak, Bax/VDAC1 et Bak/VDAC1 sont détectés dans des cellules humaines après l'induction d'un dommage à l'ADN. De plus, la similarité entre le comportement moléculaire et les partenaires de liaison de Bax- α et Bak est en accord avec les données récentes qui indiquent que les multi-domaines Bax et Bak agissent de manière similaire et redondante dans de nombreux modèles de mort cellulaire [142, 157, 158]. La relocalisation mitochondriale des protéines pro-apoptotiques Bax- α et Bak et leur assemblage sous forme de complexes protéiques qui incluent la protéine mitochondriale VDAC1 pourraient bien représenter un évènement clé qui déstabilise la mitochondrie et induit l'apoptose p53-indépendante des cellules Namalwa.

Nos résultats démontrent que Bik se relocalise lui aussi à la mitochondrie entre 1 h à 2 h après CPT (*Chap.3, Fig.4*). Selon certaines études, le mode d'action principal de Bik est de lier et d'antagoniser ses homologues anti-apoptotiques comme que Bcl-2 et Bcl-xL, agissant comme un BH3-unique sensibilisateur, bien qu'il ait été aussi proposé que Bik pouvait promouvoir l'apoptose indépendamment de telles interactions [201, 418, 419, 502]. Selon Shimizu et al., Bik ne semble pas non plus interagir avec VDAC1 [352]. Dans notre étude, Bik se relocalise à la mitochondrie (*Chap.3, Fig.4*) et son profil de déplacement vers une fraction unique correspondant à une masse moléculaire d'environ 67 kDa indique la disparition de Bik en tant que monomère après le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.5*). Ces résultats suggèrent que Bik pourrait aussi être impliqué dans le phénomène de dysfonction mitochondriale, peut-être via une homo-oligomérisation avec d'autres molécules de Bik, ou via son assemblage avec des protéines distinctes. Selon les

expériences d'IP, Bik est clairement absent des immunocomplexes formés par Bax- α , Bak et Bim (*Chap.3, Fig.6*). Malheureusement, nous n'avons pas réussi à immunoprécipiter Bik à partir des fractions mitochondriales, ni à partir d'extraits de cellules entières (*données non-montrées*). Il est donc difficile de clarifier le rôle précis de Bik pour l'instant. Notre étude démontre seulement que Bik cible la mitochondrie pendant l'apoptose, mais il ne semble pas interagir avec Bax- α , Bak et Bim.

L'étude de relocalisation mitochondriale démontre également qu'au moins 2 des 3 isoformes de Bim, soit Bim-EL et Bim-L, se déplacent vers le compartiment mitochondrial entre 2 h et 3 h après le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.4*). Bim-EL et Bim-L semblent être les isoformes de Bim les plus abondantes dans les cellules Namalwa, alors que la détection de Bim-S s'avère plus difficile, bien que ce dernier semble tout de même plus fortement exprimé dans les fractions mitochondriales provenant de cellules traitées pendant 2 h et 3 h avec la CPT (*Chap.3, Fig.4*). Il a été démontré que Bim-EL et Bim-L sont séquestrés au niveau du cytosquelette dans des cellules saines, mais suite à divers signaux apoptotiques, Bim-EL et Bim-L sont libérés, transloquent vers la mitochondrie et/ou se lient à leurs homologues anti-apoptotiques pour inhiber leur fonction pro-survie, favorisant ainsi l'apoptose [160]. Une fois dans le compartiment mitochondrial, Yamaguchi et al. ont montré que Bim-EL pouvait se lier à Bax et stimuler le changement de conformation et l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale, facilitant ainsi le relargage de cytochrome c et l'apoptose, ce qui suggère que Bim-EL pourrait agir comme un BH3-unique de type activateur, comme son collègue tBid [416]. De plus, Bim-EL semble aussi être capable d'interagir directement avec VDAC1 et accroître l'activité de canal du mPTP, favorisant encore une fois la sortie des molécules apoptogéniques et l'apoptose [354]. Au contraire de Bim-EL, l'isoforme Bim-L serait incapable d'activer directement Bax, mais Bim-L interagirait plutôt avec les anti-apoptotiques, ce qui inhibe leur fonction pro-survie, tout en libérant les multi-domaines Bax et Bak de leur séquestration par les anti-apoptotiques, permettant à Bax et Bak de s'activer au niveau mitochondrial [417]. Selon ces études, Bim semble être capable de moduler la perméabilisation mitochondriale et constitue un inducteur efficace de l'apoptose.

La translocation mitochondriale que nous avons observée pour Bim-EL et Bim-L (*Chap.3, Fig.4*), ainsi que l'assemblage de Bim-EL en oligomères de haut poids moléculaire (*Chap.3, Fig.5*), suggèrent que Bim est impliqué dans la réponse apoptotique des cellules Namalwa après l'induction du dommage à l'ADN. De plus, les expériences

d'IP révèlent pour la première fois, à notre connaissance, une association endogène entre Bim et VDAC1 dans des cellules humaines (*Chap.3, Fig.6 C*). De façon intéressante, nos résultats montrent aussi que l'anti-apoptotique Bcl-2 co-précipite avec Bim, alors que les multi-domaines Bax- α et Bak et le BH3-unique Bik sont absents des immunocomplexes formés par Bim (*Chap.3, Fig.6 C*). Cette absence de Bax- α et Bak corrèle avec les expériences d'IP inverses qui montraient que Bim-EL est absent des immunocomplexes de Bax- α et Bak (*Chap.3, Fig.6 A, B*). Donc, le comportement moléculaire du BH3-unique Bim est différent de celui des multi-domaines Bax- α et Bak après l'induction d'un dommage à l'ADN dans les cellules p53-déficientes. Nos résultats suggèrent qu'après l'induction du dommage à l'ADN, Bim se lie à Bcl-2, possiblement pour inhiber sa fonction anti-apoptotique et faciliter l'exécution de la mort apoptotique. Donc Bim semble agir comme un BH3-unique de type sensibilisateur dans notre modèle, et non comme une molécule de type activatrice, étant donné que Bim n'interagit pas avec Bax et Bak. L'anticorps anti-Bim que nous avons utilisé dans notre étude immunoprécipite les 3 isoformes de Bim, Bim-EL, Bim-L et Bim-S (*Chap.3, Fig.6 C*), ce qui rend impossible l'attribution d'un rôle spécifique à chacune des isoformes. Il semble également qu'une plus petite quantité de Bim soit immunoprécipitée après le traitement de CPT (*Chap.3, Fig.6 C*), ce qui ne concorde pas avec la translocation mitochondriale de Bim observée après CPT (*Chap.3, Fig.4*). Il se peut que la forme mitochondriale de Bim subisse un changement de conformation après le début de l'apoptose. De tels changements de conformation sont effectivement requis pour que plusieurs Bcl-2-like transloquent vers la mitochondrie et s'insèrent dans la membrane [189, 190, 400, 401]. Il est possible que l'anticorps utilisé pour immunoprécipiter Bim ait de la difficulté à se lier à une molécule Bim de conformation différente, ce qui pourrait expliquer la plus petite quantité de Bim immunoprécipitée après CPT. Selon le profil d'élution de Bim-EL, VDAC1 et Bcl-2 obtenu par les expériences chromatographiques de filtration sur gel (*Chap.3, Fig.5*), l'immunoprecipitation de VDAC1 avec Bim-EL était attendue étant donné qu'il y a co-élution dans certaines fractions, alors que l'immunoprecipitation de Bim-EL avec Bcl-2 est plutôt surprenante, parce que ces deux protéines ont été détectées dans des fractions distinctes. Il est donc plus probable que ce soit les deux autres isoformes, Bim-L et Bim-S qui se lient à Bcl-2, pendant que Bim-EL interagit avec VDAC1, en accord avec les études de Terradillos et al. [417] et Sugiyama et al. [354], respectivement. L'interaction entre Bim et VDAC1 pourrait faciliter l'ouverture du mPTP, tel que démontré par Sugiyama et

al. [354], favorisant ainsi la mort par apoptose. Toutefois, nous n'avons pas détecté d'interaction entre Bim et les multi-domaines Bax/Bak, contrairement aux travaux de Yamaguchi et al. [416]. Le mode d'action de Bim semble donc dépendre du contexte cellulaire et du type d'insulte cytotoxique. Il a aussi été proposé que l'insertion de Bim dans la membrane mitochondriale pouvait causer une déstabilisation de la structure de la bi-couche lipidique, ce qui est suffisant pour induire une perméabilisation de la mitochondrie et faciliter l'apoptose [385]. Ce type d'action de Bim peut donc aussi intervenir dans notre système.

En conclusion, l'étude présentée dans le chapitre 3 permet de mieux définir le mode d'action de certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans l'apoptose p53-indépendante. Alors que les protéines Bcl-2-like ne ciblent apparemment pas les lysosomes en cours d'apoptose (*voir chapitre 2*), nous avons démontré que, dans les premières heures suivant l'induction du dommage à l'ADN, les protéines multi-domaines Bax et Bak, ainsi que les BH3-unique Bik et Bim se relocalisent vers le compartiment mitochondrial, suivi par leur assemblage sous forme de complexes protéiques distincts. Cette étude révèle pour la première fois, dans un contexte de protéines endogènes et non surexprimées expérimentalement, la formation de complexes Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 et Bim/Bcl-2 dans des cellules apoptotiques humaines. La translocation mitochondriale et l'oligomérisation des protéines de la famille Bcl-2 contribuent de manière très plausible à la déstabilisation mitochondriale et à l'exécution de l'apoptose par une voie p53-indépendante.

5.4 Un rôle pro-apoptotique pour les facteurs de transcription p73 et p63 dans l'apoptose p53-indépendante

La lignée cellulaire de lymphome de Burkitt's Namalwa présente deux mutations non-synonymes du codon 248 dans l'exon 7 de *p53*, situé dans le domaine de liaison à l'ADN. Sur un allèle du gène *p53*, l'acide aminé arginine est muté en glutamine et sur l'autre allèle, l'arginine est mutée en tryptophane [698]. Les cellules Namalwa sont donc incapables d'exprimer un facteur p53 actif transcriptionnellement. Malgré leur déficience pour p53, ces cellules meurent rapidement par apoptose suite à l'induction d'un dommage génotoxique, via l'activation des voies apoptotiques mitochondriale et lysosomiale, comme nous l'avons démontré dans les chapitres 2 et 3. Nous avons donc investigué le rôle

potentiel d'autres facteurs de transcription dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante, dans le but d'identifier un ou des facteurs qui auraient une fonction pro-apoptotique après l'induction du dommage à l'ADN. Nous avons initié notre étude en évaluant le rôle des facteurs NF- κ B et c-Jun/AP1, ainsi que de p73 et p63, les deux autres membres de la famille de p53. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 4.

NF- κ B est généralement associé à une fonction pro-survie, mais quelques études ont également suggéré que NF- κ B pouvait jouer un rôle pro-apoptotique dans certains modèles (*voir section: 1.4.2.4 - Le facteur NF- κ B*). De plus, l'activation de NF- κ B a déjà été associée à l'apoptose p53-indépendante dans un modèle d'apoptose induite par la CPT [637], d'où l'intérêt porté à NF- κ B dans notre étude. Le facteur de transcription c-Jun/AP1, activé par la cascade signalétique des JNK, intervient dans des conditions de stress cellulaire variées et a été associé à l'apoptose dans certains modèles. Le facteur c-Jun/AP1 promouvoit la survie des cellules dans certaines conditions mais des fonctions pro-apoptotiques ont plus souvent été reportées pour c-Jun/AP1 (*voir section: 1.4.2.5 - Autres facteurs de transcription*). Il a été suggéré que la voie JNK-c-Jun stimulerait l'expression du BH3-unique Bim dans des neurones privées de NGF [643]. Étant donné que nous avons observé l'induction de Bim dans les cellules Namalwa traitées avec la CPT (*voir chapitre 3*), le facteur c-Jun/AP1 constitue un candidat intéressant pour médier l'apoptose en l'absence de p53. Nos résultats démontrent clairement que le facteur NF- κ B est activé suite à l'induction du dommage à l'ADN dans les cellules Namalwa p53-déficientes (*Chap.4, Fig.1 A*), ce qui concorde avec de nombreuses données dans la littérature indiquant qu'un dommage génotoxique mène à l'activation de NF- κ B [616-621, 704]. Pour déterminer le rôle de NF- κ B, nous avons bloqué son activation en surexprimant le dominant négatif I κ B(SR) dans les cellules Namalwa. Nous avons ainsi obtenu une réduction considérable de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B après le traitement de CPT (*Chap.4, Fig.1 A*). L'activité de NF- κ B n'est toutefois pas totalement inhibée par la surexpression du dominant négatif (*Chap.4, Fig.1 A*), ce qui est possiblement dû à la présence d'autres formes d'I κ B telle que I κ B β , dont l'activité répressive sur NF- κ B n'est pas affectée par la présence d'I κ B(SR) qui inhibe uniquement la forme I κ B α [638, 702, 703]. Nous avons ensuite déterminé la conséquence d'une réduction de l'activité de NF- κ B sur la réponse apoptotique des cellules Namalwa après l'induction du dommage à l'ADN. Nos résultats indiquent que la fragmentation de l'ADN est plus élevée lorsque l'activité de NF- κ B est

réduite (*Chap.4, Fig.1 B*), ce qui suggère que le facteur NF- κ B promouvoit la survie des cellules, étant donné qu'il y a plus d'apoptose lorsqu'il est inhibé.

L'activation du facteur c-Jun/AP1 par l'induction d'un dommage génotoxique est moins bien établie que pour l'activation de NF- κ B. Selon nos résultats, l'activité de liaison à l'ADN de c-Jun/AP1 semble augmenter très légèrement et de façon uniquement transitoire dans les cellules Namalwa après le traitement de CPT (*Chap.4, Fig.2 B*). L'activation de c-Jun/AP1 par le dommage à l'ADN demeure donc incertaine dans notre système et d'autres expériences seront requises, par exemple des EMSA accompagnés de « supershift », dans le but d'identifier quels membres de la famille AP1 sont activés dans les cellules Namalwa. Outre son implication dans l'apoptose, l'activité du facteur c-Jun/AP1 est essentielle pour des processus cellulaires normaux tels que la prolifération et la différenciation de certains types cellulaires [639]. Dans nos études les cellules traitées avec la CPT sont toujours en phase proliférative, afin de maximiser l'effet de la CPT. Pour cette raison, il est donc possible que c-Jun/AP1 soit déjà activé dans les cellules Namalwa contrôles avant le traitement. Effectivement, nos résultats montrent une forte activité de c-Jun/AP1 dans les cellules contrôles (*Chap.4, Fig.2 B*). L'activité de c-Jun/AP1 demeure ensuite très forte pendant les 6 heures suivant le traitement de CPT (*Chap.4, Fig.2 B*). Il est donc clair que c-Jun/AP1 est activé dans notre modèle, mais nous ne pouvons affirmer que l'activité observée est due à l'induction du dommage à l'ADN, étant donné la forte activité aussi détectée dans les cellules contrôles. La surexpression du dominant négatif Tam67DN dans les cellules Namalwa ne semble pas non plus avoir d'effet inhibiteur significatif sur l'activité de c-Jun/AP1 (*Chap.4, Fig.2 B*), bien que le mutant Tam67DN soit exprimé fortement dans les cellules (*Chap.4, Fig.2 A*). Il se peut que le mutant Tam67DN ne fonctionne pas de façon optimale dans notre système, pour une raison inconnue, mais il est plus probable que ce soit plutôt le manque de spécificité de la technique d'EMSA envers l'activité du facteur c-Jun qui soit à l'origine du résultat obtenu. En effet, outre le facteur c-Jun, il est possible que d'autres membres de la famille AP1, par exemple les facteurs JunB, JunD, ainsi que les protéines Fos et ATF, forment des dimères actifs dans les cellules Namalwa. Ces autres facteurs AP1, qui ne sont pas affectés par la surexpression du dominant négatif Tam67DN, pourraient être responsables de la liaison de la séquence consensus AP1 et de la forte activité détectée par EMSA, masquant ainsi les variations dans l'activité des dimères formés par c-Jun. Les cellules transfectées avec le mutant Tam67DN ont été sélectionnées pendant plusieurs semaines afin d'obtenir des lignées

stables. Si la fonction c-Jun/AP1 est essentielle à la survie des cellules, il se peut que les cellules aient développé une voie compensatoire, par exemple l'activation des autres types de dimères AP1, pendant le processus de sélection. Quoi qu'il en soit, la réponse apoptotique des cellules Namalwa surexprimant le dominant négatif Tam67DN a quand même été évaluée suite au traitement de CPT. Nos résultats indiquent que le % de fragmentation de l'ADN est plus élevé lorsque les cellules surexpriment Tam67DN (*Chap.4, Fig.2 C*). Ce résultat est étonnant compte tenu de l'absence d'effet significatif de Tam67DN en EMSA, mais indique que le mutant Tam67DN produit bel et bien un effet dans les cellules. Ces données suggèrent qu'un dimère du groupe c-Jun/AP1 semble effectivement impliqué suite à l'induction du dommage à l'ADN, mais qu'il aurait lui aussi une fonction favorisant la survie des cellules, de manière similaire à NF- κ B. De façon intéressante, il a été constaté que la fonction de la voie JNK-c-Jun est reliée au statut de p53. En effet, l'inhibition de l'activité JNK par des antisens empêche la croissance de certaines cellules p53-déficientes en stimulant leur mort apoptotique, mais n'affecte pas la croissance de cellules tumorales positives pour p53 [733]. De plus, il a été reporté que la voie JNK-c-Jun bloque les arrêts du cycle cellulaire stimulés par l'activation de p53, favorisant ainsi l'apoptose p53-dépendante [734]. L'ensemble de ces données semble indiquer que la voie JNK-c-Jun stimule l'apoptose lorsque p53 est présent et activé, alors que dans des cellules tumorales p53-déficientes, la voie JNK-c-Jun exerce plutôt des fonctions anti-apoptotiques. Ces données s'accordent avec l'effet anti-apoptotique de c-Jun/AP1 observé dans nos cellules Namalwa p53-déficientes.

Les facteurs de transcription p73 et p63, les deux autres membres de la famille de p53, sont aussi impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. Toutefois, les fonctions de p73 et p63 sont moins bien connues que celles de p53 et il n'est pas certain qu'ils agissent comme supresseurs de tumeur, à l'inverse de p53 (*voir section: 1.4.2.3 - Les facteurs p73 et p63*). Le facteur p73 peut être activé suite à l'action de certains agents chimiothérapeutiques dont la camptothécine [600]. Tout comme p53, la phosphorylation de p73 accroît sa stabilité et son acétylation stimule son activité (*voir section: 1.4.2.3 - Les facteurs p73 et p63*). Par contre, la régulation du facteur p63 n'est pas très bien connue actuellement et l'activation de p63 suite à l'induction d'un dommage génotoxique est encore incertaine. Les facteurs p73 et p63 ont été associés à l'induction de l'apoptose dans quelques modèles et certains gènes-cibles de p53 tels que *bax*, *puma*, *DR5*, *p21* et *mdm2*, sont aussi transactivés par les homologues p73 et p63, bien que l'induction p73 et/ou p63-

dépendante soit souvent moindre que celle médiée par p53 (voir section: 1.4.2.3 - *Les facteurs p73 et p63*). Toutefois, selon plusieurs études, l'activation de p73 par certains agents chimiothérapeutiques est suffisante pour déclencher l'apoptose indépendamment de p53, ce qui pourrait expliquer la sensibilité de certaines lignées cellulaires tumorales p53-déficientes envers les traitements de chimiothérapie [603, 735, 736]. Les facteurs p73 et possiblement p63 sont donc des candidats potentiels pour médier l'apoptose p53-indépendante dans notre modèle. Nous avons investigué le rôle de ces facteurs dans notre modèle d'apoptose induite par la CPT. Il existe plusieurs variants de p73 et p63 exprimés à la fois dans les cellules saines et tumorales. Nous avons surexprimé dans les cellules Namalwa une forme délétée des variants p73 α , p73 β , p63 α et p63 β . Ces formes tronquées à l'extrémité N-terminale, appelées Δ Np73 α , Δ Np73 β , Δ Np63 α et Δ Np63 β , sont déficientes pour le domaine de transactivation. Ces formes délétées existent de façon endogène dans les cellules et agissent comme inhibiteur de type dominant négatif de l'activité des facteurs p73 et p63 [600, 706]. Il a été démontré que p53 et p73 induisent l'expression de l'inhibiteur Δ Np73, formant ainsi une boucle de régulation négative [737]. Selon nos résultats, les cellules qui surexpriment les dominants négatifs Δ Np73 α et Δ Np73 β ont un % de fragmentation d'ADN plus faible que les cellules Namalwa contrôles suite au traitement de CPT (*Chap.4, Fig.3 B*). Ces résultats indiquent que l'inhibition des variants p73 α et p73 β cause une résistance des cellules envers l'apoptose induite par la CPT. Nos données suggèrent donc que p73 est impliqué suite à l'induction du dommage à l'ADN et que p73 agirait de manière à promouvoir le programme apoptotique dans les cellules Namalwa p53-déficientes. De façon similaire, l'inhibition de l'isoforme p63 β protège presque totalement les cellules Namalwa de l'apoptose, du moins de la fragmentation de l'ADN, pendant les 6 premières heures suivant le traitement de CPT (*Chap.4, Fig.3 D*). Par contre, il est incertain que l'inhibition du variant p63 α induise un tel effet protecteur (*Chap.4, Fig.3 D*), bien que le mutant Δ Np63 α semble fortement exprimé dans les cellules Namalwa avant et après le traitement de CPT (*Chap.4, Fig.3 C*). Il semble également que la protéine transfectée Δ Np63 β soit plus faiblement exprimé dans les cellules Namalwa 4 h après le traitement (*Chap.4, Fig.3 C*), alors que l'effet protecteur contre la fragmentation de l'ADN demeure soutenu jusqu'à 6 h après CPT (*Chap.4, Fig.3 D*). Toutefois, l'immunobavardage « Western blot » de la fig. 6 C a été effectué uniquement pour démontrer l'expression de Δ Np63 β dans les cellules Namalwa. La

différence dans le niveau d'expression de $\Delta Np63\beta$ avant et après le traitement n'est pas nécessairement significative, étant donné l'absence de contrôle interne tel que β -actine (*Chap.4, Fig.3 C*). Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour valider ces observations.

Nos résultats suggèrent donc que p73 et p63 jouent un rôle pro-apoptotique suite à l'induction du dommage génotoxique et que ces facteurs pourraient contribuer à médier l'apoptose en l'absence de p53. Toutefois, ces résultats sont des données préliminaires et des investigations supplémentaires seront nécessaires pour affirmer avec certitude que p73 et p63 induisent l'apoptose dans notre modèle. Par exemple, d'autres paramètres apoptotiques tels que le relargage de cytochrome c et l'activation des caspases devraient aussi être évalués dans les cellules qui surexpriment les inhibiteurs de p73 et p63, et le statut d'activation de p73 et p63 suite au traitement de CPT devrait être déterminé. L'induction de p73 au niveau de l'ARNm et de la protéine par la CPT a déjà été reportée dans des lignées cellulaires tumorales de carcinome colorectal et de gliome, ainsi que dans les cellules d'ostéosarcome p53-déficientes SAOS-2 [738]. De façon intéressante, Zhu et al. ont démontré que les cellules MCF7 à la fois traitées avec la CPT et induites pour exprimer le variant p73 α exogène, démontrent une activité accrue de la caspase-2, comparativement à son niveau d'activité dans les cellules qui sont uniquement traitées avec la CPT, ou qui expriment uniquement p73 α [739]. Cette étude suggère que p73 coopère avec la CPT pour activer la caspase-2 et induire l'apoptose des cellules MCF-7. Toutefois, toujours selon Zhu et al., la potentialisation de l'apoptose par p73 semble dépendre de l'expression d'un p53 fonctionnel [739]. Nous avons démontré que la caspase-2 semble jouer un rôle initiateur important dans l'induction des voies apoptotiques mitochondriale et lysosomiale dans les cellules Namalwa traitées avec la CPT (*voir Chapitre 2*). Il serait donc intéressant d'investiguer l'existence d'un lien potentiel entre l'activation de p73 et de la caspase-2 dans notre modèle, notamment en analysant l'expression de PIDD, un composant du complexe d'activation de la caspase-2, selon l'étude de Tinel et al. [234].

Contrairement à p53 qui est activé principalement par les kinases ATM et ATR suite à l'induction du dommage à l'ADN, le facteur p73 serait plutôt activé par la tyrosine kinase c-Abl [598, 602, 603]. L'activation de p73 par c-Abl pourrait impliquer la voie de la MAP kinase p38 et cette dernière a aussi été associée à l'activation de p73 indépendamment de c-Abl [604]. De plus, il a été démontré qu'une interaction entre l'oncogène c-Myc, amplifié dans la lignée Namalwa, et p73 pouvait moduler l'activité de

ce dernier [606]. Il a aussi été reporté que le facteur E2F1 actif est recruté au promoteur du gène *p73* et stimule son expression [654]. L'acétylation de *p73* par p300 stimule le recrutement de *p73* à ses promoteurs d'ADN [605]. Mantovani et al. ont récemment défini un lien moléculaire entre les activités de c-Abl et p300 qui régule la fonction de *p73* [740]. Ils ont démontré que suite à l'action de certains agents chimiothérapeutiques (doxorubicine et cisplatine), *p73* (particulièrement le variant *p73α*) s'associe à Pin1, une enzyme qui reconnaît les résidus sérine ou thréonine phosphorylés qui sont suivis d'un résidu proline (appelés sites S/T-P), et que Pin1 est capable de catalyser des changements de conformations de ses substrats. La kinase c-Abl, activée après le dommage à l'ADN, phosphoryle *p73*, ce qui accroît l'affinité de Pin1 pour *p73*. Pin1 stimule alors un changement de conformation de *p73* qui promouvoit la liaison de *p73* à p300, ce qui augmente l'acétylation et l'activité de *p73* [740]. L'enzyme Pin1 est aussi impliquée dans l'accumulation et l'activation de p53 suite à l'induction d'un dommage génotoxique [741-743]. Pin1 pourrait donc jouer un rôle dans l'activation des membres de la famille p53 suite au dommage génotoxique. Les activités de Pin1, c-Abl et de p38 constituent donc des pistes intéressantes qui pourraient mener à l'activation de *p73* dans notre modèle d'apoptose induite par la CPT.

Il est également possible que les facteurs *p73* et *p63* soient responsables de l'induction du gène *bim* observée dans les cellules Namalwa traitées avec la CPT (voir chapitre 3). Outre le gène *bim*, d'autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, tel que le BH-unique *puma*, pourraient aussi être des cibles transactivationnelles de *p73* et *p63*. Ces hypothèses feront l'objet d'investigations futures.

Il a été démontré récemment qu'une forme mutée de p53, bien qu'incapable de lier l'ADN et de transactiver des gènes, peut transloquer à la mitochondrie et induire directement des perturbations mitochondriales et l'apoptose [744]. En effet, selon Charlot et al., les cellules de carcinome humain C33A qui portent une mutation au codon 273 de p53, situé dans le domaine de transactivation, montrent une translocation mitochondriale de la forme p53 mutée après un traitement avec la staurosporine, accompagnée d'une chute du $\Delta\Psi_m$ et de la fragmentation de l'ADN. Toutefois, ils ont observé un certain délai dans la propagation de l'apoptose des cellules mutées pour p53, comparativement aux lignées ayant un p53 fonctionnel [744]. La translocation mitochondriale de p53 avait déjà été démontrée précédemment et selon certaines études, la forme mitochondriale de p53 aurait la capacité de lier et d'antagoniser les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL [587, 588, 745].

La forme cytosolique de p53 semble également être capable d'interagir avec les multi-domaines Bax et Bak, stimulant leur activation au niveau mitochondrial [589, 590]. Les travaux de Charlot et al. suggèrent une nouvelle fonction pro-apoptotique pour une forme mutée de p53 qui transloque aussi à la mitochondrie [744]. Des formes de p53 mutées dans le domaine de transactivation conservent peut-être certaines capacités d'oligomérisation, pouvant ainsi promouvoir l'apoptose d'une façon distincte. La mutation de p53 dans les cellules Namalwa se situe au codon 248 du domaine de transactivation. Il serait intéressant de déterminer dans les cellules Namalwa si la forme mutée de p53 retient certaines capacités pro-apoptotiques, telles que translocation mitochondriale et interaction avec les membres de la famille Bcl-2. Bien que la translocation mitochondriale des variants p73 et p63 et leur dimérisation avec des protéines Bcl-2-like n'aient jamais été reportées, ces possibilités ne peuvent pas être écartées et pourraient constituer un nouveau mode d'action pour les facteurs p73 et p63 dans l'induction de l'apoptose.

5.5 Conclusions

Mon projet de doctorat s'est intéressé à l'étude des voies apoptotiques p53-indépendantes induites par un dommage génotoxique dans des cellules cancéreuses humaines. La protéine p53 est mutée ou non-fonctionnelle dans plus de la moitié des tumeurs humaines, d'où l'importance de mieux définir l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques en l'absence de p53. Comme modèles expérimentaux, nous avons utilisé deux lignées cellulaires tumorales p53-déficientes, les U937 (monocyte-like) et les Namalwa (lymphome B). L'induction d'un dommage à l'ADN dans ces cellules par un court traitement avec l'inhibiteur de topoisomérase I camptothécine (CPT) déclenche rapidement l'activation d'un programme apoptotique p53-indépendant dans les cellules U937 et Namalwa.

Nous avons mis en évidence l'activation d'une voie apoptotique lysosomiale peu de temps après l'induction du dommage à l'ADN, définie par une perméabilisation du compartiment lysosomal, aussi appelé fuite lysosomiale (ss Δ LL) et par l'activation de la cathepsine-B, une protéase lysosomiale, qui surviennent simultanément avec la perméabilisation des mitochondries (chute du $\Delta\Psi_m$) et avec l'activation des caspases. Nos résultats indiquent que l'activité de la cathepsine-B contribue à la propagation de l'apoptose induite par la CPT. Dans les principaux modèles impliquant l'activation d'une

voie lysosomiale, la rupture des lysosomes précède les perturbations mitochondriales. Toutefois, nos résultats indiquent que la perméabilisation des lysosomes semble dépendre du dommage mitochondrial dans notre modèle d'apoptose. En effet, bloquer l'ouverture du mPTP mitochondrial avec deux inhibiteurs, la cyclosporine A (CsA) et l'acide bongkreki (BkA), diminue considérablement la perte du $\Delta\Psi_m$ et réduit de manière similaire le ssALL induits par la CPT. De plus, la surexpression de l'anti-apoptotique Bcl-xL, une protéine reconnue pour préserver l'intégrité mitochondriale, protège également les lysosomes de la rupture, supportant l'existence d'une hiérarchie mitochondrie → lysosome dans notre modèle d'apoptose. Nous avons également démontré que l'activité des caspases est essentielle pour que la CPT provoque une perméabilisation des mitochondries et des lysosomes et que la caspase-2 semble jouer un rôle initiateur important dans l'induction de l'apoptose. En effet, la perte d'expression de la caspase-2 cause une réduction considérable de la chute du $\Delta\Psi_m$ et du ssALL induits par la CPT, indiquant que la caspase-2 agirait en amont du dommage mitochondrial et lysosomal dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante. Finalement, nos travaux suggèrent que l'accumulation intracellulaire de sphingosine, un lipide qui cible spécifiquement le compartiment lysosomal, pourrait contribuer au mécanisme de rupture de la membrane lysosomiale suite à l'induction du dommage à l'ADN. Globalement, cette étude indique que les lysosomes semblent contribuer à la voie apoptotique mitochondriale et à l'apoptose p53-indépendante induite par la CPT. Le lysosome apparaît donc comme un nouveau joueur dans l'apoptose médiée par une lésion génotoxique.

L'activation de la voie mitochondriale joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose générée par un dommage génotoxique. La voie mitochondriale est modulée de manière précise et complexe principalement par l'action des protéines de la famille Bcl-2. Toutefois, le mode d'action des protéines Bcl-2-like et les mécanismes menant à l'activation de la voie mitochondriale pendant l'apoptose p53-indépendante sont actuellement peu connus. Nos travaux démontrent une induction rapide du BH3-unique Bim et une augmentation de l'expression de Bim et Bik après l'induction du dommage à l'ADN dans les cellules Namalwa p53-déficientes. De plus, les BH3-unique Bim et Bik, ainsi que les protéines multi-domaines Bax et Bak transloquent rapidement vers la mitochondrie après le traitement de CPT, suivi de l'assemblage des protéines Bcl-2-like en complexes protéiques distincts. Les expériences d'immunoprécipitation ont démontré une interaction réciproque entre Bax et Bak après le traitement de CPT. Ces travaux ont révélé

pour la première fois dans un contexte de protéines cellulaires endogènes, la formation de complexes Bax/Bak, Bax/VDAC1, Bak/VDAC1, Bim/VDAC1 et Bim/Bcl-2 dans des cellules apoptotiques humaines. De par ces travaux, nous suggérons que la translocation mitochondriale et l'oligomérisation des protéines de la famille Bcl-2 contribue de manière plausible à la déstabilisation mitochondriale et à l'exécution de l'apoptose p53-indépendante. Toutefois, des investigations supplémentaires (ex: inhibition de l'expression des protéines Bcl-2-like par RNAi) s'avèrent nécessaires pour démontrer avec certitude que ces protéines sont essentielles à l'apoptose dans notre modèle. Nos travaux suggèrent aussi que les protéines Bcl-2-like ne ciblent pas le compartiment lysosomal de manière similaire pendant l'apoptose induite par la CPT. En induisant la perméabilisation mitochondriale, il est néanmoins plausible que les protéines Bcl-2-like contribuent de manière indirecte à l'activation de la voie lysosomiale.

Nous avons également recherché des facteurs de transcription qui sont impliqués dans l'apoptose p53-indépendante des cellules Namalwa. Des résultats préliminaires indiquent que les deux homologues de p53, p73 et p63, ont une fonction pro-apoptotique dans notre modèle d'apoptose. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour préciser le mode d'action de p73 et p63, en identifiant par exemple, les gènes qui sont transactivés par p73 et p63 suite à l'induction du dommage à l'ADN. Une action directe de p73 et p63 au niveau mitochondrial, analogue à celle décrite pour p53, est également à considérer. Donc malgré le statut préliminaire de nos résultats, les facteurs p73 et p63 constituent des candidats intéressants pour médier l'apoptose en l'absence de p53.

Globalement, l'ensemble de nos travaux permet de mieux définir les mécanismes des voies mitochondriale et lysosomiale dans l'apoptose p53-indépendante induite par un dommage génotoxique. Une meilleure compréhension de tous les acteurs moléculaires et voies signalétiques impliqués dans l'induction, la régulation et l'exécution du programme apoptotique de cellules cancéreuses p53-déficientes pourra permettre le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses et/ou l'amélioration des traitements existants, afin de cibler de manière plus efficace les tumeurs humaines caractérisées par la perte de p53.

5.6 Perspectives

Nos travaux ont mis en évidence l'activation d'une voie lysosomiale pendant l'apoptose induite par la CPT (chapitre 2). Pour compléter ces études, il serait important

d'élucider les mécanismes sous-jacents à la rupture de la membrane lysosomiale pendant l'apoptose, en évaluant plus précisément l'implication de la voie des sphingosines. Il faudrait également poursuivre la caractérisation de la voie lysosomiale pendant l'apoptose induite par la CPT et élargir notre étude en utilisant d'autres types d'agents génotoxiques. Nous proposons donc les investigations suivantes:

1- À court terme, afin d'investiguer plus en profondeur le rôle des cathepsines dans l'apoptose, nous débiterons par déterminer l'implication d'autres cathepsines. Des inhibiteurs chimiques spécifiques à certaines cathepsines, tel que le pepstatin A, un inhibiteur de la cathepsine-D, permettront d'évaluer la participation d'autres cathepsines dans notre modèle, particulièrement dans les cellules Namalwa, dans lesquelles l'inhibition de la cathepsine-B n'affecte pas l'amplitude de l'apoptose. De plus, nous avons déjà dérivé des lignées de cellules Namalwa surexprimant de façon stable des inhibiteurs endogènes de l'activité des cathepsines: la protéine cystatine B (bloque principalement la cathepsine-B et produit aussi un certain effet inhibiteur sur la cathepsine-L) et la protéine Spi2A (inhibe principalement la cathepsine-B). Il reste donc à déterminer l'effet de la surexpression de ces inhibiteurs endogènes sur les différents paramètres de l'apoptose ($\downarrow\Delta\Psi_m$, ss ΔLL , activité des caspases et cathepsines, fragmentation de l'ADN).

2- Nos travaux, ainsi que d'autres données dans la littérature, suggèrent qu'une augmentation des niveaux intracellulaires de sphingosine pourrait être impliquée dans la rupture de la membrane lysosomiale. Nous avons déjà quantifié les niveaux de sphingosine de façon globale dans les cellules apoptotiques. L'accumulation de sphingosine directement dans les lysosomes sera également mesurée en marquant les cellules viables avec le précurseur radioactif de sphingomyéline [3H]choline. Dans les cellules, la sphingomyéline est convertie en céramide puis en sphingosine (voir Fig.7 - *La voie des sphingomyélines et des sphingosines*). Les cellules seront traitées avec la CPT, puis les lysosomes seront purifiés par la technique de double gradients de densité métrizamide/Percoll, décrite dans le chapitre 2. Les lipides seront ensuite extraits à partir des fractions enrichies en lysosome, suivi de la résolution des sphingosines marqués au [3H] par chromatographie sur couche mince (TLC: *thin layer chromatography*). Ainsi, nous pourrions déterminer s'il y a accumulation de sphingosine directement dans le compartiment lysosomal après le traitement de CPT. Il a été démontré qu'une réduction de

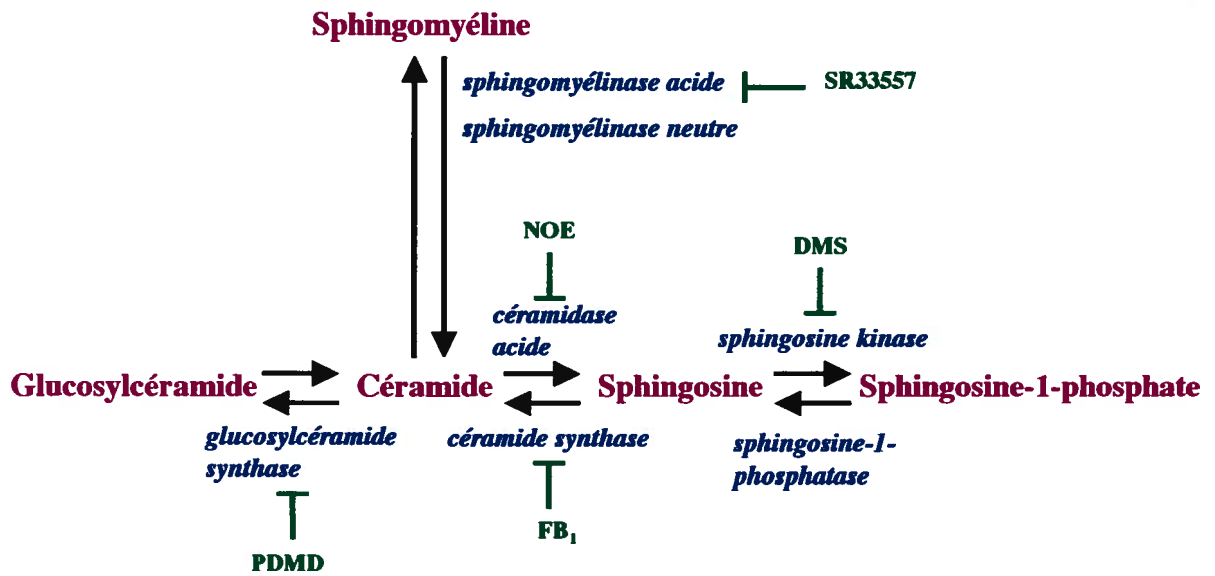


Fig.7 La voie des sphingomyélines et des sphingosines.

Certaines enzymes de la voie des sphingomyélines et des sphingosines peuvent être bloquées par des inhibiteurs chimiques, ce qui permet de modifier l'équilibre entre les différents métabolites dans les cellules.

DMS: N,N-dimethylsphingosine

FB₁: fumonisin B₁

NOE: N-oleoylethanolamine

PDMD: 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol

SR33557: 2-isopropyl-1-(4[3-N-methyl-N-(3,4-dimethoxyphenethyl)amino]propyloxy)benzenesulfonyl)indolizine

l'activité de la sphingosine kinase-1 provoquait une élévation des niveaux intracellulaires de sphingosine (voir Fig.7 - *La voie des sphingomyélines et des sphingosines*) pendant l'apoptose induite par un dommage génotoxique [481]. Selon cette étude, ce mécanisme est dépendant des protéases sensibles au Z-VAD. La caspase-2 est une protéase inhibée par le Z-VAD-FMK, il serait donc intéressant de mesurer les niveaux de sphingosine dans les cellules qui ont perdu l'expression de la caspase-2 par RNAi, afin de déterminer si la caspase-2 est impliquée dans l'élévation des concentrations intracellulaires de sphingosine après le traitement de CPT.

3- Dans nos travaux, l'inhibition de l'enzyme céramidase acide par l'inhibiteur chimique NOE (voir Fig.7 - *La voie des sphingomyélines et des sphingosines*), cause une réduction du ssALL et de la perte de $\Delta\Psi_m$ induits par la CPT, supportant l'implication des sphingosines dans notre modèle. Il serait intéressant d'évaluer les conséquences de l'inhibition d'autres enzymes de la voie des sphingosines, surtout dans les cellules Namalwa qui ne semblent pas affectées par le NOE. Les agents FB₁ (*fumonisin B₁*) et DMS (*N,N-dimethylsphingosine*) qui inhibent respectivement la céramide synthase et la sphingosine kinase (voir Fig.7 - *La voie des sphingomyélines et des sphingosines*), seront utilisés afin de modifier l'équilibre vers une augmentation des niveaux de sphingosine dans les cellules et de déterminer l'effet sur la perméabilisation des organites. En parallèle, la technique de RNAi sera utilisée pour inhiber l'expression des autres céramidases et de la sphingosine-1-phosphatase, pour lesquelles aucun inhibiteur pharmacologique n'est actuellement disponible, afin de réduire la production et l'accumulation de sphingosine dans les cellules apoptotiques. Les conséquences de la perte d'expression de ces enzymes sur l'apoptose seront évaluées (mesure de $\downarrow\Delta\Psi_m$, ssALL, activité des caspases et cathepsines, fragmentation de l'ADN).

4- Selon nos résultats, les protéines de la famille Bcl-2 ne semblent pas transloquer vers le compartiment lysosomal pendant l'apoptose. Étant donné qu'il est difficile d'obtenir des fractions d'organites de haute pureté par fractionnement sous-cellulaire et gradients de densité, l'emploi d'une technique différente pourrait s'avérer plus efficace. La relocalisation lysosomiale des protéines Bcl-2-like sera donc ré-évaluée par immunofluorescence et microscopie confocale. L'utilisation d'anticorps fluorescents combinés à l'incubation des cellules avec le *Lysotracker* ou le *Mitotracker*, des colorants

fluorescents se localisant spécifiquement dans le compartiment lysosomal et mitochondrial respectivement, permettra de déterminer la localisation sous-cellulaire des protéines Bcl-2-like, ainsi que d'autres protéines telles que les caspases et les cathepsines, pendant l'apoptose. Cette technique pourrait nous permettre d'étudier le phénomène hypothétique de translocation lysosomiale de manière plus convaincante et d'élargir notre étude à d'autres membres de la famille Bcl-2 et à d'autres types de protéines (ex: caspases, cathepsines). Par cette technique, nous pourrions aussi étudier la translocation des cathepsines du lysosome vers le cytosol en cours d'apoptose.

5- À plus long terme, des techniques de protéomique pourraient également être utilisées dans le but d'identifier des protéines qui ciblent le compartiment lysosomal en cours d'apoptose. Des extraits protéiques provenant de fractions de lysosome purifiées seront soumis à une électrophorèse sur gel en deux dimensions. Après coloration du gel, les protéines d'intérêt sont prélevées du gel et soumises à une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry coupled with times-of-flight analyser*) [746, 747]. Les fractions enrichies en lysosome peuvent aussi être directement analysées par une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse appelée LC-ESI-MS/MS (*high-pressure nanocapillary reversed-phase liquid chromatography, electrospray ionization and tandem spectrometry coupled to quadrupole ion trap analysers*) [748]. Ces deux types d'approche devraient permettre d'identifier des protéines possiblement impliquées dans la modulation de la perméabilisation lysosomiale. Les ADNc (*ADN complémentaire*) de ces protéines peuvent ensuite être isolés et clonés par RT-PCR et utilisés afin de surexprimer les protéines d'intérêt dans les cellules ou de produire des protéines recombinantes, afin d'étudier le rôle de ces protéines dans la voie lysosomiale et l'apoptose.

6- Éventuellement, différentes études *in vitro* pourraient aussi être réalisées pour étudier le phénomène de perméabilisation lysosomiale dans différents contextes. Par exemple, des lysosomes purifiés pourraient être incubés avec des protéines Bcl-2-like recombinantes et des caspases et des cathepsines actives (disponibles commercialement), afin de déterminer si certains membres des Bcl-2 et certaines protéases sont directement impliqués dans la rupture de la membrane lysosomiale. Dans le même sens, le rôle des sphingosines peut être investigué en incubant les lysosomes avec différentes doses de sphingosine synthétique.

7- Afin d'élargir notre étude, nous pourrions également investiguer l'implication d'une voie lysosomiale dans l'apoptose induite par d'autres types d'agents génotoxiques, tels que l'étoposide (inhibiteur de topoisomérase II) et la cisplatine, qui endommage aussi l'ADN, mais par un mécanisme distinct des inhibiteurs de topoisomérases. Ces études nous permettraient de déterminer, de façon générale, l'importance de la voie lysosomiale dans l'apoptose induite par un dommage génotoxique.

Il est possible que la voie lysosomiale agisse comme une boucle d'amplification de la voie mitochondriale et du signal apoptotique. L'utilisation d'agents pouvant activer la voie lysosomiale pourrait donc sensibiliser les tumeurs démontrant une certaine résistance aux traitements anti-cancéreux à l'activation de la mort apoptotique et faciliter ainsi l'éradication des cellules tumorales.

Dans l'étude présentée au chapitre 3, nous avons investigué le mode d'action de certaines protéines de la famille Bcl-2 dans l'apoptose p53-indépendante. Voici ce qui nous proposons afin de poursuivre cette étude:

1- Nos travaux suggèrent que les protéines multi-domaines Bax et Bak et que les BH3-unique Bim et Bik sont impliqués dans les perturbations mitochondriales et dans l'apoptose p53-indépendante induites par la CPT. Il est très important de déterminer de manière plus précise l'importance de l'activation de ces protéines dans notre modèle d'apoptose. Nous utiliserons la technique de RNAi pour inhiber l'expression des protéines Bax, Bak, Bim et Bik dans nos cellules et nous investiguerons ensuite les conséquences de l'inhibition de ces protéines sur la propagation de l'apoptose. Les paramètres suivants seront étudiés: $\downarrow\Delta\Psi_m$, relargage de cytochrome c, ssALL, activité des caspases et cathepsines, fragmentation de l'ADN. Cette expérience est déjà en cours dans le laboratoire. Cette approche nous permettra de répondre à la question cruciale suivante: Ces protéines sont-elles vraiment nécessaires pour qu'il y ait apoptose dans nos cellules p53-déficientes ?

2- À court terme, nous étudierons aussi l'implication et le mode d'action d'autres membres de la famille Bcl-2, tels que les BH3-unique Noxa et Puma, dont le rôle dans l'apoptose p53-indépendante est actuellement inconnu. Nous investiguerons la relocalisation sous-

cellulaire et l'oligomérisation de ces protéines en cours d'apoptose. Si une protéine semble être impliquée, son expression pourra être abolie par des siRNA pour déterminer précisément son rôle.

3- Nos travaux ont démontré une induction rapide de l'ARNm de Bim pendant l'apoptose induite par la CPT. Des études sont présentement en cours afin d'identifier le (s) facteur (s) de transcription responsable (s) de l'induction de Bim. Les niveaux d'ARNm de Bim seront quantifiés par Northern blot et par la technique de PCR en temps réel, et les niveaux d'expression de la protéine Bim seront évalués par immunobavardage « Western blot » dans les lignées de cellules qui surexpriment les dominants négatifs des facteurs p73 et p63, dans le but de déterminer si ces facteurs affectent l'expression de Bim dans notre système. D'autres facteurs tels que E2F1 [656] et FoxO3a [661] ont aussi été associés à l'induction de Bim dans certains modèles d'apoptose. Il serait donc intéressant d'inhiber ces facteurs et d'en déterminer les conséquences sur l'expression de Bim ou d'autres Bcl-2-like, et sur la propagation de l'apoptose p53-indépendante en général.

4- À plus long terme, il serait intéressant de caractériser le rôle précis de Bik dans notre modèle d'apoptose. Nous avons démontré que Bik subit une hausse d'expression, une relocalisation mitochondriale et une oligomérisation pendant les premières heures de l'apoptose induite par la CPT. Nous pourrions tenter d'immunoprécipiter Bik en utilisant d'autres anticorps, afin d'identifier des protéines qui interagissent avec Bik en cours d'apoptose. L'expression de Bik pourra aussi être abolie par siRNA.

Finalement, les travaux préliminaires qui proposent un rôle pro-apoptotique pour les facteurs de transcription p73 et p63 (chapitre 4) seront poursuivis par les investigations suivantes:

1- À court terme, nous déterminerons le statut d'activation de p73 et p63 pendant l'apoptose. L'activité de liaison à l'ADN de p73 et p63 sera évaluée par des essais d'EMSA, ce qui permettra de déterminer si ces facteurs sont activés par la CPT. Ces expériences nous permettront aussi de déterminer si la surexpression des dominants négatifs inhibe bel et bien l'activité de p73 et p63. Dans notre étude, seul le processus de fragmentation de l'ADN a été évalué dans les cellules surexprimant les dominants négatifs.

D'autres paramètres apoptotiques, tels que $\downarrow\Delta\Psi_m$, relargage de cytochrome c, ssALL et activité des caspases et cathepsines seront donc investigués.

2- Nous tenterons d'identifier les gènes-cibles de p73 et p63 dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante. Le facteur p73 a déjà été associé à l'induction de certains membres de la famille Bcl-2, tel que Bim, mentionné précédemment, et Puma, ainsi que le récepteur de mort cellulaire DR5. Ces gènes représentent donc des cibles potentielles pour p73 et possiblement p63. Les gènes ciblés par p73 et p63 pourront être identifiés par Northern blot et PCR en temps réel dans les lignées qui surexpriment les dominants négatifs de p73 et p63. L'analyse des promoteurs des gènes pourrait également permettre d'identifier des sites potentiels de liaison pour p73 et p63, ce qui pourrait donner une bonne indication concernant les gènes ciblés par p73 et p63. Des micropuces d'ADN pourraient aussi être utilisées dans nos études pour identifier les gènes-cibles de p73 et p63.

3- À plus long terme, nous élargirons notre étude à d'autres facteurs de transcription, tels que E2F1, FoxO3a et c-Myc. Ces facteurs ont été associés à l'apoptose de diverses façons (*voir section: 1.4.2.5 - Autres facteurs de transcription*). Les cellules Namalwa sont caractérisées par une amplification de c-Myc et le statut des autres facteurs est actuellement inconnu. Des études ont reporté la modulation de p73 par c-Myc [606] et une induction de p73 par E2F1 [654]. Il serait donc intéressant d'investiguer le rôle de ces facteurs dans l'activation potentielle de p73 et dans notre modèle d'apoptose p53-indépendante.

Globalement, toutes ces études permettront de mieux définir l'apoptose p53-indépendante induite dans les cellules tumorales humaines par les agents chimiothérapeutiques. Il est à souhaiter qu'une meilleure compréhension des voies d'activation de l'apoptose, plus particulièrement dans un contexte p53-déficient, puisse améliorer l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses.

CHAPITRE 6. BIBLIOGRAPHIE

1. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-57, 1972.
2. Reed JC, Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 34(4 Suppl 5): 9-19, 1997.
3. Rudin CM and Thompson CB, Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 48: 267-81, 1997.
4. Nagata S, Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3): 355-65, 1997.
5. Wyllie AH, Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53(3): 451-65, 1997.
6. Schwartzman RA and Cidlowski JA, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14(2): 133-51, 1993.
7. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X, Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147-57, 1996.
8. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP and Wang X, Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303): 1129-32, 1997.
9. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR and Newmeyer DD, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303): 1132-6, 1997.
10. Hengartner MO, The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805): 770-6, 2000.
11. Ravagnan L, Roumier T and Kroemer G, Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192(2): 131-7, 2002.
12. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA and Nicotera P, Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15(4): 961-73, 1995.
13. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P and Lipton SA, Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16): 7162-6, 1995.
14. Orrenius S, Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 149(1-3): 19-23, 2004.
15. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG and Gabai VL, Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283(1): 1-16, 2003.
16. Leist M, Gantner F, Jilg S and Wendel A, Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol* 154(3): 1307-16, 1995.
17. Reed JC, Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124(1-2): 1-6, 1994.
18. Korsmeyer SJ, Regulators of cell death. *Trends Genet* 11(3): 101-5, 1995.
19. Baserga R, Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79(6): 927-30, 1994.
20. Kaufmann SH, 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(21): 5870-8, 1989.
21. Bertrand R, Sarang M, Jenkin J, Kerrigan D and 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(23 Pt 1): 6280-85, 1991.

22. Barry MA, Behnke CA and Eastman A, Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* **40**(10): 2353-62, 1990.
23. Del Bino G, Bruno S, Yi PN and Darzynkiewicz Z, Apoptotic cell death triggered by camptothecin or teniposide. The cell cycle specificity and effects of ionizing radiation. *Cell Prolif* **25**(6): 537-48, 1992.
24. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF and Sikorska M, Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* **51**(4): 1078-85, 1991.
25. Reed JC, Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**(2): 451-73, 1995.
26. Hickman JA, Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer* **32A**(6): 921-6, 1996.
27. Kaufmann SH and Earnshaw WC, Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* **256**(1): 42-9, 2000.
28. Reed JC, Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* **17**(9): 2941-53, 1999.
29. Hannun YA, Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* **89**(6): 1845-53, 1997.
30. Horvitz HR, Shaham S and Hengartner MO, The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 377-85, 1994.
31. Hengartner MO and Horvitz HR, Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **4**(4): 581-6, 1994.
32. Hengartner MO, Ellis RE and Horvitz HR, *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**(6369): 494-9, 1992.
33. Yuan J and Horvitz HR, The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* **116**(2): 309-20, 1992.
34. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR, The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**(4): 641-52, 1993.
35. Conradt B and Horvitz HR, The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**(4): 519-29, 1998.
36. Hengartner MO and Horvitz HR, *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**(4): 665-76, 1994.
37. Lutz RJ, Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* **28**(2): 51-6, 2000.
38. Bouillet P and Strasser A, BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1567-74, 2002.
39. Alnemri ES, Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* **64**(1): 33-42, 1997.
40. Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES, 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**(49): 30761-4, 1994.

41. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA and et al., Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535): 37-43, 1995.
42. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X, Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3): 405-13, 1997.
43. Cecconi F, Apaf1 is no longer single. *Cell Death Differ* 8(8): 773-5, 2001.
44. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J and Nunez G, Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274(21): 14560-7, 1999.
45. Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K and Yonehara S, The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398(6730): 777-85, 1999.
46. Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA and DiStefano PS, Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274(19): 12955-8, 1999.
47. Wyllie AH, Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 73(3): 189-97, 1997.
48. Herr I and Debatin KM, Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98(9): 2603-14, 2001.
49. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL and Mignotte B, The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9(13): 1277-87, 1995.
50. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456-62, 1995.
51. Debatin KM, Poncet D and Kroemer G, Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 21(57): 8786-803, 2002.
52. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718): 441-6, 1999.
53. Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1): 33-42, 2000.
54. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102(1): 43-53, 2000.
55. Li LY, Luo X and Wang X, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842): 95-9, 2001.
56. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X and Xue D, Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412(6842): 90-4, 2001.
57. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K and Takahashi R, A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8(3): 613-21, 2001.
58. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G and Reed JC, Release of caspase-9

- from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(10): 5752-7, 1999.
59. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA and Rosen A, The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* **140**(6): 1485-95, 1998.
 60. Qin ZH, Wang Y, Kikly KK, Sapp E, Kegel KB, Aronin N and DiFiglia M, Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* **276**(11): 8079-86, 2001.
 61. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM and Kroemer G, Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**(2): 381-94, 1999.
 62. Adams JM and Cory S, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**(1): 61-6, 2001.
 63. Tsujimoto Y, Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* **195**(2): 158-67, 2003.
 64. Sharpe JC, Arnoult D and Youle RJ, Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 107-13, 2004.
 65. Adams JM and Cory S, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**(5381): 1322-6, 1998.
 66. Savill J and Fadok V, Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**(6805): 784-8, 2000.
 67. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC and Croce CM, Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**(4678): 1097-9, 1984.
 68. Cleary ML, Smith SD and Sklar J, Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* **47**(1): 19-28, 1986.
 69. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E and Croce CM, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**(4706): 1440-3, 1985.
 70. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD and Korsmeyer SJ, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299): 334-6, 1990.
 71. Korsmeyer SJ, Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**(4): 879-86, 1992.
 72. McDonnell TJ, Marin MC, Hsu B, Brisbay SM, McConnell K, Tu SM, Campbell ML and Rodriguez-Villanueva J, The bcl-2 oncogene: apoptosis and neoplasia. *Radiat Res* **136**(3): 307-12, 1993.
 73. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**(4): 609-19, 1993.
 74. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ, Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(17): 7834-8, 1995.
 75. Yang E and Korsmeyer SJ, Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* **88**(2): 386-401, 1996.
 76. Reed JC, Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**(25): 3225-36, 1998.

77. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G and Thompson CB, Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74(4): 597-608, 1993.
78. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M and 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(22): 3915-31, 2004.
79. Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM and Cory S, Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13(4): 665-75, 1996.
80. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P and Craig RW, MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3516-20, 1993.
81. Lin EY, Orlofsky A, Berger MS and Prystowsky MB, Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 151(4): 1979-88, 1993.
82. Choi SS, Park IC, Yun JW, Sung YC, Hong SI and Shin HS, A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11(9): 1693-8, 1995.
83. Das R, Reddy EP, Chatterjee D and Andrews DW, Identification of a novel Bcl-2 related gene, BRAG-1, in human glioma. *Oncogene* 12(5): 947-51, 1996.
84. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S and Nunez G, Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273(49): 32479-86, 1998.
85. Song Q, Kuang Y, Dixit VM and Vincenz C, Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J* 18(1): 167-78, 1999.
86. Ke N, Godzik A and Reed JC, Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 276(16): 12481-4, 2001.
87. Zhang H, Holzgreve W and De Geyter C, Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 10(21): 2329-39, 2001.
88. Coultas L and Strasser A, The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 13(2): 115-23, 2003.
89. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J and Bertrand R, Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 868-79, 2000.
90. Shi B, Triebe D, Kajiji S, Iwata KK, Bruskin A and Mahajna J, Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 254(3): 779-85, 1999.
91. Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R and Bitler CM, A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem* 273(19): 11930-6, 1998.
92. Apte SS, Mattei MG and Olsen BR, Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 26(3): 592-4, 1995.
93. Cartron PF, Oliver L, Martin S, Moreau C, LeCabellec MT, Jezequel P, Meflah K and Vallette FM, The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* 11(6): 675-87, 2002.

94. Jin KL, Graham SH, Mao XO, He X, Nagayama T, Simon RP and Greenberg DA, Bax kappa, a novel Bax splice variant from ischemic rat brain lacking an ART domain, promotes neuronal cell death. *J Neurochem* 77(6): 1508-19, 2001.
95. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI and Guild BC, Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374(6524): 733-6, 1995.
96. Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC and Brown R, Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374(6524): 731-3, 1995.
97. Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD and Barr PJ, Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374(6524): 736-9, 1995.
98. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M and Hsueh AJ, Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(23): 12401-6, 1997.
99. Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S and Nunez G, Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J Biol Chem* 273(15): 8705-10, 1998.
100. Kataoka T, Holler N, Micheau O, Martinon F, Tinel A, Hofmann K and Tschopp J, Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J Biol Chem* 276(22): 19548-54, 2001.
101. Guo B, Godzik A and Reed JC, Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 276(4): 2780-5, 2001.
102. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ, Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80(2): 285-91, 1995.
103. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL and Korsmeyer SJ, Bid: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10(22): 2859-69, 1996.
104. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ and et al., Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11(9): 1921-8, 1995.
105. Han J, Sabbatini P and White E, Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* 16(10): 5857-64, 1996.
106. Hegde R, Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* 273(14): 7783-6, 1998.
107. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S and Huang DC, Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17(2): 384-95, 1998.
108. Hsu SY, Lin P and Hsueh AJ, Bod (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol* 12(9): 1432-40, 1998.
109. U M, Miyashita T, Shikama Y, Tadokoro K and Yamada M, Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett* 509(1): 135-41, 2001.

110. Liu JW, Chandra D, Tang SH, Chopra D and Tang DG, Identification and characterization of Bimgamma, a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim. *Cancer Res* 62(10): 2976-81, 2002.
111. Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J and Lemoine NR, Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 22(11): 3577-89, 2002.
112. Inohara N, Ding L, Chen S and Nunez G, Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* 16(7): 1686-94, 1997.
113. Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M and Tohyama M, The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the Bcl-2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem* 274(12): 7975-81, 1999.
114. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C and Chinnadurai G, Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 79(2): 341-51, 1994.
115. Zhang H, Heim J and Meyhack B, Novel BNIP1 variants and their interaction with BCL2 family members. *FEBS Lett* 448(1): 23-7, 1999.
116. Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K and Nakamura Y, Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer* 21(3): 230-5, 1998.
117. Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D and Greenberg A, Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 274(1): 7-10, 1999.
118. Yasuda M, Han JW, Dionne CA, Boyd JM and Chinnadurai G, BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res* 59(3): 533-7, 1999.
119. Nakano K and Vousden KH, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7(3): 683-94, 2001.
120. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L and Chittenden T, Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11318-23, 2001.
121. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T and Tanaka N, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288(5468): 1053-8, 2000.
122. Bae J, Leo CP, Hsu SY and Hsueh AJ, MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275(33): 25255-61, 2000.
123. Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P and Whyte MK, Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275(29): 22136-46, 2000.
124. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC and Strasser A, Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293(5536): 1829-32, 2001.

125. Tan KO, Tan KM, Chan SL, Yee KS, Bevort M, Ang KC and Yu VC, MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *J Biol Chem* 276(4): 2802-7, 2001.
126. Fleischer A, Ayllon V, Dumoutier L, Renauld JC and Rebollo A, Proapoptotic activity of ITM2B(s), a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. *Oncogene* 21(20): 3181-9, 2002.
127. Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK and Grimm S, Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *Faseb J* 17(6): 696-8, 2003.
128. Reed JC, Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387(6635): 773-6, 1997.
129. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA and Kroemer G, Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16(17): 2265-82, 1998.
130. Schendel SL, Montal M and Reed JC, Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 5(5): 372-80, 1998.
131. Schinzel A, Kaufmann T and Borner C, Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 95-105, 2004.
132. Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM and Longo DL, Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci US A* 96(7): 3775-80, 1999.
133. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G and Lutz RJ, A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14(22): 5589-96, 1995.
134. Kelekar A and Thompson CB, Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8(8): 324-30, 1998.
135. Yin XM, Oltvai ZN and Korsmeyer SJ, BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369(6478): 321-3, 1994.
136. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL and Fesik SW, X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381(6580): 335-41, 1996.
137. Diaz JL, Oltersdorf T, Horne W, McConnell M, Wilson G, Weeks S, Garcia T and Fritz LC, A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 272(17): 11350-5, 1997.
138. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB and Fesik SW, Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275(5302): 983-6, 1997.
139. Chittenden T, BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis. *Cancer Cell* 2(3): 165-6, 2002.
140. Polster BM, Kinnally KW and Fiskum G, BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* 276(41): 37887-94, 2001.

141. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB and Korsmeyer SJ, tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14(16): 2060-71, 2000.
142. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR and Thompson CB, BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15(12): 1481-6, 2001.
143. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T and Korsmeyer SJ, BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8(3): 705-11, 2001.
144. Eskes R, Desagher S, Antonsson B and Martinou JC, Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20(3): 929-35, 2000.
145. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S and Korsmeyer SJ, Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2(3): 183-92, 2002.
146. Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ and Shore GC, Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268(34): 25265-8, 1993.
147. Lithgow T, van Driel R, Bertram JF and Strasser A, The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 5(4): 411-7, 1994.
148. Nakai M, Takeda A, Cleary ML and Endo T, The bcl-2 protein is inserted into the outer membrane but not into the inner membrane of rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 233-9, 1993.
149. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W and Reed JC, Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53(19): 4701-14, 1993.
150. Hsu YT, Wolter KG and Youle RJ, Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3668-72, 1997.
151. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG and Youle RJ, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5): 1281-92, 1997.
152. Gross A, Jockel J, Wei MC and Korsmeyer SJ, Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17(14): 3878-85, 1998.
153. Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ and Swisher SG, Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 277(11): 9219-25, 2002.
154. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T and Korsmeyer SJ, Bax and Bak regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300(5616): 135-9, 2003.
155. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J and Thompson CB, Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 162(1): 59-69, 2003.
156. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C and Hickman JA, Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144(5): 903-14, 1999.

157. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR and Thompson CB, The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6(6): 1389-99, 2000.
158. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517): 727-30, 2001.
159. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ, Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4): 619-28, 1996.
160. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM and Strasser A, The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3(3): 287-96, 1999.
161. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH, Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7(12): 1166-73, 2000.
162. Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC and Korsmeyer SJ, Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290(5497): 1761-5, 2000.
163. Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B and Martinou JC, Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8(3): 601-11, 2001.
164. Verma S, Zhao LJ and Chinnadurai G, Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem* 276(7): 4671-6, 2001.
165. Rinaudo MS, Su K, Falk LA, Halder S and Mufson RA, Human interleukin-3 receptor modulates bcl-2 mRNA and protein levels through protein kinase C in TF-1 cells. *Blood* 86(1): 80-8, 1995.
166. Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, Hirata S and Watanabe H, Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 58(23): 5565-9, 1998.
167. Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schoni MH, Blaser K and Simon HU, Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23): 13330-5, 1999.
168. Teixeira C, Reed JC and Pratt MA, Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55(17): 3902-7, 1995.
169. Paquet C and Bertrand R, Unique and multi-domain Bcl-2 family members: Post-translational modifications and apoptosis regulation. In: *Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry*, Vol. 3 (Ed. Pandalai SG), pp. 291-325. Research Signpost, India, 2003.
170. Franke TF and Cantley LC, Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature* 390(6656): 116-7, 1997.

171. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**(2): 231-41, 1997.
172. Blagosklonny MV, Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia* **15**(6): 869-74, 2001.
173. Ruvolo PP, Deng X and May WS, Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**(4): 515-22, 2001.
174. Ito T, Deng X, Carr B and May WS, Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* **272**(18): 11671-3, 1997.
175. May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA and Davidson NE, Interleukin-3 and bryostatins mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **269**(43): 26865-70, 1994.
176. Haldar S, Jena N and Croce CM, Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(10): 4507-11, 1995.
177. Haldar S, Chintapalli J and Croce CM, Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* **56**(6): 1253-5, 1996.
178. Haldar S, Basu A and Croce CM, Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res* **58**(8): 1609-15, 1998.
179. Yamamoto K, Ichijo H and Korsmeyer SJ, BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8469-78, 1999.
180. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J and Neckers LM, Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* **56**(8): 1851-4, 1996.
181. Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV and Fojo T, Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* **58**(15): 3331-8, 1998.
182. Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**(4): 491-501, 1998.
183. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X, Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**(4): 481-90, 1998.
184. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Korsmeyer SJ, Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* **274**(2): 1156-63, 1999.
185. Wood DE and Newcomb EW, Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* **256**(2): 375-82, 2000.
186. Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES and Calabretta B, Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* **21**(9): 3025-36, 2001.
187. Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S and Tsuruo T, Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* **17**(10): 1295-304, 1998.
188. Fadeel B, Hassan Z, Hellstrom-Lindberg E, Henter JI, Orrenius S and Zhivotovskiy B, Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Leukemia* **13**(5): 719-28, 1999.
189. Suzuki M, Youle RJ and Tjandra N, Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4): 645-54, 2000.

190. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B and Martinou JC, Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144(5): 891-901, 1999.
191. Ayllon V, Fleischer A, Cayla X, Garcia A and Rebollo A, Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol* 168(7): 3387-93, 2002.
192. Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH and Streuli CH, Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 149(2): 431-46, 2000.
193. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N and Gotoh Y, JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J* 23(8): 1889-99, 2004.
194. Ghatan S, Lerner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ and Morrison RS, p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol* 150(2): 335-47, 2000.
195. Tsuruta F, Masuyama N and Gotoh Y, The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 277(16): 14040-7, 2002.
196. Deng Y and Wu X, Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12050-5, 2000.
197. Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S and Wang HG, Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem* 276(23): 20559-65, 2001.
198. Samuel T, Weber HO, Rauch P, Verdoodt B, Eppel JT, McShea A, Hermeking H and Funk JO, The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J Biol Chem* 276(48): 45201-6, 2001.
199. Li B and Dou QP, Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 3850-5, 2000.
200. Breitschopf K, Zeiher AM and Dimmeler S, Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem* 275(28): 21648-52, 2000.
201. Marshansky V, Wang X, Bertrand R, Luo H, Duguid W, Chinnadurai G, Kanaan N, Vu MD and Wu J, Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J Immunol* 166(5): 3130-42, 2001.
202. Thomas M and Banks L, Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17(23): 2943-54, 1998.
203. Chadebech P, Bricchese L, Baldin V, Vidal S and Valette A, Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage. *Biochem Biophys Res Commun* 262(3): 823-7, 1999.
204. Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM and Dimmeler S, Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol* 20(5): 1886-96, 2000.

205. Brichese L, Barboule N, Heliez C and Valette A, Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid. *Exp Cell Res* 278(1): 101-11, 2002.
206. Sun XM, Butterworth M, MacFarlane M, Dubiel W, Ciechanover A and Cohen GM, Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* 14(1): 81-93, 2004.
207. Cryns V and Yuan J, Proteases to die for. *Genes Dev* 12(11): 1551-70, 1998.
208. Salvesen GS and Dixit VM, Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10964-7, 1999.
209. Nicholson DW, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6(11): 1028-42, 1999.
210. Schmitt E, Sane AT and Bertrand R, Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug Resist Updat* 2(1): 21-29, 1999.
211. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA and et al., Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370(6487): 270-5, 1994.
212. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD and et al., Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78(2): 343-52, 1994.
213. Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA and Becker JW, The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3(7): 619-25, 1996.
214. Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ and Grutter MG, Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem* 272(10): 6539-47, 1997.
215. Kumar S and Colussi PA, Prodomains - adaptors - oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24(1): 1-4, 1999.
216. Stennicke HR and Salvesen GS, Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 6(11): 1054-9, 1999.
217. Kumar S, Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 6(11): 1060-6, 1999.
218. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M and Dixit VM, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4): 505-12, 1995.
219. Boldin MP, Varfolomeev EE, Panczer Z, Mett IL, Camonis JH and 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(14): 7795-8, 1995.
220. Hofmann K, Bucher P and Tschopp J, The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22(5): 155-6, 1997.
221. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G and Alnemri ES, In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7464-9, 1996.
222. Fesik SW, Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103(2): 273-82, 2000.

223. Slee EA, Adrain C and Martin SJ, Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6(11): 1067-74, 1999.
224. Fischer U, Janicke RU and Schulze-Osthoff K, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10(1): 76-100, 2003.
225. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH and Peter ME, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14(22): 5579-88, 1995.
226. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-90, 1999.
227. Salvesen GS, Caspase 8: igniting the death machine. *Structure Fold Des* 7(10): R225-9, 1999.
228. Zou H, Li Y, Liu X and Wang X, An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274(17): 11549-56, 1999.
229. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-89, 1997.
230. Cain K, Brown DG, Langlais C and Cohen GM, Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274(32): 22686-92, 1999.
231. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM and Strasser A, Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419(6907): 634-7, 2002.
232. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H and Yuan J, Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78(5): 739-50, 1994.
233. Bonfoco E, Li E, Kolbinger F and Cooper NR, Characterization of a novel proapoptotic caspase-2- and caspase-9-binding protein. *J Biol Chem* 276(31): 29242-50, 2001.
234. Tinel A and Tschopp J, The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304(5672): 843-6, 2004.
235. Duan H and Dixit VM, RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385(6611): 86-9, 1997.
236. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 57(4): 615-9, 1997.
237. Aravind L, Dixit VM and Koonin EV, The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24(2): 47-53, 1999.
238. Lin Y, Ma W and Benchimol S, Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 26(1): 122-7, 2000.
239. Telliez JB, Bean KM and Lin LL, LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein. *Biochim Biophys Acta* 1478(2): 280-8, 2000.

240. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277(16): 13430-7, 2002.
241. Lassus P, Opitz-Araya X and Lazebnik Y, Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297(5585): 1352-4, 2002.
242. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B and Orrenius S, Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277(33): 29803-9, 2002.
243. Robertson JD, Gogvadze V, Kropotov A, Vakifahmetoglu H, Zhivotovsky B and Orrenius S, Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* 5(6): 643-648, 2004.
244. Paroni G, Henderson C, Schneider C and Brancolini C, Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem* 277(17): 15147-61, 2002.
245. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL and Yuan J, Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 12(9): 1304-14, 1998.
246. O'Reilly LA, Ekert P, Harvey N, Marsden V, Cullen L, Vaux DL, Hacker G, Magnusson C, Pakusch M, Cecconi F, Kuida K, Strasser A, Huang DC and 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(8): 832-41, 2002.
247. Marsden VS, Ekert PG, Van Delft M, Vaux DL, Adams JM and Strasser A, Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* 165(6): 775-80, 2004.
248. Greenberg AH, Granzyme B-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406: 219-28, 1996.
249. Berke G, The CTL's kiss of death. *Cell* 81(1): 9-12, 1995.
250. Darmon AJ, Nicholson DW and Bleackley RC, Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377(6548): 446-8, 1995.
251. Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW and Bleackley RC, Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 271(36): 21709-12, 1996.
252. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X and Ley TJ, DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12(6): 621-32, 2000.
253. Nakagawa T and Yuan J, Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150(4): 887-94, 2000.
254. Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS and Green DR, Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* 94(5): 1683-92, 1999.
255. Wood DE and Newcomb EW, Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274(12): 8309-15, 1999.
256. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T and Snyder SH, Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5(12): 1051-61, 2003.

257. Szabadkai G and Rizzuto R, Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* **567**(1): 111-5, 2004.
258. Brunk UT, Neuzil J and Eaton JW, Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep* **6**(2): 91-7, 2001.
259. Turk B, Stoka V, Rozman-Pungercar J, Cirman T, Droga-Mazovec G, Oresic K and Turk V, Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem* **383**(7-8): 1035-44, 2002.
260. Guicciardi ME, Leist M and Gores GJ, Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**(16): 2881-90, 2004.
261. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA and Hannun YA, Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**(5102): 1769-71, 1993.
262. Jarvis WD, Grant S and Kolesnick RN, Ceramide and the induction of apoptosis. *Clin Cancer Res* **2**(1): 1-6, 1996.
263. Hannun YA and Obeid LM, Mechanisms of ceramide-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* **407**: 145-9, 1997.
264. Hannun YA and Obeid LM, Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* **20**(2): 73-7, 1995.
265. Hannun YA, Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**(5294): 1855-9, 1996.
266. Birbes H, Bawab SE, Obeid LM and Hannun YA, Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* **42**: 113-29, 2002.
267. Ohta H, Sweeney EA, Masamune A, Yatomi Y, Hakomori S and Igarashi Y, Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. *Cancer Res* **55**(3): 691-7, 1995.
268. Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME and Spiegel S, Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* **273**(5): 2910-6, 1998.
269. Isogai C, Murate T, Tamiya-Koizumi K, Yoshida S, Ito T, Nagai H, Kinoshita T, Kagami Y, Hotta T, Hamaguchi M and Saito H, Analysis of bax protein in sphingosine-induced apoptosis in the human leukemic cell line TF1 and its bcl-2 transfectants. *Exp Hematol* **26**(12): 1118-25, 1998.
270. Nava VE, Cuvillier O, Edsall LC, Kimura K, Milstien S, Gelmann EP and Spiegel S, Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res* **60**(16): 4468-74, 2000.
271. Cuvillier O, Nava VE, Murthy SK, Edsall LC, Levade T, Milstien S and Spiegel S, Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ* **8**(2): 162-71, 2001.
272. Kagedal K, Zhao M, Svensson I and Brunk UT, Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* **359**(Pt 2): 335-43, 2001.
273. Lepine S, Lakatos B, Maziere P, Courageot MP, Sulpice JC and Giraud F, Involvement of sphingosine in dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *Ann NY Acad Sci* **973**: 190-3, 2002.
274. Chang HC, Hsu C, Hsu HK and Yang RC, Functional role of caspases in sphingosine-induced apoptosis in human hepatoma cells. *IUBMB Life* **55**(7): 403-7, 2003.

275. Deveraux QL and Reed JC, IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13(3): 239-52, 1999.
276. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS and Reed JC, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17(8): 2215-23, 1998.
277. Crook NE, Clem RJ and Miller LK, An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67(4): 2168-74, 1993.
278. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM and Ashwell JD, Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288(5467): 874-7, 2000.
279. Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD and Hunter T, 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(35): 26661-4, 2000.
280. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS and Reed JC, A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273(14): 7787-90, 1998.
281. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS and Reed JC, Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18(19): 5242-51, 1999.
282. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y and Datta P, Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104(5): 769-80, 2001.
283. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG and Wu H, Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104(5): 781-90, 2001.
284. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC and Salvesen GS, Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104(5): 791-800, 2001.
285. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS and Reed JC, The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16(23): 6914-25, 1997.
286. Silke J and Vaux DL, Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci* 114(Pt 10): 1821-7, 2001.
287. Wright EK, Goodart SA, Gowney JD, Hadinoto V, Endrizzi MG, Long EM, Sadigh K, Abney AL, Bernstein-Hanley I and Dietrich WF, Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol* 13(1): 27-36, 2003.
288. Diez E, Lee SH, Gauthier S, Yaraghi Z, Tremblay M, Vidal S and Gros P, Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet* 33(1): 55-60, 2003.
289. Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakakis G and Jentsch S, A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 141(6): 1415-22, 1998.
290. Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T and Tsuruo T, A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264(3): 847-54, 1999.
291. Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao GJ and Reed JC, Elevated

- expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9(13): 4914-25, 2003.
292. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M and Reed JC, Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 6(5): 1796-803, 2000.
 293. Vaux DL and Silke J, Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 499-504, 2003.
 294. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277(1): 432-8, 2002.
 295. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL, HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277(1): 445-54, 2002.
 296. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C and Downward J, The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277(1): 439-44, 2002.
 297. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W and Vandenabeele P, The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9(1): 20-6, 2002.
 298. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X and Shi Y, Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408(6815): 1008-12, 2000.
 299. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X and Shi Y, Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406(6798): 855-62, 2000.
 300. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y and Alnemri ES, A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410(6824): 112-6, 2001.
 301. Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM and Vaux DL, DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* 152(3): 483-90, 2001.
 302. Shi Y, A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ* 9(2): 93-5, 2002.
 303. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME and Tschopp J, Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386(6624): 517-21, 1997.
 304. Hu S, Vincenz C, Buller M and Dixit VM, A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272(15): 9621-4, 1997.
 305. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE and Tschopp J, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638): 190-5, 1997.

306. Tschopp J, Irmeler M and Thome M, Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10(5): 552-8, 1998.
307. Irisarri M, Plumas J, Bonnefoix T, Jacob MC, Roucard C, Pasquier MA, Sotto JJ and Lajmanovich A, Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line. *Leukemia* 14(12): 2149-58, 2000.
308. Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I and Krammer PH, TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165(11): 6293-300, 2000.
309. Yoshikawa H, Nakajima Y and Tasaka K, Enhanced expression of Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein induces resistance to Fas-mediated apoptosis in activated mast cells. *J Immunol* 165(11): 6262-9, 2000.
310. Hennino A, Berard M, Krammer PH and Defrance T, FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193(4): 447-58, 2001.
311. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS and Pickup DJ, Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69(4): 597-604, 1992.
312. McFadden G, Graham K, Ellison K, Barry M, Macen J, Schreiber M, Mossman K, Nash P, Lalani A and Everett H, Interruption of cytokine networks by poxviruses: lessons from myxoma virus. *J Leukoc Biol* 57(5): 731-8, 1995.
313. Ray CA and Pickup DJ, The mode of death of pig kidney cells infected with cowpox virus is governed by the expression of the crmA gene. *Virology* 217(1): 384-91, 1996.
314. Komiyama T, Quan LT and Salvesen GS, Inhibition of cysteine and serine proteinases by the cowpox virus serpin CRMA. *Adv Exp Med Biol* 389: 173-6, 1996.
315. Tewari M and Dixit VM, Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270(7): 3255-60, 1995.
316. Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM and Salvesen GS, Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272(12): 7797-800, 1997.
317. Ekert PG, Silke J and Vaux DL, Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6(11): 1081-6, 1999.
318. Stennicke HR, Ryan CA and Salvesen GS, Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 27(2): 94-101, 2002.
319. Clem RJ, Fechheimer M and Miller LK, Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254(5036): 1388-90, 1991.
320. Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P and et al., Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269(5232): 1885-8, 1995.
321. Villa P, Kaufmann SH and Earnshaw WC, Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22(10): 388-93, 1997.
322. Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ and Salvesen GS, Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37(30): 10757-65, 1998.

323. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P and Beyaert R, Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* **442**(1): 117-21, 1999.
324. Green DR and Reed JC, Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**(5381): 1309-12, 1998.
325. Shi Y, A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* **8**(5): 394-401, 2001.
326. Hunter DR, Haworth RA and Southard JH, Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* **251**(16): 5069-77, 1976.
327. Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y and Mignotte B, Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci US A* **91**(24): 11752-6, 1994.
328. Zoratti M and Szabo I, The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**(2): 139-76, 1995.
329. Kroemer G and Reed JC, Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**(5): 513-9, 2000.
330. Szabo I, De Pinto V and Zoratti M, The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* **330**(2): 206-10, 1993.
331. Szabo I and Zoratti M, The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* **330**(2): 201-5, 1993.
332. Crompton M, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341** (Pt 2): 233-49, 1999.
333. Halestrap AP, McStay GP and Clarke SJ, The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**(2-3): 153-66, 2002.
334. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ and Korsmeyer SJ, VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**(5632): 513-7, 2003.
335. Hirsch T, Marzo I and Kroemer G, Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* **17**(1): 67-76, 1997.
336. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H and Tsujimoto Y, Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci US A* **95**(25): 14681-6, 1998.
337. Jacotot E, Costantini P, Laboureaux E, Zamzami N, Susin SA and Kroemer G, Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci* **887**: 18-30, 1999.
338. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC and James D, Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* **23**(16): 2850-60, 2004.
339. Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R and Bernardi P, Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem* **268**(29): 21939-45, 1993.
340. Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I and Zoratti M, Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* **267**(5): 2934-9, 1992.

341. Ichas F and Mazat JP, From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* **1366**(1-2): 33-50, 1998.
342. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC and Herman B, The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 159-65, 1997.
343. Gottlieb RA, Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept* **10**(3-4): 147-61, 2001.
344. Scarlett JL and Murphy MP, Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **418**(3): 282-6, 1997.
345. Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D and Pessayre D, Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* **31**(3): 674-83, 2000.
346. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL and Marcineviciute A, Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**(44): 31734-9, 1999.
347. Szalai G, Krishnamurthy R and Hajnoczky G, Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo J* **18**(22): 6349-61, 1999.
348. Ly JD, Grubb DR and Lawen A, The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**(2): 115-28, 2003.
349. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC and Kroemer G, Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**(5385): 2027-31, 1998.
350. Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y, Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**(6735): 483-7, 1999.
351. Shimizu S, Konishi A, Kodama T and Tsujimoto Y, BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3100-5, 2000.
352. Shimizu S and Tsujimoto Y, Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 577-82, 2000.
353. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M and Lock RB, Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**(1): 102-11, 2000.
354. Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoka Y, Yoneda Y and Tsujimoto Y, Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene* **21**(32): 4944-56, 2002.
355. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M and Bezrukov SM, Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* **279**(14): 13575-83, 2004.

356. Shimizu S, Ide T, Yanagida T and Tsujimoto Y, Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* **275**(16): 12321-5, 2000.
357. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R and Martinou JC, Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**(5324): 370-2, 1997.
358. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M and Thompson CB, Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**(6614): 353-7, 1997.
359. Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J and Wagner G, Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* **96**(5): 615-24, 1999.
360. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ and Cowburn D, Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* **96**(5): 625-34, 1999.
361. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G and Korsmeyer SJ, Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11357-62, 1997.
362. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT and Thompson CB, Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**(5): 627-37, 1997.
363. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R and Martinou JC, Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345**(Pt 2): 271-8, 2000.
364. Saito M, Korsmeyer SJ and Schlesinger PH, Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**(8): 553-5, 2000.
365. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA and Kinnally KW, A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* **155**(5): 725-31, 2001.
366. Guo L, Pietkiewicz D, Pavlov EV, Grigoriev SM, Kasianowicz JJ, Dejean LM, Korsmeyer SJ, Antonsson B and Kinnally KW, Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(5): C1109-17, 2004.
367. Guihard G, Bellot G, Moreau C, Pradal G, Ferry N, Thomy R, Fichet P, Meflah K and Vallette FM, The mitochondrial-apoptosis induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem* **279**(45): 46542-50, 2004.
368. von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E and Newmeyer DD, Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* **150**(5): 1027-36, 2000.
369. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ and Ichas F, The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* **16**(6): 607-9, 2002.
370. Barbu A, Welsh N and Saldeen J, Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. *Mol Cell Endocrinol* **190**(1-2): 75-82, 2002.

371. Kim TS, Jeong DW, Yun BY and Kim IY, Dysfunction of rat liver mitochondria by selenite: induction of mitochondrial permeability transition through thiol-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 294(5): 1130-7, 2002.
372. Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, Russell JT and Youle RJ, Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ* 8(9): 909-20, 2001.
373. Marzo I, Perez-Galan P, Giraldo P, Rubio-Felix D, Anel A and Naval J, Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J* 359(Pt 3): 537-46, 2001.
374. Gamen S, Anel A, Perez-Galan P, Lasiera P, Johnson D, Pineiro A and Naval J, Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. *Exp Cell Res* 258(1): 223-35, 2000.
375. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI and Green DR, The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2(3): 156-62, 2000.
376. Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, Yoshida Y, Uchiyama T and Kawanishi S, Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 61(7): 2878-84, 2001.
377. Cossarizza A, Kalashnikova G, Grassilli E, Chiappelli F, Salvioli S, Capri M, Barbieri D, Troiano L, Monti D and Franceschi C, Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp Cell Res* 214(1): 323-30, 1994.
378. Karpnich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA and Farber JL, The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 277(19): 16547-52, 2002.
379. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD and Green DR, Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17(1): 37-49, 1998.
380. Denning MF, Wang Y, Tibudan S, Alkan S, Nickoloff BJ and Qin JZ, Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ* 9(1): 40-52, 2002.
381. Finucane DM, Waterhouse NJ, Amarante-Mendes GP, Cotter TG and Green DR, Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp Cell Res* 251(1): 166-74, 1999.
382. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B and Lemasters JJ, Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 307(Pt 1): 99-106, 1995.
383. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW and Farber JL, The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273(13): 7770-5, 1998.
384. Lim ML, Minamikawa T and Nagley P, The protonophore CCCP induces mitochondrial permeability transition without cytochrome c release in human osteosarcoma cells. *FEBS Lett* 503(1): 69-74, 2001.
385. Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y, Zimmerberg J and Youle RJ, Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of

- planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci US A* **96**(10): 5492-7, 1999.
386. Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A and Antonsson B, The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* **275**(30): 22713-8, 2000.
387. Epand RF, Martinou JC, Fornallaz-Mulhauser M, Hughes DW and Epand RM, The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* **277**(36): 32632-9, 2002.
388. Epand RF, Martinou JC, Montessuit S and Epand RM, Membrane perturbations induced by the apoptotic Bax protein. *Biochem J* **367**(Pt 3): 849-55, 2002.
389. Epand RF, Martinou JC, Montessuit S and Epand RM, Transbilayer lipid diffusion promoted by Bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* **42**(49): 14576-82, 2003.
390. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR and Newmeyer DD, Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**(3): 331-42, 2002.
391. Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X and Wang X, Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* **2**(10): 754-61, 2000.
392. Tuominen EK, Wallace CJ and Kinnunen PK, Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* **277**(11): 8822-6, 2002.
393. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB and Dowhan W, Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* **276**(41): 38061-7, 2001.
394. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B and Orrenius S, Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci US A* **99**(3): 1259-63, 2002.
395. Wright MM, Howe AG and Zarembeg V, Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochem Cell Biol* **82**: 18-26, 2004.
396. Iverson SL, Enoksson M, Gogvadze V, Ott M and Orrenius S, Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria. *J Biol Chem* **279**(2): 1100-7, 2004.
397. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ and Shore GC, Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**(1): 207-15, 1998.
398. Tan YJ, Beerheide W and Ting AE, Biophysical characterization of the oligomeric state of Bax and its complex formation with Bcl-XL. *Biochem Biophys Res Commun* **255**(2): 334-9, 1999.
399. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B and Martinou JC, Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**(15): 11615-23, 2001.
400. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT and Youle RJ, Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *Embo J* **18**(9): 2330-41, 1999.
401. Hsu YT and Youle RJ, Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* **273**(17): 10777-83, 1998.

402. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH and Youle RJ, Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* **153**(6): 1265-76, 2001.
403. Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E and Saikumar P, Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* **278**(7): 5367-76, 2003.
404. Ruffolo SC and Shore GC, Bcl-2 selectively interacts with the Bid-induced open conformer of Bak, inhibiting Bak auto-oligomerization. *J Biol Chem* **278**(27): 25039-45, 2003.
405. Varghese J, Radhika G and Sarin A, The role of calpain in caspase activation during etoposide induced apoptosis in T cells. *Eur J Immunol* **31**(7): 2035-41, 2001.
406. Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC and Gottlieb RA, Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**(33): 30724-8, 2001.
407. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V and Salvesen GS, Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**(5): 3149-57, 2001.
408. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E and Gross A, tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* **277**(14): 12237-45, 2002.
409. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D and Reed JC, Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci US A* **95**(9): 4997-5002, 1998.
410. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A and Martinou JC, Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* **143**(1): 217-24, 1998.
411. Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK and Yin XM, Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* **275**(50): 39474-81, 2000.
412. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA and Korsmeyer SJ, Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**(6747): 886-91, 1999.
413. Degli Esposti M and Dive C, Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 455-61, 2003.
414. Hardwick JM and Polster BM, Bax, along with lipid conspirators, allows cytochrome c to escape mitochondria. *Mol Cell* **10**(5): 963-5, 2002.
415. Scorrano L, Ashiya M, Buttler K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA and Korsmeyer SJ, A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* **2**(1): 55-67, 2002.
416. Yamaguchi H and Wang HG, Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem* **277**(44): 41604-12, 2002.

417. Terradillos O, Montessuit S, Huang DC and Martinou JC, Direct addition of BimL to mitochondria does not lead to cytochrome c release. *FEBS Lett* 522(1-3): 29-34, 2002.
418. Elangovan B and Chinnadurai G, Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem* 272(39): 24494-8, 1997.
419. Reed JC, Jurgensmeier JM and Matsuyama S, Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 127-37, 1998.
420. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR and Reed JC, Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268(9): 6511-9, 1993.
421. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M and Kroemer G, Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184(4): 1331-41, 1996.
422. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H and Tsujimoto Y, Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(4): 1455-9, 1998.
423. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL and Korsmeyer SJ, Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75(2): 241-51, 1993.
424. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T and Bredesen DE, Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262(5137): 1274-7, 1993.
425. Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E and Babior BM, Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(2): 654-8, 1996.
426. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B and Kroemer G, Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182(2): 367-77, 1995.
427. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1(7): 949-57, 1998.
428. Hu Y, Ding L, Spencer DM and Nunez G, WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 273(50): 33489-94, 1998.
429. Hu Y, Benedict MA, Ding L and Nunez G, Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J* 18(13): 3586-95, 1999.
430. Adrain C, Slee EA, Harte MT and Martin SJ, Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274(30): 20855-60, 1999.
431. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ, 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(2): 281-92, 1999.
432. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662): 43-50, 1998.

433. Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X, DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-84, 1997.
434. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK and Rosen A, Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183(5): 1957-64, 1996.
435. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A and Olson MF, Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3(4): 339-45, 2001.
436. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G and Wu H, DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9(9): 680-4, 2002.
437. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM and Dawson VL, Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297(5579): 259-63, 2002.
438. Yu SW, Wang H, Dawson TM and Dawson VL, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 14(3): 303-17, 2003.
439. Cregan SP, Dawson VL and Slack RS, Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23(16): 2785-96, 2004.
440. Hong SJ, Dawson TM and Dawson VL, Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25(5): 259-64, 2004.
441. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M and Wesselborg S, Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14(3): 277-87, 2004.
442. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148(7): 2207-16, 1992.
443. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA and Henson PM, A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405(6782): 85-90, 2000.
444. Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N and Elkon KB, I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* 196(5): 655-65, 2002.
445. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G and Wesselborg S, Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113(6): 717-30, 2003.
446. Uchiyama Y, Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* 64(3): 233-46, 2001.
447. Bursch W, The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8(6): 569-81, 2001.
448. Turk B, Turk D and Turk V, Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 98-111, 2000.

449. Leist M and Jaattela M, Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8(4): 324-6, 2001.
450. Keppler D, Sameni M, Moin K, Mikkelsen T, Diglio CA and Sloane BF, Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B & Co. *Biochem Cell Biol* 74(6): 799-810, 1996.
451. McGrath ME, The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 181-204, 1999.
452. Turk B, Dolenc I, Turk V and Bieth JG, Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* 32(1): 375-80, 1993.
453. Turk V, Turk B and Turk D, Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J* 20(17): 4629-33, 2001.
454. Turk V, Turk B, Guncar G, Turk D and Kos J, Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul* 42: 285-303, 2002.
455. Turk V and Bode W, The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285(2): 213-9, 1991.
456. Inglis JD, Lee M, Davidson DR and Hill RE, Isolation of two cDNAs encoding novel alpha 1-antichymotrypsin-like proteins in a murine chondrocytic cell line. *Gene* 106(2): 213-20, 1991.
457. Liu N, Raja SM, Zazzeroni F, Metkar SS, Shah R, Zhang M, Wang Y, Bromme D, Russin WA, Lee JC, Peter ME, Froelich CJ, Franzoso G and Ashton-Rickardt PG, NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *Embo J* 22(19): 5313-22, 2003.
458. Zdolsek J, Zhang H, Roberg K and Brunk U, H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells. *Free Radic Res Commun* 18(2): 71-85, 1993.
459. Zdolsek JM and Svensson I, Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(6): 401-6, 1993.
460. Brunk UT, Zhang H, Dalen H and Ollinger K, Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. *Free Radic Biol Med* 19(6): 813-22, 1995.
461. Brunk UT and Svensson I, Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep* 4(1-2): 3-11, 1999.
462. Kagedal K, Johansson U and Ollinger K, The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *Faseb J* 15(9): 1592-4, 2001.
463. Ouedraogo G, Morliere P, Bazin M, Santus R, Kratzer B, Miranda MA and Castell JV, Lysosomes are sites of fluoroquinolone photosensitization in human skin fibroblasts: a microspectrofluorometric approach. *Photochem Photobiol* 70(2): 123-9, 1999.
464. Brunk UT, Dalen H, Roberg K and Hellquist HB, Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 23(4): 616-26, 1997.
465. Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini JL, Metivier D, Ojcius DM, Jaattela M and Kroemer G, Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 197(10): 1323-34, 2003.
466. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH and Gores GJ, Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated

- hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* **106**(9): 1127-37, 2000.
467. Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Gahr J, Schwandner R, Weber T, Saftig P, Peters C, Brunner J, Kronke M and Schutze S, Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *Embo J* **18**(19): 5252-63, 1999.
468. Roberts LR, Adjei PN and Gores GJ, Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem Biophys* **30**(1): 71-88, 1999.
469. Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA and Giaccone G, Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **64**(1): 27-30, 2004.
470. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M and Jaattela M, Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**(5): 999-1010, 2001.
471. Ishisaka R, Kanno T, Akiyama J, Yoshioka T, Utsumi K and Utsumi T, Activation of caspase-3 by lysosomal cysteine proteases and its role in 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biochem (Tokyo)* **129**(1): 35-41, 2001.
472. Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G and Ohashi A, Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Adv Enzyme Regul* **41**: 237-50, 2001.
473. Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenaabeele P and Grooten J, Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* **438**(3): 150-8, 1998.
474. Cirman T, Oresic K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS and Turk B, Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* **279**(5): 3578-87, 2004.
475. Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C and Senik A, Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* **278**(33): 31401-11, 2003.
476. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL and Kroemer G, Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* **22**(25): 3927-36, 2003.
477. Zhao M, Antunes F, Eaton JW and Brunk UT, Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* **270**(18): 3778-86, 2003.
478. Brunk UT, Lysosomotropic detergents induce time- and dose-dependent apoptosis/necrosis in cultured cells. *Redox Rep* **5**(2-3): 87-8, 2000.
479. Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL and Herman B, Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **31**(4): 305-19, 1999.
480. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA and Herman B, The mitochondrial

- permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 177-96, 1998.
481. Taha TA, Osta W, Kozhaya L, Bielawski J, Johnson KR, Gillanders WE, Dbaibo GS, Hannun YA and Obeid LM, Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem* 279(19): 20546-54, 2004.
 482. Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF and Gores GJ, Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(4): G947-56, 2002.
 483. Ollinger K and Brunk UT, Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med* 19(5): 565-74, 1995.
 484. Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW and Aggarwal BB, Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 273(21): 13245-54, 1998.
 485. Wang JH, Redmond HP, Watson RW and Bouchier-Hayes D, Induction of human endothelial cell apoptosis requires both heat shock and oxidative stress responses. *Am J Physiol* 272(5 Pt 1): C1543-51, 1997.
 486. Ferri KF and Kroemer G, Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3(11): E255-63, 2001.
 487. Zhao M, Eaton JW and Brunk UT, Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2? *FEBS Lett* 485(2-3): 104-8, 2000.
 488. Zhao M, Eaton JW and Brunk UT, Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett* 509(3): 405-12, 2001.
 489. Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P, Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 552-65, 2003.
 490. Annis MG, Yethon JA, Leber B and Andrews DW, There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 115-23, 2004.
 491. Nicotera P and Orrenius S, The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23(2-3): 173-80, 1998.
 492. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA and Pozzan T, Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280(5370): 1763-6, 1998.
 493. Csordas G, Thomas AP and Hajnoczky G, Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *Embo J* 18(1): 96-108, 1999.
 494. Pacher P and Hajnoczky G, Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *Embo J* 20(15): 4107-21, 2001.
 495. He H, Lam M, McCormick TS and Distelhorst CW, Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 138(6): 1219-28, 1997.
 496. Kuo TH, Kim HR, Zhu L, Yu Y, Lin HM and Tsang W, Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene* 17(15): 1903-10, 1998.
 497. Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T and Rizzuto R, Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 148(5): 857-62, 2000.

498. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F and Prevarskaya N, Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1(2): 169-79, 2002.
499. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N and Krause KH, Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5723-8, 2000.
500. Ferrari D, Pinton P, Szabadkai G, Chami M, Campanella M, Pozzan T and Rizzuto R, Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. *Cell Calcium* 32(5-6): 413-20, 2002.
501. Hsu YT and Youle RJ, Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272(21): 13829-34, 1997.
502. Germain M, Mathai JP and Shore GC, BH-3-only Bik functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* 277(20): 18053-60, 2002.
503. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T and Rizzuto R, The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J* 20(11): 2690-701, 2001.
504. Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA and Shore GC, p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139(2): 327-38, 1997.
505. Breckenridge DG, Nguyen M, Kuppig S, Reth M and Shore GC, The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4331-6, 2002.
506. Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC and Shore GC, Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160(7): 1115-27, 2003.
507. Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, O'Neil RG and McConkey DJ, Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem* 277(23): 20301-8, 2002.
508. Waterhouse NJ, Finucane DM, Green DR, Elce JS, Kumar S, Alnemri ES, Litwack G, Khanna K, Lavin MF and Watters DJ, Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 5(12): 1051-61, 1998.
509. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA and Yuan J, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765): 98-103, 2000.
510. Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S and Shoshan MC, Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22(9): 3003-13, 2002.
511. Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU, Oh TH, Saido TC and Oh YJ, Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J Neurochem* 77(6): 1531-41, 2001.
512. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF and Reed JC, Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284(5412): 339-43, 1999.

513. Shi YF, Sahai BM and Green DR, Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339(6226): 625-6, 1989.
514. Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, Kim KW, Bandyopadhyay A, Hong YM, Kim do H, Cho C, Liu JO, Snyder SH and Jung YK, Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 9870-5, 2002.
515. Zhou BB and Elledge SJ, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408(6811): 433-9, 2000.
516. Rich T, Allen RL and Wyllie AH, Defying death after DNA damage. *Nature* 407(6805): 777-83, 2000.
517. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K and Linn S, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73: 39-85, 2004.
518. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ, Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810): 307-10, 2000.
519. Miyashita T and Reed JC, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2): 293-9, 1995.
520. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW and Vogelstein B, PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7(3): 673-82, 2001.
521. Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ and El-Deiry WS, BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4(11): 842-9, 2002.
522. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A and Orrenius S, Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6(7): 644-51, 1999.
523. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA and Rosen A, Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149(3): 603-12, 2000.
524. Mendelsohn AR, Hamer JD, Wang ZB and Brent R, Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10): 6871-6, 2002.
525. Shearwin-Whyatt LM, Harvey NL and Kumar S, Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptor RAIDD. *Cell Death Differ* 7(2): 155-65, 2000.
526. Nur EKA, Gross SR, Pan Z, Balklava Z, Ma J and Liu LF, Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem* 279(24): 24911-4, 2004.
527. Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrmann J, Brisbay S, Tari AM, Lopez-Berestein G, Lozano G, Sarkiss M and McDonnell TJ, Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 15(23): 2767-72, 1997.
528. Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, Nunez G and Clarke MF, c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 5878-82, 1994.
529. Schor NF, Rudin CM, Hartman AR, Thompson CB, Tyurina YY and Kagan VE, Cell line dependence of Bcl-2-induced alteration of glutathione handling. *Oncogene* 19(3): 472-6, 2000.
530. Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka Y and Yodoi J, Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 161(12): 6689-95, 1998.

531. Voehringer DW, McConkey DJ, McDonnell TJ, Brisbay S and Meyn RE, Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 2956-60, 1998.
532. Marin MC, Fernandez A, Bick RJ, Brisbay S, Buja LM, Snuggs M, McConkey DJ, von Eschenbach AC, Keating MJ and McDonnell TJ, Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene* 12(11): 2259-66, 1996.
533. Hoetelmans R, van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJ and Dierendonck JH, Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* 7(4): 384-92, 2000.
534. Gajkowska B, Motyl T, Olszewska-Badarczuk H, Gniadecki R and Koronkiewicz M, Structural association of Bax with nuclear matrix and cytomatrix revealed by embedment-free immunogold electron microscopy. *Cell Biol Int* 24(9): 649-56, 2000.
535. Wang ZH, Ding MX, Chew-Cheng SB, Yun JP and Chew EC, Bcl-2 and Bax proteins are nuclear matrix associated proteins. *Anticancer Res* 19(6B): 5445-9, 1999.
536. Schmitt E, Beauchemin M and Bertrand R, Nuclear co-localization and interaction between bcl-xL and cdk1 (cdc2) during G2/M cell cycle checkpoint. *Submitted to Oncogene*, 2004.
537. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4): 487-501, 2001.
538. Hu S and Yang X, dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD. *J Biol Chem* 275(40): 30761-4, 2000.
539. Ozoren N and El-Deiry WS, Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 13(2): 135-47, 2003.
540. Nagata S, Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33: 29-55, 1999.
541. Nagata S, Fas-induced apoptosis. *Intern Med* 37(2): 179-81, 1998.
542. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17(6): 1675-87, 1998.
543. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D and Ashkenazi A, Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396(6712): 699-703, 1998.
544. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W and Vandenabeele P, Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188(5): 919-30, 1998.
545. Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y and Nagata S, Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 151(6): 1247-56, 2000.
546. Krammer PH, CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407(6805): 789-95, 2000.
547. Hsu H, Xiong J and Goeddel DV, The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4): 495-504, 1995.
548. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ and Leder P, The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 8(3): 297-303, 1998.

549. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW, Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7(5): 715-25, 1997.
550. Ashkenazi A and Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381): 1305-8, 1998.
551. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W and Vandenabeele P, Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187(9): 1477-85, 1998.
552. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J and Dixit VM, The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276(5309): 111-3, 1997.
553. Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A and Kawanishi S, TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265(1): 130-3, 1999.
554. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH and Walczak H, FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12(6): 599-609, 2000.
555. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A, Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277(5327): 818-21, 1997.
556. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM and Alnemri ES, Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272(41): 25417-20, 1997.
557. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A, A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7(12): 1003-6, 1997.
558. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA and Goodwin RG, The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7(6): 813-20, 1997.
559. Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV and Doyle ML, Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* 275(30): 23319-25, 2000.
560. Thomas WD and Hersey P, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* 161(5): 2195-200, 1998.
561. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K and Griffith TS, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190(8): 1155-64, 1999.
562. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR and Fanger NA, Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189(8): 1343-54, 1999.
563. Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G and el-

- Deiry WS, KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17(2): 141-3, 1997.
564. Burns TF, Bernhard EJ and El-Deiry WS, Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene* 20(34): 4601-12, 2001.
565. Nicholson DW, From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407(6805): 810-6, 2000.
566. Debatin KM and Krammer PH, Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23(16): 2950-66, 2004.
567. Pommier Y, DNA Topoisomerase II Inhibitors. In: *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents* (Ed. Teicher BA). Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 1997.
568. Gupta M, Fujimori A and Pommier Y, Eukaryotic DNA topoisomerases I. *Biochim Biophys Acta* 1262(1): 1-14, 1995.
569. Kaufmann SH, Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1400(1-3): 195-211, 1998.
570. Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H and Kohn KW, Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 532(1-2): 173-203, 2003.
571. Desai SD, Liu LF, Vazquez-Abad D and D'Arpa P, Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem* 272(39): 24159-64, 1997.
572. Mao Y, Sun M, Desai SD and Liu LF, SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci US A* 97(8): 4046-51, 2000.
573. Horie K, Tomida A, Sugimoto Y, Yasugi T, Yoshikawa H, Taketani Y and Tsuruo T, SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene* 21(52): 7913-22, 2002.
574. Mesner PW, Jr., Budihardjo, II and Kaufmann SH, Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 461-99, 1997.
575. Norbury CJ and Zhivotovsky B, DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23(16): 2797-808, 2004.
576. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC, Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6): 1799-805, 1994.
577. Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM and Fornace AJ, Jr., Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9(12): 3743-51, 1994.
578. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S and Croce CM, Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54(8): 2095-7, 1994.
579. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E and et al., Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15(6): 3032-40, 1995.
580. Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M and Krammer PH, p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188(11): 2033-45, 1998.

581. Vousden KH and Lu X, Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2(8): 594-604, 2002.
582. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW and Vogelstein B, A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648): 300-5, 1997.
583. Flatt PM, Polyak K, Tang LJ, Scatena CD, Westfall MD, Rubinstein LA, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B, Hill DE and Pietenpol JA, p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett* 156(1): 63-72, 2000.
584. Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M and May E, Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19(5): 649-60, 2000.
585. Fei P, Bernhard EJ and El-Deiry WS, Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 62(24): 7316-27, 2002.
586. Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods WG and Findley HW, DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303(1): 124-31, 2002.
587. Marchenko ND, Zaika A and Moll UM, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275(21): 16202-12, 2000.
588. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P and Moll UM, p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11(3): 577-90, 2003.
589. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M and Green DR, Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660): 1010-4, 2004.
590. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME and George DL, Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6(5): 443-50, 2004.
591. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Jr. and Kohn KW, Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57(19): 4285-300, 1997.
592. Valkov NI and Sullivan DM, Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resist Updat* 6(1): 27-39, 2003.
593. Slichenmyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ and Kastan MB, Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 53(18): 4164-8, 1993.
594. Bertrand R, Solary E, Jenkins J and Pommier Y, Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp Cell Res* 207(2): 388-97, 1993.
595. Gupta M, Fan S, Zhan Q, Kohn KW, O'Connor PM and Pommier Y, Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res* 3(9): 1653-60, 1997.
596. Jost CA, Marin MC and Kaelin WG, Jr., p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389(6647): 191-4, 1997.
597. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D and McKeon F, p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple

- products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**(3): 305-16, 1998.
598. Agami R, Blandino G, Oren M and Shaul Y, Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**(6738): 809-13, 1999.
599. Sheikh MS and Fornace AJ, Jr., Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* **182**(2): 171-81, 2000.
600. Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T and Knight RA, Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci* **28**(12): 663-70, 2003.
601. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D, Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**(4): 809-19, 1997.
602. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., Levrero M and Wang JY, The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**(6738): 806-9, 1999.
603. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R and Kufe D, p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**(6738): 814-7, 1999.
604. Sanchez-Prieto R, Sanchez-Arevalo VJ, Servitja JM and Gutkind JS, Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* **21**(6): 974-9, 2002.
605. Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C and Levrero M, DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* **9**(1): 175-86, 2002.
606. Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K and Kohno K, p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* **277**(35): 31694-702, 2002.
607. Katoh I, Aisaki KI, Kurata SI, Ikawa S and Ikawa Y, p51A (TAp63gamma), a p53 homolog, accumulates in response to DNA damage for cell regulation. *Oncogene* **19**(27): 3126-30, 2000.
608. Zhu J, Jiang J, Zhou W and Chen X, The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* **58**(22): 5061-5, 1998.
609. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY and Melino G, The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* **113**(Pt 10): 1661-70, 2000.
610. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C and Vousden KH, p73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**(9): 8076-83, 2004.
611. Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M and Ikawa S, Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* **4**(7): 839-43, 1998.
612. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F and Jacks T, p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**(6880): 560-4, 2002.
613. Ghosh S, May MJ and Kopp EB, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60, 1998.

614. Karin M and Ben-Neriah Y, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-63, 2000.
615. Ghosh S and Karin M, Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109(Suppl): S81-96, 2002.
616. Boland MP, Foster SJ and O'Neill LA, Daunorubicin activates NFkappaB and induces kappaB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *J Biol Chem* 272(20): 12952-60, 1997.
617. Bender K, Gottlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ and Herrlich P, Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J* 17(17): 5170-81, 1998.
618. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A and Green DR, DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1(4): 543-51, 1998.
619. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magne N, Fischel JL, Milano G and Peyron JF, Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 61(21): 7785-91, 2001.
620. Barkett M and Gilmore TD, Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6910-24, 1999.
621. Baldwin AS, Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 107(3): 241-6, 2001.
622. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J and Cheng G, NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(16): 9136-41, 1999.
623. Tsukahara T, Kannagi M, Ohashi T, Kato H, Arai M, Nunez G, Iwanaga Y, Yamamoto N, Ohtani K, Nakamura M and Fujii M, Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol* 73(10): 7981-7, 1999.
624. Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B and Nel AE, The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 165(4): 1743-54, 2000.
625. Chen C, Edelstein LC and Gelinas C, The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20(8): 2687-95, 2000.
626. Grossmann M, O'Reilly LA, Gugasyan R, Strasser A, Adams JM and Gerondakis S, The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *Embo J* 19(23): 6351-60, 2000.
627. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV and Baldwin AS, Jr., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383): 1680-3, 1998.
628. Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP and Bours V, Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 20(22): 2805-13, 2001.
629. Karin M, Cao Y, Greten FR and Li ZW, NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2(4): 301-10, 2002.
630. Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, Gomes BC and Lorenzi MV, Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF

- receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene* 20(55): 7965-75, 2001.
631. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, Fuchs EJ and Bedi A, Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 3(4): 409-16, 2001.
632. Zheng Y, Ouaz F, Bruzzo P, Singh V, Gerondakis S and Beg AA, NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J Immunol* 166(8): 4949-57, 2001.
633. Campbell KJ, Rocha S and Perkins ND, Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell* 13(6): 853-65, 2004.
634. Foo SY and Nolan GP, NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* 15(6): 229-35, 1999.
635. Mercurio F and Manning AM, NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18(45): 6163-71, 1999.
636. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W and Schmitz ML, The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 267(12): 3828-35, 2000.
637. Piret B, Schoonbroodt S and Piette J, The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 18(13): 2261-71, 1999.
638. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR and Vousden KH, Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404(6780): 892-7, 2000.
639. Karin M, Liu Z and Zandi E, AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 240-6, 1997.
640. Karin M, The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270(28): 16483-6, 1995.
641. Lin A, Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 25(1): 17-24, 2003.
642. Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR and Karin M, Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol* 19(1): 751-63, 1999.
643. Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O and Ham J, Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29(3): 629-43, 2001.
644. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA and Davis RJ, Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288(5467): 870-4, 2000.
645. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y and Wu X, A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115(1): 61-70, 2003.
646. Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC and Arkinstall S, Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* 272(40): 25238-42, 1997.
647. Lei K, Nimmual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D and Davis RJ, The Bax subfamily of Bcl-2-related proteins is essential for apoptotic

- signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 22(13): 4929-42, 2002.
648. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J and Lin A, JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13(3): 329-40, 2004.
649. Bost F, McKay R, Bost M, Potapova O, Dean NM and Mercola D, The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 19(3): 1938-49, 1999.
650. Potapova O, Anisimov SV, Gorospe M, Dougherty RH, Gaarde WA, Boheler KR and Holbrook NJ, Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 62(11): 3257-63, 2002.
651. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV and Karin M, Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87(3): 565-76, 1996.
652. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T and DePinho RA, p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371(6492): 72-4, 1994.
653. Pan H, Yin C, Dyson NJ, Harlow E, Yamasaki L and Van Dyke T, Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell* 2(3): 283-92, 1998.
654. Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, Belloni L, Gallo R, Cimino L, Porcellini A, Screpanti I, Balsano C, Alesse E, Gulino A and Levrero M, Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 5(6): 552-8, 2003.
655. Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES and Johnson DG, E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2(4): 203-14, 2004.
656. Hershko T and Ginsberg D, Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279(10): 8627-34, 2004.
657. Accili D and Arden KC, FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117(4): 421-6, 2004.
658. Xia SJ, Pressey JG and Barr FG, Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 1(2): 97-104, 2002.
659. So CW and Cleary ML, Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* 101(2): 633-9, 2003.
660. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R and Hung MC, IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117(2): 225-37, 2004.
661. Sunters A, Fernandez de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC and Lam EW, FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 278(50): 49795-805, 2003.
662. Spencer CA and Groudine M, Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 56: 1-48, 1991.
663. Nesbit CE, Tersak JM and Prochownik EV, MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18(19): 3004-16, 1999.

664. Pelengaris S and Khan M, The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 416(2): 129-36, 2003.
665. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ and Hancock DC, Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1): 119-28, 1992.
666. Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC and Cleveland JL, Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6(10): 1915-22, 1991.
667. Juin P, Hueber AO, Littlewood T and Evan G, c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 13(11): 1367-81, 1999.
668. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ and Roussel MF, Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12(15): 2424-33, 1998.
669. Kaufmann SH and Gores GJ, Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 22(11): 1007-17, 2000.
670. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL and Kohn KW, Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23(16): 2934-49, 2004.
671. Bettaieb A, Dubrez-Daloz L, Launay S, Plenchette S, Rebe C, Cathelin S and Solary E, Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 3(4): 307-18, 2003.
672. Hopkins-Donaldson S, Cathomas R, Simoes-Wust AP, Kurtz S, Belyanskaya L, Stahel RA and Zangemeister-Wittke U, Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl-xL antisense treatment. *Int J Cancer* 106(2): 160-6, 2003.
673. Jiang Z, Zheng X and Rich KM, Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem* 84(2): 273-81, 2003.
674. Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R and Amiot M, Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100(1): 194-9, 2002.
675. Wang S, Yang D and Lippman ME, Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol* 30(5 Suppl 16): 133-42, 2003.
676. Hirsch T, Decaudin D, Susin SA, Marchetti P, Larochette N, Resche-Rigon M and Kroemer G, PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241(2): 426-34, 1998.
677. Arap W, Pasqualini R and Ruoslahti E, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279(5349): 377-80, 1998.
678. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Rio GD, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE and Pasqualini R, Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5(9): 1032-8, 1999.
679. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W and Ruoslahti E, Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60(3): 722-7, 2000.
680. Hieber U and Heim ME, Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies. *Oncology* 51(2): 142-53, 1994.

681. Lejeune FJ, Ruegg C and Lienard D, Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 10(5): 573-80, 1998.
682. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T and Nagata S, Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364(6440): 806-9, 1993.
683. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S and Peter ME, Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254(3): 439-59, 1998.
684. Ashkenazi A and Dixit VM, Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-60, 1999.
685. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z and Schwall RH, Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104(2): 155-62, 1999.
686. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC and Lynch DH, Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5(2): 157-63, 1999.
687. Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR and Strom SC, Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6(5): 564-7, 2000.
688. Ambrosini G, Adida C and Altieri DC, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3(8): 917-21, 1997.
689. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeyer A, Van den Berghe H and Marynen P, The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6ssociated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 93(11): 3601-9, 1999.
690. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC and Burrows FJ, A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425(6956): 407-10, 2003.
691. Dan S, Naito M and Tsuruo T, Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR - ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ* 5(8): 710-5, 1998.
692. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J and Lydon NB, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2(5): 561-6, 1996.
693. Mauro MJ and Druker BJ, STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 6(3): 233-8, 2001.
694. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S and Sawyers CL, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344(14): 1031-7, 2001.
695. O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, Rivera VM, Tang H, Metcalf CA, 3rd, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Dalgarno D, Clackson T, Sawyer TK, Deininger MW and Druker BJ, Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood* 104(8): 2532-9, 2004.

696. Pompetti F, Pilla D and Giancola R, Cancer therapy: switching off oncogenes. *Bioessays* 25(2): 104-7, 2003.
697. Zhivotovsky B and Orrenius S, Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* 13(2): 125-34, 2003.
698. O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I and Kohn KW, Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res* 53(20): 4776-80, 1993.
699. Schmitt E, Cimoli G, Steyaert A and Bertrand R, Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp Cell Res* 240(1): 107-21, 1998.
700. Schmitt E, Steyaert A, Cimoli G and Bertrand R, 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(6): 506-16, 1998.
701. Paquet C, Schmitt E, Beauchemin M and Bertrand R, Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells. *Apoptosis* 9(6): 815-31, 2004.
702. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G and Siebenlist U, Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267(5203): 1485-8, 1995.
703. Whiteside ST, Ernst MK, LeBail O, Laurent-Winter C, Rice N and Israel A, N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity. *Mol Cell Biol* 15(10): 5339-45, 1995.
704. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, Shumway SD, Kurama T, Boothman DA and Miyamoto S, NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem* 275(13): 9501-9, 2000.
705. Grant S, Freerman AJ, Birrer MJ, Martin HA, Turner AJ, Szabo E, Chelliah J and Jarvis WD, Effect of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on apoptosis and differentiation in human monocytic leukemia cells (U937) expressing a c-Jun dominant-negative mutant protein (TAM67). *Cell Growth Differ* 7(5): 603-13, 1996.
706. Strano S, Rossi M, Fontemaggi G, Munarriz E, Soddu S, Sacchi A and Blandino G, From p63 to p53 across p73. *FEBS Lett* 490(3): 163-70, 2001.
707. Martinou JC and Green DR, Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-7, 2001.
708. Zamzami N and Kroemer G, The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 67-71, 2001.
709. Sane AT, Schmitt E, Steyaert A, Meyer D and Bertrand R, The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis: relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation. *Biochem Cell Biol* 75(4): 359-68, 1997.
710. Brunk UT, Zhang H, Roberg K and Ollinger K, Lethal hydrogen peroxide toxicity involves lysosomal iron-catalyzed reactions with membrane damage. *Redox Rep* 1: 267-277, 1995.
711. Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA and Banfi E, Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry* 12(7): 687-93, 1991.

712. Carter WO, Narayanan PK and Robinson JP, Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55(2): 253-8, 1994.
713. Reinheckel T, Deussing J, Roth W and Peters C, Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* 382(5): 735-41, 2001.
714. Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT and Olsen BR, Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci US A* 99(12): 7883-8, 2002.
715. Roberg K, Johansson U and Ollinger K, Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27(11-12): 1228-37, 1999.
716. Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L and Brunk UT, Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci US A* 99(9): 6286-91, 2002.
717. Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ and Ley TJ, Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci US A* 98(26): 14985-90, 2001.
718. Vieira HL, Boya P, Cohen I, El Hamel C, Haouzi D, Druillenec S, Belzacq AS, Brenner C, Roques B and Kroemer G, Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L). *Oncogene* 21(13): 1963-77, 2002.
719. Harris MH and Thompson CB, The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7(12): 1182-91, 2000.
720. Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH and Green DR, Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117(6): 773-86, 2004.
721. Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M and Kronke M, Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem* 274(15): 10203-12, 1999.
722. Rother J, van Echten G, Schwarzmann G and Sandhoff K, Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189(1): 14-20, 1992.
723. Koch J, Gartner S, Li CM, Quintern LE, Bernardo K, Levran O, Schnabel D, Desnick RJ, Schuchman EH and Sandhoff K, Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification Of the first molecular lesion causing Farber disease. *J Biol Chem* 271(51): 33110-5, 1996.
724. El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ and Hannun YA, Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* 275(28): 21508-13, 2000.
725. Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH and Obeid LM, Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* 276(28): 26577-88, 2001.
726. Firestone RA, Pisano JM and Bonney RJ, Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents. *J Med Chem* 22(9): 1130-3, 1979.

727. Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108(2): 153-64, 2002.
728. Desai SD, Li TK, Rodriguez-Bauman A, Rubin EH and Liu LF, Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res* 61(15): 5926-32, 2001.
729. Dou QP and Li B, Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat* 2(4): 215-23, 1999.
730. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM and Strasser A, Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286(5445): 1735-8, 1999.
731. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM and Strasser A, BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415(6874): 922-6, 2002.
732. Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, Hosoi H, Kinoshita T, Miyajima A, Houghton PJ, Look AT, Ozawa K and Inaba T, Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol* 21(3): 854-64, 2001.
733. Potapova O, Gorospe M, Dougherty RH, Dean NM, Gaarde WA and Holbrook NJ, Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol* 20(5): 1713-22, 2000.
734. Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF and Karin M, The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103(6): 897-907, 2000.
735. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiant G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X and Crook T, p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 3(4): 387-402, 2003.
736. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC and Kaelin WG, Jr., Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 3(4): 403-10, 2003.
737. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, Hugli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G and Tobler A, Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* 8(12): 1213-23, 2001.
738. Chen X, Zheng Y, Zhu J, Jiang J and Wang J, p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* 20(6): 769-74, 2001.
739. Zhu J, Nozell S, Wang J, Jiang J, Zhou W and Chen X, p73 cooperates with DNA damage agents to induce apoptosis in MCF7 cells in a p53-dependent manner. *Oncogene* 20(30): 4050-7, 2001.
740. Mantovani F, Piazza S, Gostissa M, Strano S, Zacchi P, Mantovani R, Blandino G and Del Sal G, Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell* 14(5): 625-36, 2004.
741. Wulf GM, Liou YC, Ryo A, Lee SW and Lu KP, Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* 277(50): 47976-9, 2002.
742. Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C and Del Sal G, The prolyl isomerase Pin1 reveals a

- mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419(6909): 853-7, 2002.
743. Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, Gu L, Tang X, Lu KP and Xiao ZX, The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419(6909): 849-53, 2002.
744. Charlot JF, Pretet JL, Haughey C and Mougin C, Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 9(3): 333-43, 2004.
745. Mihara M and Moll UM, Detection of mitochondrial localization of p53. *Methods Mol Biol* 234: 203-9, 2003.
746. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C and Watanabe C, Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(11): 5011-5, 1993.
747. Rabilloud T, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2(1): 3-10, 2002.
748. Schirle M, Heurtier MA and Kuster B, Profiling core proteomes of human cell lines by one-dimensional PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2(12): 1297-305, 2003.

CHAPITRE 7. ANNEXES

- 7.1 Annexe I** Unique and multi-domain Bcl-2 family members: post-translational modifications and apoptosis regulation
(In: *Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry*, vol.3(pt I): 291-325, 2003)

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Recent Res. Devel. Biophys. Biochem., 3(2003): 291-325 ISBN: 81-271-0014-5

21

Unique and multi-domain Bcl-2 family members: Post-translational modifications and apoptosis regulation

Claudie Paquet and Richard Bertrand

From the Research Centre of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal - Notre Dame Hospital and Montreal Cancer Institute, Montreal, (Que), H2L 4M1, Canada

Introduction

Apoptosis is a physiological process that orchestrates the death of unwanted cells within organisms. Using this form of programmed cell death, the body eliminates cells that are no longer needed, have been damaged, or become dangerous, without harming neighbouring cells or eliciting an inflammatory response (1). Apoptosis thus plays an essential role in sculpting organs during normal development, in maintaining tissue homeostasis, which requires a balance between cell proliferation and cell death, and in providing good immune function throughout life. As expected with such a crucial process, a growing list of pathological conditions, including immune diseases, degenerative disorders and cancer, have been linked to defects or

Correspondence/Reprint request: Dr. Richard Bertrand, Research Centre of the Centre hospitalier de l' Université de Montréal - Notre Dame Hospital and Montreal Cancer Institute, Room Y-5634, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1

anomalies in the apoptotic program (2, 3).

The organised collapse of an apoptotic cell is characterised by a particular set of morphological and biochemical features, of which the most prominent ones are a loss of cell volume or cell shrinkage, perinuclear chromatin condensation, internucleosomal DNA fragmentation, and the formation of apoptotic bodies that are rapidly engulfed by macrophages or neighbouring cells, providing a means for properly eliminating dying cells (4). Surely, the turning point in the field of apoptosis research has come from the extensive genetic work done in the nematode *Caenorhabditis elegans*, providing the first evidence that specific genes encode proteins that act as activators, inhibitors or effectors of the apoptotic process. The core components of the cell death machinery defined in *C. elegans* involve four key genes, *Ced-9*, *Ced-4*, *Ced-3* and *Egl-1* (5-8). Both *Ced-4* and *Ced-3* encode essential effectors of the apoptotic cascade, whereas *Ced-9* acts upstream to antagonise *Ced-4* and *Ced-3* function and protect cells from death. *Egl-1* codes for a negative regulator of *Ced-9* activity, therefore promoting cell death (9, 10). Homologs of these genes have been discovered in mammals, strongly supporting the highly-conserved nature of the apoptotic process. *Ced-9* protein presents significant sequence similarities with members of the mammalian Bcl-2 family of proteins, which include positive as well as negative apoptosis regulators composed of various combinations of Bcl-2 homology (BH) domains 1 to 4 (11-17). *Egl-1* protein is homologous to a subset of the Bcl-2 family termed the BH3-only proteins that contain merely one or two BH3 motifs and positively regulate cell death (18, 19). *Ced-3* is related to the mammalian interleukin-1 β -converting enzyme, a member of a growing family of 14 cysteine proteases called caspases. They are synthesised in the cell as inactive precursors that become activated either via proximity-induced autoproteolysis, or via cleavage by other upstream proteases (20). Some caspases (caspase-1, -4, -5, and -11) are involved in cytokine processing while others (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10) act to execute the apoptotic program (21, 22). Apoptotic caspases are generally subdivided into two classes: initiator caspases, such as caspase-2, -8, -9, and -10, which reside at the apex of the cascade and are mostly responsible for activation of the second class, the effector caspases (caspase-3, -6, and -7), which cleave a broad range of cellular targets that ultimately cause dismantling of the cell and apoptosis (23-25). Finally, the first human homolog of *Ced-4* identified is Apaf-1 (26), now part of an expanding group of adaptor molecules that promote activation of the initiator caspases (27, 28).

Two major pathways leading to caspase activation have been studied extensively in past years, and recently a third pathway has emerged. The *extrinsic* pathway is initiated at the plasma membrane after the ligation/activation of death receptors (Fas/CD95/Apo-1, TNF-R1, DR-3, DR-4, DR-5 and DR-6) by their cognate ligands, followed by the subsequent assembly of several adaptor molecules into a large caspase-activating complex, termed the DISC (*death-inducing signaling complex*), which recruits several procaspase-8 molecules that become activated via the proximity-induced autoproteolysis model (29-33). The second route is the so-called *intrinsic* pathway which relies on internal events surrounding the mitochondria. This pathway is triggered by a multitude of cellular insults, including DNA damage, heat shock and oxidative stress, all of which cause mitochondrial permeabilisation and the concomitant release of several apoptogenic factors, most notably cytochrome c, from the mitochondrial intermembrane space. Once in the cytosol, in the presence of dATP, cytochrome c associates with the adaptor

molecule Apaf-1, and drives the assembly of another caspase-activating complex, the apoptosome, which prompts procaspase-9 activation (26, 34-36). The BH3-only protein Bid, a member of the Bcl-2 family, acts as a molecular link between the *extrinsic* and *intrinsic* pathways. Being cleaved by caspase-8 to generate tBid, a truncated active fragment with mitochondrial translocation property, Bid connects DISC activation with mitochondria, where it helps induce mitochondrial destabilisation with consequent launching of the caspase cascade (29, 37-39). More recently, the presence of a novel caspase activation complex has been suggested from studies using cells lacking Apaf-1 or procaspase-9 (40, 41). Although this caspase activation pathway remains to be clearly identified, it seems to involve activation of procaspase-2, an event upstream of the mitochondrial pathway and regulated by anti-apoptotic Bcl-2 (42-45). Diverse stimuli thus trigger one of the three pathways, converging on the activation of initiator caspases which, in turn, activate downstream effector caspases that are responsible for the cleavage of multiple substrates, including the nuclease inhibitor DFF45/ICAD (46, 47) and components of the cytoskeleton, to give rise to internucleosomal DNA fragmentation and characteristic morphological changes (48).

Apoptosis in mammals is a complex process that involves a myriad of diverse regulators, effectors and inhibitors that work together to exert efficient control over the execution phase of apoptosis piloted by the caspases. The Bcl-2 family of proteins stands among the most crucial regulators of apoptosis and thus performs a vital function in deciding whether a cell will live or die. While the roles of the Bcl-2 family in apoptosis regulation have been studied extensively and reported by others (11-17), this review will focus on the structural particularities of the Bcl-2 family members and the post-translational modifications that affect and modulate their activities toward regulation of apoptosis. We will begin by introducing the Bcl-2 family of proteins, followed by an overview of their mechanisms of action and the apoptosis-modulatory effects of their subcellular localisation, and finally describe how post-translational events might impact on the function of these apoptosis regulators.

The Bcl-2 protein family

The *bcl-2* (*B* cell lymphoma/leukemia-2) gene was first identified at the chromosomal breakpoint of t(14:18)-bearing B cell lymphomas (49, 50), and was unexpectedly found to act as a new class of oncogenes that function to prevent apoptosis instead of promoting cellular proliferation (51-54). Bcl-2 is now the founder of a growing family of apoptosis regulators that either promote cell survival or facilitate cell death. The pro-survival members are multidomain proteins that contain at least BH1 and BH2, and those most similar to Bcl-2 have all four BH domains (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-w, Brag-1, Boo/Diva, Bcl-B/Bcl-2L-10 and Bcl-xES) (50, 55-65). According to their structure and biochemical function, the pro-apoptotic members can be further divided into two subgroups: the multidomain proteins composed of BH domains 1 to 3 (Bax, Bak, Bcl-xS, Bok/Mtd, Bcl-rambo and Bcl-gL) (55, 66-73), and the BH3-only proteins built of one or two BH3 domains (Bad, Bid, Bik/Nbk/Blk, Bim/Bod, Hrk/Dp5, Bnip1, Bnip3, Nix, Puma/Bbc3, Noxa, Bcl-gS, Mcl-1s, Map1 and Bmf) (68, 74-94). In addition to the BH domains, some proteins contain a long flexible loop that may act as a negative regulatory domain but also plays a role in protein stability, a pore-forming domain and a transmembrane domain at the carboxy terminal extremity (11-17).

The various Bcl-2 homologs function at least in part through protein-protein interactions, forming a complex dynamic network of homo- and hetero-oligomers, depending on the cellular environment and their subcellular localisation. Mutagenesis experiments have suggested that the dimerisation potential of the Bcl-2-like proteins is greatly influenced by their specific combination of BH domains (95-97). Thus, elucidation of the three-dimensional structure of the anti-apoptotic Bcl-xL has provided a first structural model in which the α helices located in the BH1, BH2 and BH3 domains create an elongated hydrophobic pocket where a BH3 amphipathic α helix of another Bcl-2-like protein can bind, analogous to a peptide ligand binding to its receptor (98-100). The heterodimerisation between pro- and anti-apoptotic molecules may neutralise one another's activity, suggesting that the relative concentration of one faction versus the other greatly influences the susceptibility of cells to a death signal (73, 101). Because it provides binding ability, the BH3 motif has become a potent mediator of cell death and is often uniquely required for cell killing activity (95, 102). Current models proposed that after a death signal, BH3-only proteins promote apoptosis by binding to, and inhibiting pro-survival molecules like Bcl-2 and Bcl-xL, or by binding to other death agonists, like the multidomain Bax and Bak proteins, which become activated and exert their pro-apoptotic activities at the mitochondrial level (96, 103-107). The BH3-only proteins that neutralise the pro-survival proteins are now referred to as BH3 "enabler or sensitizing" proteins, while those that bind pro-apoptotic Bax or Bak are called BH3 "activator or activating" proteins (108, 109).

Bcl-2-like proteins and intracellular organelles

Bcl-2 family members generally localize to separate subcellular compartments in the absence of a death signal. Anti-apoptotic members, like Bcl-2 and Bcl-xL, usually reside on the cytoplasmic face of the outer mitochondrial membrane (OMM), endoplasmic reticulum (ER) and nuclear envelope (51, 110, 111). In contrast, death-inducing members such as Bax, Bad and Bid are rather free in the cytosol of unstimulated cells, except for the multidomain Bak which seems to constitutively reside in the OMM (112-114). In contrast, the BH3-only Bim isoforms Bim-EL and -L, and Bmf, are linked to cytoskeleton components via binding to the large microtubular dynein motor complex and myosin V actin motor complex, respectively (89, 115). After a death signal, pro-apoptotic proteins undergo a conformational change which gives them the capacity to target and insert into intracellular membranes, especially in the mitochondria. The transmembrane domain appears to be important in conferring membrane-docking capacity to both pro- and anti-apoptotic members as well as in providing protein stability, even though reports indicate that deletion of this hydrophobic domain does not abrogate the function of most Bcl-2-like proteins (116, 117). But how does the Bcl-2 protein family affect apoptotic outcome at the level of a membrane?

Regulation of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 protein family

Regulation of mitochondrial membrane permeabilisation is the major means by which Bcl-2-like proteins exert their apoptosis regulatory effect. As a site of convergence for multiple death-inducing stimuli, the mitochondria are a pivotal decision centre that controls life and death by releasing apoptogenic factors in the cytosol. These death-inducing molecules are located within the mitochondrial intermembrane space and

include cytochrome c (118, 119), DIABLO/Smac, a factor that promotes caspase activation by its effect on IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) (120, 121), the nuclease activator AIF (*apoptosis-inducing factor*) (122, 123), Endo G (an apoptotic DNase) (124, 125), HtrA2 (an inhibitor of IAPs that also contains pro-apoptotic serine protease activity) (126), and some pro-caspases (127-130). Permeabilisation of the OMM is usually followed by caspase activation and irreversible apoptosis. Bcl-2 family members may control the mitochondrial permeabilisation phase (105) via three prevailing models: first, by forming autonomous channels in the OMM; second, by interfering with mitochondrial permeability transition pores (mPTP); and, finally, by promoting dynamic alterations in the structure of the lipid bilayer.

The unexpected pore-forming ability of the Bcl-2-like proteins has emerged from unfolding of the Bcl-xL three-dimensional structure (98). Structural similarities between the Bcl-xL molecule (particularly its $\alpha 5$ and $\alpha 6$ helices) and the pore-forming domains of certain bacterial toxins that act as channels for either ions or proteins suggest that Bcl-2 family proteins also function by forming pores in intracellular organelles (98, 100). Indeed, it was demonstrated that recombinant and purified Bcl-xL, Bcl-2, Bax and tBid proteins all created ions channels with distinct characteristics in artificial liposomes. These channels showed multi-conductance levels, were voltage- and pH-dependent, and displayed cation selectivity when formed by anti-apoptotic proteins, while those created by pro-apoptotic proteins were rather more permeable to anion (131-136). When recombinant Bax, Bak and Bid proteins are added to isolated mitochondria, the OMMs become permeable to mitochondrial apoptogenic factors, while anti-apoptotic Bcl-2 or Bcl-xL rather protect the mitochondrial membranes and inhibit the release of death-inducing molecules (118, 119, 137, 138). But how do the 20-kDa Bax-like proteins form channels sufficiently large to allow the passage of a 100 kDa DIABLO/Smac molecule?

The ability of Bax-like proteins to oligomerise may provide the answer. Indeed, only Bax oligomers have been shown to be pro-apoptotic (112, 139), and a study recently reported that Bax tetramer forms a pore large enough to permit cytochrome c exit from artificial liposomes (140). Such channel formation have never been observed in vivo until the study by Pavlov et al. (141), who recently obtained the first direct biophysical evidence of the apoptotic mitochondrial channel. By using patch clamping techniques, they demonstrated the presence of a new ion channel named *mitochondrial apoptosis-induced channel* in the OMM, whose pore size is sufficient to allow proteins as large or larger than the 15-kDa cytochrome c molecule to diffuse in the cytosol. Whether this channel is formed by Bax-like proteins alone or in association with other proteins remains to be determined. Reports have also suggested that the sole insertion of monomeric Bax or tBid into the OMM destabilises its lipid bilayer structure and promotes pore formation (142-145). Anti-apoptotic proteins seem to exert their function in part by inhibiting the formation of death-inducing pores by pro-apoptotic proteins, and a study has reported that the Bcl-2 channel could potentially inhibit apoptosis by inducing H^+ efflux from the mitochondria, preserving mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) (146). Anti-apoptotic proteins may also protect cells from death by inhibiting the production of reactive oxygen species (147, 148), by preventing intracellular acidification (149), by increasing mitochondrial Ca^{2+} capacity (122, 146), and by providing overall stabilisation of the membrane into which they are inserted (138, 150). These pro-survival mechanisms are not well defined and may or may not involve the pore-forming capacity of the anti-apoptotic proteins.

In this first model, Bcl-2-like proteins modulate OMM permeabilisation without altering mitochondrial function, which means that $\Delta\Psi_m$ is maintained as well as ATP production. This is crucial, because in the absence of dATP or ATP, the apoptosome cannot form, caspase-9 is not activated, and the cells tend to die by necrosis rather than by apoptosis (151, 152). The second model of OMM permeabilisation involves the mPTP, or megachannels, which form at contact sites between the outer and inner mitochondrial membranes (16, 153). Its core components are the voltage-dependent anion channel (VDAC), the adenine nucleotide translocator (ANT), the peripheral benzodiazepine receptor, the mitochondrial matrix cyclophilin as well as hexokinase and creatine kinase, which all create a large conductance pore permeable to solute with a molecular mass of ≤ 1.5 kDa (154, 155). Opening of the mPTP results in mitochondrial depolarisation and the subsequent dissipation of $\Delta\Psi_m$, uncoupling of oxidative phosphorylation, and swelling of the mitochondrial matrix (154). OMM rupture may eventually occur as a consequence of matrix expansion, releasing the intermembrane space contents (cytochrome c, DIABLO/smac, AIF) into the cytosol in a non specific manner (156, 157). Interactions between some members of the Bcl-2 family and components of the mPTP have been proposed by several studies. Pro-apoptotic molecules like Bax could bind to ANT and promote mPTP opening, an effect prevented by anti-apoptotic Bcl-2 (158). The multidomains Bax and Bak could also interact with the VDAC, enhancing its channel activity to allow passage of cytochrome c, while the BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL rather stimulates closure of the channel (159-161). Recently, Sugiyama et al. (162) have shown that BH3-only Bim, but not tBid, may also interact with the VDAC and promote its opening, which results in loss of $\Delta\Psi_m$ and cytochrome c release. By interacting with the mPTP, pro-apoptotic proteins thus appear to be capable of enhancing the basal permeability of the mPTP, allowing molecules larger than 1.5 kDa to diffuse through.

Many contradictory data about the occurrence of these interactions between Bcl-2-like proteins and mPTP have been obtained (106, 107, 163), as well as conflicting results regarding the necessity of mPTP opening and $\Delta\Psi_m$ disruption to allow cytochrome c release (105, 137, 164). The first model in which OMM permeabilisation and cytochrome c release may occur without significantly altering mitochondrial function may solve this last source of conflict. The second model does not seem compatible with the necessity of preserving mitochondrial function and ATP production to allow caspase activation and apoptosis. To solve this issue, some investigators have proposed a stimulus intensity-dependent commitment, either to the apoptotic or necrotic route. After a strong death signal, when the overall mitochondrial population becomes dysfunctional, necrosis appears. After weak to mild death-inducing stimuli, only a subpopulation of mitochondria might be altered, leaving the spared mitochondria functional to produce enough ATP to activate downstream caspases and subsequent apoptosis (155, 165). It is important to mention that the two proposed models are not mutually exclusive; both may occur during apoptosis, depending of the cell type and the apoptotic stimulus. In addition, other mechanisms by which Bcl-2 like proteins modulate mitochondrial apoptosis certainly exist and only await discovery.

Actions of Bcl-2-like proteins on intracellular organelles, including endoplasmic reticulum, nuclei and lysosomes

The observation that Bcl-2 is also targeted to the ER membranes (110, 166) suggested that Bcl-2-like proteins may also affect organelles other than the mitochondria. At the ER level, Bcl-2 may promote cell survival by binding to and sequestering death-inducing proteins such as Bax to the ER, preventing them from exerting their pro-apoptotic action at the mitochondria (166, 167). Bcl-2 and Bcl-xL can also interact with the ER membrane protein p28Bap31, which in turn associates with pro-caspase-8 and possibly modulates its activation (168). Perturbations of Ca^{2+} homeostasis and acute Ca^{2+} release from the ER promote apoptotic cell death (169-173). Close contacts exist between mitochondria and the sites of ER Ca^{2+} release, such that depletion of ER Ca^{2+} stores rapidly leads to Ca^{2+} accumulation in the mitochondria (174, 175). Elevated mitochondrial Ca^{2+} uptake is a condition that promotes cytochrome c release and favours apoptosis (176, 177). Overexpression of Bcl-2 has been shown to upregulate SERCA-2 expression, a Ca^{2+} transporter that pumps the Ca^{2+} back into the ER, and Bcl-2 might also modulate SERCA function directly through protein-protein interactions, thus favouring cell survival (178). Bcl-xL also localizes to the ER and presumably inhibits apoptosis caused by ER Ca^{2+} depletion after transfection of cells with the ryanodine receptor (the ER Ca^{2+} channel) or ryanodine treatment (179). A recent study has suggested that pro-apoptotic Bax and Bak modulate ER Ca^{2+} fluxes and sensitised the mitochondria to cytochrome c release induced by emptying of the ER Ca^{2+} pool (180). A significant fraction of the BH3-only Bik has been shown to localise to ER membranes, where it seems to stimulate mitochondrial release of cytochrome c through a Bax-independent mechanism that will need further clarifications (181). Apoptosis may also be regulated at the level of the ER via caspase-12 (described only in mice and whose human orthologue remains elusive), which is activated following ER stress and elevation of intracellular Ca^{2+} (182, 183).

Nuclear DNA damage is a well-known initiator of apoptotic cell death (184, 185). The ATM kinase and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) are the sensors of DNA double-stranded breaks, while ultraviolet-induced DNA damage is rather sensed by ATR kinase. All these kinases, as well as the downstream DNA-damage-induced kinases Chk1 and Chk2, can phosphorylate p53 within its amino terminus, leading to an increase in p53 transactivating function and/or to inhibition of p53 binding to MDM2, preventing its degradation (186). The p53 protein may promote apoptosis via several mechanisms: p53 inhibits the expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, and induces the expression of pro-apoptotic Bax, Noxa and Puma (88, 94, 186). Bcl-2 has been shown to be associated with the outer membrane of the nuclear envelope as well as the nuclear pore complexes (110). At the nuclear level, Bcl-2 has been proposed to protect cells from death by affecting the nuclear translocation of p53, thus modulating p53-dependent apoptosis (187, 188). Nuclear Bcl-2 can also favour cell survival either directly or in association with other proteins to form a channel-like complex that promotes elevation of glutathione concentration in the nucleus, which in turn protects against caspase activity and nuclear apoptosis (189-191). The ability of Bcl-2 to reduce Ca^{2+} uptake into isolated nuclei (192) and to affect protein transport through pores of the nuclear envelope (188) also suggests apoptosis modulation. Recently, Bcl-2 and Bax have been found in association with proteins of the nuclear matrix in interphase nuclei, indicating a

role for cell division (193-195). Finally, a recent report has shown Bcl-xL binding to cdc2/cdk1-cyclinA/B1 complexes, inhibiting their kinase activities in response to DNA damage, highlighting a functional link between cell cycle checkpoints and apoptosis (196, 197).

Oxidative stress is generally associated with mitochondrial permeability transition (36), but also greatly affects lysosome homeostasis. Iron-catalysed oxidation within the lysosomal compartment may lead to lysosomal leakage and even membrane rupture (198-200). While severe oxidative stress with complete collapse of the lysosomes is generally associated with necrotic death, moderate lysosomal rupture might instead initiate apoptosis (201-208). The link between lysosome and apoptosis has been reinforced by the finding that the release of mitochondrial cytochrome c is often secondary to lysosomal destabilisation, especially in cells undergoing oxidative insult (200, 209-211). The release of lysosomal hydrolytic enzymes, such as the various cathepsins, into the cytosol after the rupture of lysosomes may lead to proteolytic activation of the pro-caspases and subsequent apoptosis (202, 206, 211-215). It is not clear whether the lysosomal cathepsins are directly responsible for the activation of caspases (213, 214), or if other intermediary molecules lie between lysosomal enzymes and caspase activation. Indeed, Stoka et al. (216) have recently shown that the BH3-only Bid protein is a lysosomal protease target. They demonstrated Bid cleavage in the presence of lysosomal extracts, producing a truncated Bid fragment with similar mitochondrial translocation properties of the tBid generated by caspase-8 activity, thus connecting lysosomal destabilisation to cytochrome c release and mitochondrial apoptosis. Another group has proposed the existence of novel activating proteases, called lysoapoptases, that are activated by cathepsins within the lysosomal compartment, then translocate into the cytosol where they process and activate procaspase-3 (215). Anti-apoptotic Bcl-2 seems to also exert its cell survival function at the level of lysosomes. It has been shown that Bcl-2 overexpression prevents lysosomal destabilisation and rupture, thus protecting cells from death (217). Even though localisation of the Bcl-2-like proteins within the lysosomal membrane has never been reported to date, it is becoming clear that these proteins can also regulate apoptosis via modulation of lysosomal events through mechanisms that will need further understanding.

Post-translational modifications of the Bcl-2 protein family

Phosphorylation

The BH3-only protein Bad is a key mediator of apoptosis after growth factor deprivation (218). The function of Bad is regulated primarily by phosphorylation/dephosphorylation events (219). When trophic factors such as interleukin-3 (IL-3), platelet-derived growth factor, nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 are present in sufficient amounts in the cell, they bind to their growth factor or cytokine cell-surface receptors, and intracellular phosphatidylinositide-3'-OH kinase (PI3K) becomes activated. This results in the generation of two second messenger molecules (PI-3,4-P₂ and PI-3,4,5-P₃) that activate the serine/threonine kinase Akt, which in turn phosphorylates Bad on Ser-136 (219-221), while mitochondria-anchored protein kinase A, activated via a mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, phosphorylates Bad on Ser-112 (222). The 14-3-3 protein is then recruited to the diphosphorylated Bad molecule and sequesters Bad in the cytosol, preventing Bad from binding to and inhibiting pro-survival proteins

such as Bcl-xL, which protect cells from apoptosis (219, 220, 223). The interaction between 14-3-3 and Bad promotes the exposure of Ser-155, a critical residue of Bad located within the α helix of the BH3-domain, which also becomes phosphorylated via MAPK signaling (224-228). Phosphorylation of the BH3 domain of Bad permanently blocks the ability of Bad to bind to Bcl-xL, and consequently inhibits Bad-mediated cell death (224). The triphosphorylated Bad, therefore, represents the fully inactive form, which cannot translocate to mitochondria and inhibit anti-apoptotic Bcl-2-like proteins. The phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) has been shown to prevent Fas-induced apoptosis in T lymphocytes (229) probably through the activation of protein kinase C (PKC)- ϵ , - θ and to a lesser extent - α isoforms, which in turn induce Bad phosphorylation at Ser-112 via activation of MAPK-activated p90 ribosomal S6 kinase (Rsk) (230), another kinase family responsible for the phosphorylation and inactivation of Bad. A study has demonstrated that PKC- θ can directly phosphorylate Bad at Ser-112 and Ser-136, protecting cells from Fas-mediated apoptosis. Fas ligation can in turn cause caspase-mediated PKC- θ cleavage and proteasome-mediated degradation of the PKC- θ catalytic fragment, which leaves Bad unphosphorylated and restores apoptosis (231). Recently, Ser-170 (located close to the BH3 motif) has been shown to be a new phosphorylation site of murine Bad. Ser-170 phosphorylation by a still unknown kinase correlates with cell survival, even though it does not prevent Bad/Bcl-xL heterodimerisation and may instead promote association with 14-3-3 (232). The cell cycle-regulated protein kinase Cdk1, whose activity is stimulated upon the suppression of neuronal activity in the rat cerebellum, has been shown recently to induce Bad phosphorylation at Ser-128, which lies near the growth factor-regulated site of phosphorylation, Ser-136. The phosphorylation of Ser-128 seems to inhibit the sequestration of Bad by 14-3-3 and thus promotes the apoptotic death of rat postmitotic neurons (233).

In the absence of growth factors, Bad is dephosphorylated, its BH3 domain binds to and inactivates anti-apoptotic Bcl-2 family members at the OMM, which promotes the mitochondrial pathway of apoptosis. Calcineurin, a calcium-dependent phosphatase also called protein phosphatase 2B (PP2B), is capable of dephosphorylating Bad at both Ser-112 and Ser-136, resulting in Bad dissociation from 14-3-3 and translocation to the mitochondria, where it induces apoptosis (234). This is one way by which elevated intracellular Ca^{2+} favours cell death. Additional enzymes, such as protein phosphatase 1 α (PP1 α) and protein phosphatase 2A (PP2A), have been shown to dephosphorylate Bad and promote apoptosis (235, 236). Further studies have demonstrated that PP1 α is targeted to Bad by the anti-apoptotic Bcl-2 in IL-2-stimulated cells (237), and by Bcl-xL and Bcl-w in IL-4-stimulated cells (238), forming Bcl-like/PP1 α /Bad trimolecular complexes that seem to be involved in the control of apoptosis. Bad may also be a downstream target within the ceramide apoptotic pathway: ceramide signals sequentially through kinase suppressor of Ras/ceramide-activated protein kinase, Ras, Raf-1 and MEK1, which leads to inactivation of Akt, dephosphorylation of Bad at Ser-136, and subsequent apoptosis (239).

The BH3-only Bid protein may also be regulated by phosphorylation. It has been reported recently that in some cell types, the Ser/Thr casein kinase I (CKI) and II (CKII) can phosphorylate residues flanking the caspase-8 cleavage site of Bid, which seem to impede proteolysis of Bid by caspase-8 (240). The finding suggests that Bid must be

dephosphorylated after Fas (or other death ligand) activation in order to be cleaved by caspase-8 and efficiently connect activation of the death receptor pathway to mitochondrial apoptosis. Bik is another BH3-only protein for which phosphorylation events have been reported. The phosphorylation of Bik on Thr-33 and/or Ser-35 by a CKII-related enzyme appears to be required for efficient Bik-mediated cell death (241). Unlike Bad and Bid, phosphorylation of Bik therefore enhances its pro-apoptotic function.

Phosphorylation is a crucial event in the regulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein function. Two distinct pathways of Bcl-2 phosphorylation have been reported: the first one occurs during cytokine signaling and leads to the increased pro-survival function of Bcl-2, while the second pathway is linked to mitosis and rather causes Bcl-2 inhibition (242, 243). In cytokine-dependent cell lines, IL-3 mediates phosphorylation of Bcl-2 on Ser-70 (located within the loop domain) which increases its anti-apoptotic function (244, 245). The PKC agonist bryostatin-1 (bryo-1) (246), retinoic acid (247) and aurintricarboxylic acid (248) can also provoke Bcl-2 phosphorylation and favour cell survival. Members of the classical PKC family (α , β I, β II and γ) are the most likely candidates to account for Bcl-2 phosphorylation (244, 245). It has been shown that ERK/MAPK are activated by IL-3 and can also phosphorylate Bcl-2 on Ser-70, in a PKC-independent manner (248-250). Phosphorylation of Bcl-2 on Ser-70 does not alter the proteins half-life, but instead seems to directly influence Bcl-2 function (245). Insulin receptor substrate (IRS) is a docking protein that couples growth factor receptors to various effector molecules such as PI3K. A study has reported that growth factor signaling may promote cell survival through association of IRS-1 with the loop domain of Bcl-2, enhancing Bcl-2 anti-apoptotic function possibly via modulation of Bcl-2 phosphorylation (251). Phosphorylation of Bcl-2 at the unique site of Ser-70 therefore enhances its anti-apoptotic activity.

In contrast, the treatment of cells with antimitotic agents, such as paclitaxel (taxol), vincristine, dolistatin and vinblastine, which inhibit microtubule dynamics and lead to mitotic arrest (252), was also shown to induce Bcl-2 hyperphosphorylation at multiple residues (Thr-69, Ser-70 and Ser-87) within the unstructured loop domain of the protein, resulting in inhibition of Bcl-2 anti-apoptotic function and increased susceptibility to cell death (253-260). Bcl-2 phosphorylation is also associated with normal mitotic progression, where it may participate in the regulation of M phase-specific events (261, 262). Studies have demonstrated that taxol-induced Bcl-2 phosphorylation does not involve PKC or ERK/MAPK (257, 259), but seems tightly coupled with hyperphosphorylation of numerous proteins, including Raf-1 kinase (258). A further study has shown that Raf-1 hyperphosphorylation after vinblastine treatment did not lead to activation, but rather to inactivation of Raf-1 enzymatic activity, and that a JNK-dependent pathway is responsible for vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2, which occurs in parallel with inactivation of Raf-1/MEK/ERK (263). A recent report has demonstrated that after treatment of cells with antimicrotubule agents, Ser/Thr mTOR kinase is activated and might be included in the kinase cascade that links damaged microtubules to multisite phosphorylation of Bcl-2 and cellular apoptosis (264). The mechanism by which the Kaposi sarcoma herpesvirus induces the apoptosis of infected cells also seems to involve Bcl-2 phosphorylation. Indeed, v-cyclin-CDK6 mediates phosphorylation of cellular Bcl-2 on Ser-70 and Ser-87, inactivating its anti-apoptotic

function (265). In conclusion, multisite phosphorylation of Bcl-2 within the loop domain seems to abolish its anti-apoptotic function and promote cell death, while monophosphorylated Bcl-2 on Ser-70 rather possesses an increased ability to protect cells from death. Regulation of Bcl-2 activity also involves a phosphatase, PP2A, which has been shown to co-localise with Bcl-2 at the mitochondrial membrane (266). PP2A can dephosphorylate Ser-70 of Bcl-2, reversing the effect of IL-3 or bryo-1, and abolishing the ability of Bcl-2 to protect cells from apoptosis (266). The apoptotic agent ceramide has been reported to be a potent activator of PP2A, thus promoting dephosphorylation of Bcl-2 and subsequent cell death (267). Bcl-2 phosphorylation at Ser-70 is thus a dynamic process regulated by the sequential action of Bcl-2 kinases and phosphatases. If favourable growth and survival conditions are achieved, Bcl-2 is phosphorylated on Ser-70 and promotes cell survival, while death-inducing conditions such as ceramide production rather cause Ser-70 dephosphorylation and cell death. Because physiologic or drug-induced microtubule dysfunction during mitosis leads to multisite phosphorylation of Bcl-2, which in this case inhibits its anti-apoptotic function and promotes apoptosis, Bcl-2 has been proposed to be the guardian of the fidelity of chromosome segregation (257, 268), analogous to p53, the guardian of DNA integrity.

Like Bcl-2, the activity of anti-apoptotic Bcl-xL and Mcl-1 is also regulated through phosphorylation (269, 270). Cell exposure to microtubule-active drugs also leads to Bcl-xL phosphorylation on its unstructured loop domain and subsequent inhibition of the anti-apoptotic function of Bcl-xL (270), while complete deletion of the loop domain in Bcl-xL has been shown to increase its anti-apoptotic function (271). Analogous to Bcl-2 phosphorylation, a JNK-dependent cascade seems to be involved in phosphorylation of Bcl-xL (263). DNA damage induction by ionizing radiation (IR) have been shown to cause activation and mitochondrial translocation of stress-activated protein kinase (SAPK/JNK). SAPK then associates with Bcl-xL and phosphorylates the anti-apoptotic protein on Thr-47 and Thr-115, which abrogates the cell survival function of Bcl-xL and favours IR-induced apoptosis (272). However, phosphorylation of Bcl-xL in hen ovarian follicles has been reported to correlate with its anti-apoptotic function (273). Similar to Bcl-2, PKC activation by cytokine signaling and microtubule-damaging drug treatment leads to Mcl-1 phosphorylation (274). Mcl-1 undergoes ERK-associated phosphorylation after TPA treatment, which does not alter the electrophoretic mobility of Mcl-1, while ERK-independent phosphorylation of Mcl-1 correlates with mobility shifts and is induced by mitotic arrest or PP1/2A inhibitors (269).

Proteolytic cleavage and myristoylation

Caspase-8 is the key mediator of the *extrinsic* apoptotic pathway. After its recruitment to a DISC complex and its autoproteolytic activation, caspase-8 initiates a cascade of caspase activation by directly cleaving and activating downstream caspases. In certain types of cells (type I), such as the B lymphoblastoid SKW6.4 cell line and the TH9 cell line, enough activated caspase-8 molecules are produced after death receptor activation to directly process and activate downstream effector caspases and lead to apoptosis (39). In type II cells such as hepatocytes, T Jurkat and CEM cells (and probably most cell types), caspase-8 activation cannot achieve a sufficiently high level to directly activate effector caspases. The apoptotic signal thus needs to be amplified through the mitochondrial pathway with the help of BH3-only Bid protein (39). Upon

activation of the cell surface death receptors, Bid is cleaved by caspase-8 to generate a N-terminal truncated Bid fragment (tBid) which translocates from the cytosol to the mitochondria where it triggers cytochrome c release in a BH3-dependent manner, connecting the *extrinsic* pathway to mitochondrial apoptosis (37, 38, 275). One of the mitochondrial targets of tBid seems to be cardiolipin, a mitochondria-specific lipid, which is specifically bound by a previously unknown three-helix domain (helices 4, 5 and 6) within tBid (276). tBid can also undergo myristoylation of a glycine residue that becomes exposed in its N-terminus after cleavage by caspase-8. This second post-translational modification greatly enhances the mitochondrial targeting efficiency of tBid (277). Espoti et al. (278) have recently proposed that tBid is involved in the transport and recycling of mitochondrial phospholipids. They have suggested that tBid mitochondrial targeting depends upon this lipid transfer activity, by which tBid specifically interacts with certain phospholipids and transports them to the mitochondria (278). Once cleaved, how does tBid induce apoptosis? tBid has been reported to possess a stronger affinity for Bcl-xL than the full-length Bid, thus being a more potent inhibitor of Bcl-xL anti-apoptotic activity (37). Bid cleavage may induce a conformational change that makes the BH3 domain of tBid more accessible to heterodimerisation with Bcl-xL or Bax (134). tBid insertion within the mitochondrial membrane may also cause BH3-independent membrane destabilisation with subsequent mitochondrial permeabilisation and apoptosis (143, 144).

Recently, the molecular mechanisms by which tBid triggers mitochondrial apoptosis have been further elucidated. A first study has reported that tBid, by binding to Bax, is capable of inducing a conformational change in Bax that exposes the Bax N-terminus and allows Bax insertion and oligomerisation within the mitochondrial membrane (107). Once at the mitochondria, Bax may stimulate mPTP opening and/or participate in the formation of the putative cytochrome c channel, even though Roucou et al. (279) have recently reported that tBid alone is not able to induce Bax oligomerisation or the formation of cytochrome c-permeable channels in artificial lipid membranes, suggesting cooperation of tBid with another protein to account for the tBid-induced Bax oligomerisation that Eskes et al. observed in isolated mitochondria (107). Similarly, Wei et al. (106) later proposed that after insertion of tBid in the mitochondrial membrane, the BH3 domain of tBid remains on the mitochondrial surface where it induces a conformational change and oligomerisation of pro-apoptotic Bak. Oligomerised Bak could then provide a pore to allow cytochrome c release (106). In contrast, another study has reported that tBid homooligomerisation occurs within the mitochondrial membrane and that these tBid oligomers are sufficient by themselves to induce cytochrome c release, caspase activation and apoptosis, without causing Bax or Bak activation (280).

Proteolytic cleavage of Bid is not only attributed to caspase-8 activity. Bid can also be cleaved by effector caspase-3 in the intrinsic pathway, providing an amplification loop to further destabilise mitochondria, even after activation of the effector caspases (281, 282), or by caspase-2, linking its activation upstream of the mitochondrial apoptotic pathway (44, 45). Granzyme B, a serine protease contained in cytotoxic T lymphocytes (CTL) and released after an apoptotic signal triggered by engagement of the cell surface Fas receptor (283, 284), can efficiently process the Bid molecule (285) as well as several caspases (286, 287), mediating the apoptotic death of CTL targets. Some groups have demonstrated that Bid may also be cleaved by the calpains, calcium-

dependent cysteine proteases that can be activated after diverse cellular insults, to produce a truncated Bid with similar mitochondrial translocation properties of the caspase-8-cleaved Bid (288-292). Such a truncated Bid fragment seems to be also generated in the presence of lysosomal extracts, suggesting cleavage by the lysosomal protease cathepsins (216). Bid cleavage may, therefore, constitute a strong means of modulating diverse apoptotic pathways.

The multidomain Bax protein may also be a target for proteolysis. In a model of drug-induced apoptosis in HL-60 cells, the cleavage of full-length 21-kDa Bax has been shown to be mediated by calpains rather than by caspases (288, 289), to generate a Bax fragment of 18-kDa which possesses increased cell death activity at the mitochondria (293). A study has reported caspase-mediated cleavage of pro-apoptotic Bad after triggering of the *extrinsic* apoptotic pathway in Jurkat T cells, to generate a 15-kDa truncated Bad fragment that is a more potent inducer of apoptosis than the wild-type protein (294). Proteolytic cleavage of anti-apoptotic Bcl-2 family members has also been described. During apoptosis of the IL-2-dependent murine T cell clone CTLL-2, the Bcl-xL molecule undergoes cleavage by caspase-3-like enzymes at two sites within its loop domain, to generate two 18-kDa Bcl-xL fragments, which result in accelerated apoptotic death (295). Caspase-mediated cleavage of Bcl-2 also occurs in myeloid leukemia cells that undergo chemotherapy-induced apoptosis and result in the attenuation of Bcl-2 anti-apoptotic function and subsequent cell death (296). Until now, proteolytic cleavage of pro-apoptotic protein seems to enhance their death-promoting activities and favours apoptosis, while cleavage of their anti-apoptotic counterparts rather inhibits pro-survival function, also resulting in apoptosis.

Conformational changes

Subcellular localisation, oligomerisation potential and overall function of certain Bcl-2 family members are highly influenced by protein structural conformation. Multidomain Bax is the most studied protein in regard to the structural modifications that affect its pro-apoptotic behaviour. Bax is known to be a cytosolic protein in healthy living cells that translocates to the mitochondria upon induction of apoptosis (112, 114, 297). Mitochondrial relocalisation of Bax is a rapid process that occurs during the early phases of apoptosis (297). The C-terminal hydrophobic transmembrane segment appears to be important in Bax relocalisation since its deletion alters the ability of Bax to insert into the mitochondrial membrane (297). Further mutational studies have suggested involvement of the Bax N-terminus as well, proposing a model where the dissociation between the N- and C-termini of Bax is an essential early step in apoptosis induction (298, 299). Thus, the resolution of Bax three-dimensional structure has provided a better understanding of Bax structural modifications as well as molecular mechanisms by which these may occur (300). When Bax lies in its inactive cytosolic conformation, its BH3 and TM ($\alpha 9$ helix) domains are masked within the hydrophobic core of the protein, while the residues containing the hydroxyl groups are exposed and provide Bax solubility in the cytosol. The C-terminal $\alpha 9$ helix must then dissociate from the hydrophobic pocket to allow Bax insertion within the mitochondrial membrane (300). The death agonist tBid, which can directly interact with Bax via its BH3 domain, seems to induce structural Bax modification leading to the exposure of N-terminal residues (107, 301). This conformational change at the N-terminus then permits the $\alpha 9$ helix to

disengage from the hydrophobic pocket and allows subsequent insertion of Bax within the mitochondrial membrane (300). The BH3 domain must also be released from the hydrophobic core in order to confer cell-killing activity to Bax. Indeed, Bax heterodimerisation and/or oligomerisation require exposure of the BH3 motif since it is this domain that provides protein-protein interaction. In addition to inducing Bax insertion in the OMM, tBid has been shown to also trigger Bax oligomerisation (107). The Bax $\alpha 2$ helix, located in the BH3 domain, contains hydrophobic side chains that initially face the hydrophobic core of the protein and must be reoriented toward the cytosol in order to provide binding abilities to the BH3 domain (100, 300). Bid might be capable of inducing such important rearrangements in the Bax molecule, and this may occur subsequently to release of the $\alpha 9$ helix from the hydrophobic pocket. In addition, Bid is also responsible for allosteric activation of Bak, followed by Bak oligomerisation within the mitochondrial membrane, possibly through a similar mechanism (106). In contrast, anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL rather inhibit insertion and oligomerisation of Bax in the OMM, neutralising the death-inducing activity of Bax (103, 302, 303). Nechushtan et al. (304) recently reported that during apoptosis of staurosporine-treated COS-7 and HeLa cells, immediately after Bax insertion within the mitochondrial membrane, Bax rapidly leaves the membrane to form huge mitochondria-associated clusters that may well contain several thousands of Bax molecules and whose formation is inhibitable by Bcl-xL. They also demonstrated that Bak colocalises with Bax in these clusters, and that cluster formation could contribute to mitochondrial apoptosis (304).

Because Bax insertion in the mitochondrial membrane has been described in Bid-deficient cells (305), other BH3-only proteins may be responsible for the translocation and oligomerisation of Bax within the mitochondrial membrane. Indeed, a recent study by Yamaguchi and Wang (306) demonstrates that Bim-EL induces Bax conformational change by a heterodimerisation-independent mechanism inhibitable by anti-apoptotic Bcl-xL. According to recent evidence, the pro-apoptotic behaviour of the Bak molecule is very similar to Bax function in regard to apoptosis induction. Studies have shown that both multidomain proteins are essential to cell death induced by a variety of apoptotic stimuli, and seem to function in a somewhat redundant fashion, downstream of the BH3-only members (103, 104, 307-309). By targeting Bax and Bak, the BH3-only activating death agonists are capable of inducing crucial conformational changes within the multidomain proteins that constitute the first step towards mitochondrial permeabilisation and apoptosis.

Subcellular sequestration

As described in the preceding section, relocalisation of Bax from the cytosol to the mitochondria is highly dependent on the induction of conformational changes by other death agonists. Bax subcellular movements may also be modulated by distinct kinase cascades. Detachment of a cell from the extracellular matrix has been shown to induce rapid translocation of Bax to the mitochondria, accompanied by conformational changes within Bax that exposes its BH3 domain (310). In that case, the tyrosine kinase pp125FAK (*focal adhesion kinase*), a central molecule for integrin-mediated signaling, seems to be responsible for the initiation of a PI3K cascade that leads to Bax activation (310). Recently, Tsuruta et al. (311) have shown that the PI3K-Akt pathway, which regulates Bad pro-apoptotic function after growth factor signaling (*see section on Bad*

phosphorylation), also modulates Bax movements between the cytosol and the mitochondria. They found that PI3K activity retains Bax in the cytosol and that Akt is capable of inhibiting Bax translocation to the mitochondria (311). In addition to modulating Bad activity, the growth factor-activated PI3K-Akt pathway, therefore, promotes cell survival through sequestration of Bax in the cytosol. A study has also reported that p38 MAPK activity plays a crucial role during nitric oxide-mediated cell death by facilitating Bax translocation to the mitochondria (312). Aside from the kinase pathways, a co-activator of the subcellular redistribution of Bax may also exist. Peg3/Pw1 protein, induced during p53-mediated apoptosis, is one candidate that might act as the so-called modulator of Bax movements (313). It has been proposed that Peg3/Pw1 may either directly or indirectly act on Bax to induce dimerisation or conformational changes which precede Bax relocalisation to the mitochondria (313). A second putative modulator is Bif-1, a novel Bax-binding protein that could also induce conformational changes in Bax and subsequent mitochondrial targeting (314). A negative regulator of Bax redistribution has been also described. 14-3-3 σ , a p53 target that mediates, in part, DNA damage-induced G2 arrest of the cell cycle, prevents apoptosis apparently through association and sequestration of pro-apoptotic Bax (315). Recently, Werner et al. (316) have shown that anti-apoptotic A1/Bfl-1 binds and sequesters tBid, preventing the death agonist from translocating to and activating the pro-apoptotic Bax and Bak. Bag-1 protein, which shares no significant homology with the Bcl-2 protein family, directly interacts with Bcl-2 and apparently cooperates to suppress apoptosis and prolong cell survival (317). It has been shown later that Bag-1 is an activator of the Raf-1 kinase (318), known at that time to also cooperate with Bcl-2 to prevent apoptosis (317). Similarly, Bis, another Bcl-2-interacting protein, appears to synergise the anti-apoptotic activity of Bcl-2 after a variety of death stimuli (319).

Lipid rafts are sphingolipids, cholesterol and ceramide-enriched microdomains within the plasma membrane of many cell types (320, 321). These rafts are involved in the signaling pathway of B cell activation (322-324), and the clustering of Fas within lipid rafts appears to be a prerequisite for death receptor signaling and subsequent cell death (320, 325). Recently, BH3-only Bad has been shown to be attached to lipid rafts in IL-4-stimulated cells (326). When cells are subsequently deprived of IL-4, Bad dissociates from the lipid rafts and translocates to the mitochondria, resulting in apoptotic cell death (326). In addition, from their results, Ayllón et al. (326) have suggested that the pro-apoptotic function of Bad is not modulated by association with 14-3-3, but rather by the IL-4-regulated movements of Bad between plasma membrane lipid rafts and the mitochondria.

The death-inducing activities of BH3-only Bim are also regulated by subcellular sequestration. Three major isoforms of Bim (Bim-EL, Bim-L and Bim-S) were first described with Bim identification and characterisation (82, 87), but several novel isoforms have been discovered recently, including Bim α 1, Bim α 2, Bim β 1, Bim β 2, Bim β 3, Bim β 4 (327), Bimy (328) and BimAD (329). The three major Bim isoforms all promote apoptosis but differ in killing potency, Bim-S being the strongest cell-death inducer (87, 330, 331). Particular subcellular localisations of Bim-EL, -L and -S are responsible for these differences in cell death-inducing potential. In healthy living cells, Bim-EL and -L are sequestered to cellular microtubule complexes by binding to the dynein light chain LC8 (115). Certain apoptotic stimuli, such as growth factor

withdrawal, calcium ion flux and microtubule perturbation, disrupt the interaction between LC8 and the dynein motor complex, releasing Bim-EL and -L, which translocate together with LC8 to the mitochondria where they cause apoptosis. Because Bim-S does not interact with LC8, it is not sequestered to the cytoskeleton which may explain its increased ability to induce cell death (115). A recently- discovered BH3-only member, Bmf, is also attached to myosin V motors by binding to dynein light chain LC2. Cellular insults, such as a loss of cell attachment (anoikis), unleash Bmf from cytoskeletal structures, allowing it to translocate and bind pro-survival Bcl-2 proteins (89). Sequestration to microtubular complexes, therefore, represents a negative physiological regulator of Bim and Bmf pro-apoptotic activities.

Ubiquitination

The ubiquitination/proteasome pathway plays a major role in the degradation of cellular proteins involved in diverse cellular processes, including cell death regulation (332-334). One of the first steps in this process is the attachment of a small ubiquitin moiety to a lysine residue of an acceptor protein, which becomes targeted for degradation by the proteasome complex after several successive rounds of ubiquitylation. Findings that apoptosis is induced after treatment with proteasome inhibitors in a variety of cancer and transformed cell lines have suggested that the activities of some effectors and/or regulators of apoptosis might be modulated by the ubiquitin/proteasome system (335-338). Indeed, further studies have demonstrated that some Bcl-2 family members are post-translationally regulated by proteasomal activities. The pro-apoptotic Bax protein, a direct target of the ubiquitin/proteasome system, has been shown to accumulate after proteasome inhibition in Jurkat T cells (339); ubiquitin-mediated degradation of the death agonist tBid has been observed in COS-7 cells (340), and rapid stabilisation and accumulation of the BH3-only Bik at the mitochondria have been reported in T and B cells upon inhibition of proteasomal activities (338). The oncoprotein human papillomavirus E6 proteins inhibit apoptosis in differentiating keratinocytes, apparently through the association of ubiquitin-ligase-E6-associated protein with pro-apoptotic Bak, resulting in the proteasomal degradation of Bak and subsequent cell survival (341). A proteasome-dependent pathway is also involved in the degradation of anti-apoptotic Bcl-2 during mitotic arrest caused by microtubule damage (342). Breitschopf et al. (343) have demonstrated that dephosphorylation of Ser-87 (which becomes phosphorylated after inhibition of microtubule dynamics, (*see section on Bcl-2 phosphorylation*)) within Bcl-2 represents a signal for its ubiquitin-dependent degradation. A further study has shown that only the non-phosphorylated form of Bcl-2 is sensitive to proteasomal degradation, while the phosphorylation of Bcl-2 confers protection against degradation, suggesting that Bcl-2 phosphorylation may provide a survival advantage for the cell after damage to microtubules (344). The ubiquitin/proteasome system, therefore, significantly influences the delicate balance between pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, and represents one more way of modulating the apoptotic outcome.

Conclusion

Proteins of the Bcl-2 family are key regulators of apoptosis, participating in the integration and modulation of multiple survival and death signals. Bcl-2-like proteins

may act alone or in concert with other family members and/or with distinct proteins to either perturb or protect cellular organelles, especially the mitochondria. By targeting the OMM, pro-apoptotic Bcl-2 family members can induce the release of apoptogenic factors in the cytosol, connecting various death-inducing stimuli to mitochondrial apoptosis, while their anti-apoptotic counterparts rather act to preserve mitochondrial homeostasis and promote cell survival. Bcl-2-like proteins are also involved in the modulation of other apoptotic pathways, such as those induced after ER and lysosomal stresses. While we are beginning to better understand the molecular mechanisms by which Bcl-2-like proteins affect the mitochondria, much remains to be discovered about the action of these proteins at the ER, nuclear and lysosomal levels. Cross-talk between cellular organelles seems to be necessary to ensure perfect integration of the multiple death pathways, but how such good communication is achieved at the molecular level remains a critical question. The subcellular translocation properties of some members of the Bcl-2 family may provide a part of the answer, although there is still much obscurity around the molecular mechanisms by which a protein can travel from one site to another within a cell. Recent findings that several Bcl-2-like proteins undergo various post-translational modifications that greatly impact on their function as well as on their subcellular localisation have shed light on how proteins of the Bcl-2 family undergo inter-organellar traveling. Because Bcl-2-like proteins are major regulators of multiple death pathways, they represent attractive targets in the development of new therapeutic drugs for the treatment of several disorders in which the apoptotic program has become defective. Even though much has been resolved about the mechanisms of action of Bcl-2-like proteins in the last several years, a better understanding is still required to efficiently target them.

Acknowledgments

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society to R.B. R.B. is a research scholar of Fonds de la recherche en santé du Québec. C.P. obtained a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. The authors acknowledge the editorial work of Mr Ovid Da Silva (Research Centre of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal) on this manuscript.

References

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*. 26: 239-257, 1972.
2. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*. 267: 1456-1462, 1995.
3. Rudin, C. M. and Thompson, C. B. Apoptosis and disease. Regulation and clinical relevance of programmed cell death, *Ann Rev Med*. 48: 267-281, 1997.
4. Schwartzman, R. A. and Cidlowski, J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death., *Endocrine Rev*. 14: 133-151, 1993.
5. Hengartner, M. O., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death, *Nature*. 356: 494-496, 1992.
6. Yuan, J. and Horvitz, H. R. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death, *Development*. 116: 309-320, 1992.

7. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, R. The *c. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukine-1 β -converting enzyme, *Cell*. **75**: 641-652, 1993.
8. Conradt, B. and 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.
9. Del Peso, L., Gonzalez, V. M., and Nunez, G. *Caenorhabditis elegans* Egl-1 disrupts the interaction of Ced-9 with Ced-4 and promotes Ced-3 activation, *J Biol Chem*. **273**: 33495-33500, 1998.
10. Del Peso, L., Gonzalez, V. M., Inohara, N., Ellis, R. E., and Nunez, G. Disruption of the Ced-9:Ced-4 complex by Egl-1 is a critical step for programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*, *J Biol Chem*. **275**: 27205-27211, 2000.
11. Adams, J. M. and Cory, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends Biochem Sci*. **26**: 61-66, 2001.
12. Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 family: regulators of cell death, *Annu Rev Immunol*. **16**: 395-419, 1998.
13. Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family, *Nature*. **387**: 773-776, 1997.
14. Reed, J. C. Bcl-2 family proteins, *Oncogene*. **17**: 3225-3236, 1998.
15. Vander Heiden, M. G. and Thompson, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?, *Nat Cell Biol*. **1**: E209-E216, 1999.
16. Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins, *Oncogene*. **16**: 2265-2282, 1998.
17. Cory, S. and Adams, J. M. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer*. **2**: 647-656, 2002.
18. Bouillet, P. and 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.
19. Lutz, R. J. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins, *Biochem Soc Trans*. **28**: 51-56, 2000.
20. Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. Catalytic properties of the caspases, *Cell Death Differ*. **6**: 1054-1059, 1999.
21. Alnemri, E. S. Mammalian cell death proteases - a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases, *J Cell Biochem*. **64**: 33-42, 1997.
22. Cryns, V. and Yuan, J. Y. Proteases to die for, *Genes Dev*. **12**: 1551-1570, 1998.
23. Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ*. **6**: 1028-1042, 1999.
24. Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis, *Cell Death Differ*. **6**: 1067-1074, 1999.
25. 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. 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.
26. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A., and 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.
27. Cecconi, F. Apaf1 is no longer single, *Cell Death Differ*. **8**: 773-775, 2001.
28. Bouchier-Hayes, L. and Martin, S. J. CARD games in apoptosis and immunity, *Embo Rep*. **3**: 616-621, 2002.
29. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and 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.
30. Nagata, S. Apoptosis by death factor, *Cell*. **88**: 355-365, 1997.

31. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 269-290, 1999.
32. Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell.* 91: 443-446, 1997.
33. Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 96: 10964-10967, 1999.
34. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell.* 91: 479-489, 1997.
35. Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., and 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.
36. Green, D. R. and Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis, *Science.* 281: 1309-1312, 1998.
37. Li, H. L., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. Y. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell.* 94: 491-501, 1998.
38. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and 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.
39. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. Two Cd95 (Apo-1/Fas) signaling pathways, *Embo J.* 17: 1675-1687, 1998.
40. Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D. W., Lazebnik, Y., and Flavell, R. A. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation, *Nat Med.* 6: 1241-1247, 2000.
41. 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., and 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.
42. Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide, *J Biol Chem.* 275: 32438-32443, 2000.
43. Droin, N., Beauchemin, M., Solary, E., and Bertrand, R. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade, *Cancer Res.* 60: 7039-7047, 2000.
44. Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria, *J Biol Chem.* 277: 13430-13437, 2002.
45. Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization, *Science.* 297: 1352-1354, 2002.
46. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature.* 391: 43-50, 1998.
47. Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell.* 89: 175-184, 1997.
48. Earnshaw, W. C., Martin, L. M., and Kaufmann, S. H. Mammalian caspases, *Annu Rev Biochem.* 68: 383-424, 1999.
49. Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science.* 226: 1097-1099, 1984.
50. Clarke, M. L., Smith, S. D., and Sklar, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation, *Cell.* 47: 19-28, 1986.

51. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature*. *348*: 334-336, 1990.
52. Korsmeyer, S. J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death, *Blood*. *80*: 879-886, 1992.
53. McDonnell, T. J., Marin, M. C., Hsu, B., Brisbay, S. M., McConnell, K., Tu, S. M., Campbell, M. L., and Rodriguez-Villanueva, J. The bcl-2 oncogene: apoptosis and neoplasia, *Radiation Res*. *136*: 307-312, 1993.
54. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*. *355*: 440-442, 1988.
55. Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell*. *74*: 597-608, 1993.
56. Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I., and Shin, H. S. A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow, *Oncogene*. *11*: 1693-1698, 1995.
57. Das, R., Reddy, E. P., Chatterjee, D., and Andrews, D. W. Identification of a novel Bcl-2 related gene, Brag-1, in human glioma, *Oncogene*. *12*: 947-951, 1996.
58. Gibson, L., Holmgreen, S. P., Huang, D. C. S., Bernand, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sutherland, G. R., Baker, E., Adams, J. M., and Cory, S. Bcl-W, a novel member of the Bcl-2 family, promotes cell survival, *Oncogene*. *13*: 665-675, 1996.
59. Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, L., Koseki, T., Hu, Y. M., Chen, S., and Nunez, G. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death, *J Biol Chem*. *273*: 32479-32486, 1998.
60. Ke, N., Godzik, A., and Reed, J. C. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak, *J Biol Chem*. *276*: 12481-12484, 2001.
61. Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., and Craig, R. W. Mcl1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *90*: 3516-3520, 1993.
62. Lin, E. Y., Orlofsky, A., Berger, M. S., and Prystowsky, M. B. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2, *J Immunol*. *151*: 1979-1988, 1993.
63. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., and Bertrand, R. Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing anti-apoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase 9 activation, submitted, 2002.
64. Song, Q. Z., Kuang, Y. P., Dixit, V. M., and Vincenz, C. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1, *Embo J*. *18*: 167-178, 1999.
65. Zhang, H., Holzgreve, W., and De Geyter, C. Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway, *Hum Mol Genet*. *10*: 2329-2339, 2001.
66. Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak, *Nature*. *374*: 733-736, 1995.
67. Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., and Brown, R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K, *Nature*. *374*: 731-733, 1995.
68. Guo, B., Godzik, A., and Reed, J. C. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the bcl-2 family, *J Biol Chem*. *276*: 2780-2785, 2001.
69. Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. W. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *94*: 12401-12406, 1997.
70. Inohara, N., Ekhterae, D., Garcia, I., Carrio, R., Merino, J., Merry, A., Chen, S., and Nunez, G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-X-L, *J Biol Chem*. *273*: 8705-8710, 1998.

71. Kataoka, T., Holler, N., Micheau, O., Martinon, F., Tinel, A., Hofmann, K., and Tschopp, J. Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension, *J Biol Chem.* 276: 19548-19554, 2001.
72. Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D., and Barr, P. J. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak, *Nature.* 374: 736-739, 1995.
73. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell.* 74: 609-619, 1993.
74. Bae, J., Leo, C. P., Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J. Mcl-1S, a splicing variant of the antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain, *J Biol Chem.* 275: 25255-25261, 2000.
75. Bingle, C. D., Craig, R. W., Swales, B. M., Singleton, V., Zhou, P., and Whyte, M. K. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death, *J Biol Chem.* 275: 22136-22146, 2000.
76. Boyd, J., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L., Schaeper, U., Elangovan, B., and Chinnadurai, G. E1B 19 KDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular protein, *Cell.* 79: 341-351, 1994.
77. Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., and Chinnadurai, G. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins, *Oncogene.* 11: 1921-1928, 1995.
78. Chen, G., Cizeau, J., Velde, C. V., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., and Greenberg, A. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins, *J Biol Chem.* 274: 7-10, 1999.
79. Han, J., Sabbatini, P., and White, E. Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1b 19k, *Mol Cell Biol.* 16: 5857-5864, 1996.
80. Han, J., Flemington, C., Houghton, A. B., Gu, Z., Zambetti, G. P., Lutz, R. J., Zhu, L., and Chittenden, T. Expression of Bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 98: 11318-11323, 2001.
81. Hegde, R., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist, *J Biol Chem.* 273: 7783-7786, 1998.
82. Hsu, S. Y., Lin, P., and Hsueh, A. J. W. Bod (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members, *Mol Endocrinol.* 12: 1432-1440, 1998.
83. Imaizumi, K., Morihara, T., Mori, Y., Katayama, T., Tsuda, M., Furuyama, T., Wanaka, A., Takeda, M., and Tohyama, M. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the Bcl2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein, *J Biol Chem.* 274: 7975-7981, 1999.
84. Inohara, N., Ding, L. Y., Chen, S., and Nunez, G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X-L, *Embo J.* 16: 1686-1694, 1997.
85. Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., and Nakamura, Y. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (Bnip3l) encoding a protein homologous to human Nip3, *Genes Chromos Cancer.* 21: 230-235, 1998.
86. Nakano, K. and Vousden, K. H. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell.* 7: 683-694, 2001.
87. O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., and Huang, D. C. S. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis, *Embo J.* 17: 384-395, 1998.

88. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science*. 288: 1053-1058, 2000.
89. Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis, *Science*. 293: 1829-1832, 2001.
90. Tan, K. O., Tan, K. M. L., Chan, S. L., Yee, K. S. Y., Bevort, M., Ang, K. C., and Yu, C. Y. MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains, *J Biol Chem*. 276: 2802-2807, 2001.
91. Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes Dev*. 10: 2859-2869, 1996.
92. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell*. 80: 285-291, 1995.
93. Yasuda, M., Han, J. W., Dionne, C. A., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. BNIP3 alpha: A human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3, *Cancer Res*. 59: 533-537, 1999.
94. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells, *Mol Cell*. 7: 673-682, 2001.
95. Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R. J. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions, *Embo J*. 14: 5589-5596, 1995.
96. Kelekar, A. and Thompson, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends Cell Biol*. 8: 324-330, 1998.
97. Yin, X. M., Oltval, Z. N., and Korsmeyer, S. J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax, *Nature*. 369: 321-323, 1994.
98. Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. C., and Fesik, S. W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature*. 381: 335-341, 1996.
99. Diaz, J. L., Oltersdorf, T., Horne, W., McConnell, M., Wilson, G., Weeks, S., Garcia, T., and Fritz, L. C. A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members, *J Biol Chem*. 272: 11350-11355, 1997.
100. Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis, *Science*. 275: 983-986, 1997.
101. Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 92: 7834-7838, 1995.
102. Polster, B. M., Kinnally, K. W., and Fiskum, G. BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability, *J Biol Chem*. 276: 37887-37894, 2001.
103. Cheng, E. H.-Y. A., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2, bcl-x(l) sequester BH3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis, *Mol Cell*. 8: 705-711, 2001.
104. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak, *Genes Dev*. 15: 1481-1486, 2001.
105. Desagher, S. and Martinou, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol*. 10: 369-377, 2000.
106. Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c, *Genes Dev*. 14: 2060-2071, 2000.

107. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, *Mol Cell Biol.* 20: 929-935, 2000.
108. Chittenden, T. BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis, *Cancer Cell.* 2: 165-166, 2002.
109. Letai, A., Bassik, M., Walensky, L., Sorcinelli, M., Weiler, S., and Korsmeyer, S. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, *Cancer Cell.* 2: 183-192, 2002.
110. Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes, *Cancer Res.* 53: 4701-4714, 1993.
111. Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J Exp Med.* 183: 1533-1544, 1996.
112. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis, *Embo J.* 17: 3878-3885, 1998.
113. Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. Proapoptotic cascade activates Bid, which oligomerizes Bak or Bax into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell Death Differ.* 7: 1166-1173, 2000.
114. Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 94: 3668-3672, 1997.
115. Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, *Mol Cell.* 3: 287-296, 1999.
116. Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaerer, E., Martinou, J. C., and Tschopp, J. The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis, *J Cell Biol.* 126: 1059-1068, 1994.
117. Nguyen, M., Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus, *J Biol Chem.* 269: 16521-16524, 1994.
118. Kluck, R. M., Bossywetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science.* 275: 1132-1136, 1997.
119. Yang, J., Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J. Y., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. D. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked, *Science.* 275: 1129-1132, 1997.
120. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell.* 102: 33-42, 2000.
121. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, *Cell.* 102: 43-53, 2000.
122. Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J Exp Med.* 184: 1331-1341, 1996.
123. 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., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature.* 397: 441-446, 1999.
124. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature.* 412: 95-99, 2001.
125. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*, *Nature.* 412: 90-94, 2001.

126. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. A serine protease, Htra2, is released from the mitochondria and interacts with Xiap, inducing cell death, *Mol Cell*. 8: 613-621, 2001.
127. Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G., and Reed, J. C. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 96: 5752-5757, 1999.
128. Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciolarosen, L. A., and Rosen, A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling, *J Cell Biol*. 140: 1485-1495, 1998.
129. Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N., and DiFiglia, M. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation, *J Biol Chem*. 276: 8079-8086, 2001.
130. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process, *J Exp Med*. 189: 381-393, 1999.
131. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2, *Science*. 277: 370-372, 1997.
132. Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., and Thompson, C. B. Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes, *Nature*. 385: 353-357, 1997.
133. Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J., and Wagner, G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling, *Cell*. 96: 615-624, 1999.
134. McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., and Cowburn, D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists, *Cell*. 96: 625-634, 1999.
135. Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C. Bcl-2 family proteins as ion-channels, *Cell Death Differ*. 5: 372-380, 1998.
136. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 94: 11357-11362, 1997.
137. Bossywetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization, *Embo J*. 17: 37-49, 1998.
138. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, *Cell*. 91: 627-637, 1997.
139. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria, *Biochem J*. 345: 271-278, 2000.
140. Saito, M., Korsmeyer, S. J., and Schlesinger, P. H. Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes, *Nat Cell Biol*. 2: 553-555, 2000.
141. Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast, *J Cell Biol*. 155: 725-732, 2001.
142. Basaez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R. J. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 5492-5497, 1999.

143. Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J. C., Ghazi, A., and Antonsson, B. The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment, *J Biol Chem.* 275: 22713-22718, 2000.
144. Epand, R. F., Martinou, J. C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W., and Epand, R. M. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature, *J Biol Chem.* 277: 32632-32639, 2002.
145. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane, *Cell.* 111: 331-342, 2002.
146. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 95: 1455-1459, 1998.
147. Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell.* 75: 241-251, 1993.
148. Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., and Bredesen, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species, *Science.* 262: 1274-1277, 1993.
149. Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E., and Babior, B. M. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 93: 654-658, 1996.
150. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., and Kroemer, G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death, *J Exp Med.* 182: 367-377, 1995.
151. Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway, *Curr Biol.* 9: 967-970, 1999.
152. Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death, *Biochem Soc Symp.* 66: 69-73, 1999.
153. Zoratti, M. and Szabo, I. The mitochondrial permeability transition, *Biochim Biophys Acta.* 1241: 139-176, 1995.
154. Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues, *Eur J Biochem.* 264: 687-701, 1999.
155. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem J.* 341: 233-249, 1999.
156. Harris, M. H. and Thompson, C. B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability, *Cell Death Differ.* 7: 1182-1191, 2000.
157. Zamzami, N. and Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 67-71, 2001.
158. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L. A., Prevost, M. C., Xie, Z. H., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis, *Science.* 281: 2027-2031, 1998.
159. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature.* 399: 483-487, 1999.
160. Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 577-582, 2000.
161. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 3100-3105, 2000.
162. Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim,

- Oncogene. *21*: 4944-4956, 2002.
163. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. Bcl-x(L) prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange, *Mol Cell*. *3*: 159-167, 1999.
 164. Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant, *Nat Cell Biol*. *2*: 156-162, 2000.
 165. Martinou, J. C. and Green, D. R. Breaking the mitochondrial barrier, *Nat Rev Mol Cell Biol*. *2*: 63-67, 2001.
 166. Zhu, W. J., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B., and Andrews, D. W. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types, *Embo J*. *15*: 4130-4141, 1996.
 167. Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J. C. Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells, *Mol Cell Biol*. *16*: 6494-6508, 1996.
 168. Ng, F. W. H., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P. E., Nicholson, D. W., Cromlish, J. A., and Shore, G. C. P28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-x-L- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol*. *139*: 327-338, 1997.
 169. Jiang, S., Chow, S. C., Nicotera, P., and Orrenius, S. Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin, *Exp Cell Res*. *212*: 84-92, 1994.
 170. Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R. L., and Distelhorst, C. W. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *91*: 6569-6573, 1994.
 171. Zhu, W. H. and Loh, T. T. Roles of calcium in the regulation of apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells, *Life Sci*. *57*: 2091-2099, 1995.
 172. Bian, X., Hughes, F. M., Jr., Huang, Y., Cidlowski, J. A., and Putney, J. W., Jr. Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells, *Am J Physiol*. *272*: C1241-C1249, 1997.
 173. Preston, G. A., Barrett, J. C., Biermann, J. A., and Murphy, E. Effects of alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression, *Cancer Res*. *57*: 537-542, 1997.
 174. Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., and Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses, *Science*. *280*: 1763-1766, 1998.
 175. Csordas, G., Thomas, A. P., and Hajnoczky, G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria, *Embo J*. *18*: 96-108, 1999.
 176. Pacher, P. and Hajnoczky, G. Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves, *Embo J*. *20*: 4107-4121, 2001.
 177. Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnoczky, G. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals, *Embo J*. *18*: 6349-6361, 1999.
 178. Kuo, T. H., Kim, H. R. C., Zhu, L. P., Yu, Y. J., Lin, H. M., and Tsang, W. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2, *Oncogene*. *17*: 1903-1910, 1998.
 179. Pan, Z., Damron, D., Nieminen, A. L., Bhat, M. B., and Ma, J. Depletion of intracellular Ca²⁺ by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor, *J Biol Chem*. *275*: 19978-19984, 2000.
 180. Nutt, L. K., Pataer, A., Pehler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D. J., and Swisher, S. G. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores, *J Biol Chem*. *277*: 9219-9225, 2002.
 181. Germain, M., Mathai, J. P., and Shore, G. C. BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria, *J Biol Chem*. *277*: 18053-18060, 2002.

182. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta, *Nature*. *403*: 98-103, 2000.
183. Nakagawa, T. and Yuan, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, *J Cell Biol*. *150*: 887-894, 2000.
184. Zhou, B. B. and Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature*. *408*: 433-439, 2000.
185. Rich, T., Allen, R. L., and Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage, *Nature*. *407*: 777-783, 2000.
186. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. Surfing the p53 network, *Nature*. *408*: 307-310, 2000.
187. Beham, A., Marin, M. C., Fernandez, A., Herrmann, J., Brisbay, S., Tari, A. M., Lopezberestein, G., Lozano, G., Sarkiss, M., and McDonnell, T. J. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage, *Oncogene*. *15*: 2767-2772, 1997.
188. Ryan, J. J., Prochownik, E., Gottlieb, C. A., Apel, I. J., Merino, R., Nunez, G., and Clarke, M. F. c-Myc and Bcl-2 modulate p53 function by altering subcellular trafficking during the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *91*: 5871-5882, 1994.
189. Schor, N. F., Rudin, C. M., Hartman, A.-R., Thompson, C. B., Tyurina, Y. Y., and Kagan, V. E. Cell line dependence of Bcl-2-induced alteration of glutathione handling, *Oncogene*. *19*: 472-476, 2000.
190. Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara, S., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., and Yodoi, J. Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c, *J Immunol*. *161*: 6689-6695, 1998.
191. Voehringer, D. W., McConkey, D. J., McDonnell, T. J., Brisbay, S., and Meyn, R. E. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *95*: 2956-2960, 1998.
192. Marin, M. C., Fernandez, A., Bick, R. J., Brisbay, S., Buja, L. M., Snuggs, M., McConkey, D. J., von Eschenbach, A. C., Keating, M. J., and McDonnell, T. J. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺, *Oncogene*. *12*: 2259-2266, 1996.
193. Hoetelmans, R. W. M., van Slooten, H.-J., Keijzer, R., Erkeland, S., van de Velde, C. J. H., and van Dierendonck, J. H. Bcl-2 and Bax are present in interphase nuclei of mammalian cells, *Cell Death Differ*. *7*: 384-392, 2000.
194. Gajkowska, B., Motyl, T., Olszewska-Badarczuk, H., Gniadecki, R., and Koronkiewicz, M. Structural association of Bax with nuclear matrix and cytomatrix revealed by embedment-free immunogold electron microscopy, *Cell Biol Int*. *24*: 649-656, 2000.
195. Wang, Z. H., Ding, M. X., Chew-Cheng, S. B., Yun, J. P., and Chew, E. C. Bcl-2 and Bax proteins are nuclear matrix associated proteins, *Anticancer Res*. *19*: 5445-5449, 1999.
196. Schmitt, E., Beauchemin, M., and Bertrand, R. Overexpressed Bcl-xL protects against cell death and stabilizes a G2 arrest-senescence program by its interaction with cdk1(cdc2)-cyclinA1B1 complexes after DNA damage in human B lymphomas cells, submitted, 2002.
197. Schmitt, E., Paquet, C., Bergeron, S., and Bertrand, R. Interface between apoptosis and cell cycle regulation: implications for tumor proliferation and therapy. *In*: S. G. Pandalai (ed.) *Recent Research Developments in Cancer*, Vol. 3, pp. in press: Research Signpost Publisher, 2002.
198. Garner, B., Li, W., Roberg, K., and Brunk, U. T. On the cytoprotective role of ferritin in macrophages and its ability to enhance lysosomal stability, *Free Radic Res*. *27*: 487-500, 1997.
199. Garner, B., Roberg, K., and Brunk, U. T. Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress, *Free Radic Res*. *29*: 103-114, 1998.
200. Ollinger, K. and Brunk, U. T. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage, *Free Radic Biol Med*. *19*: 565-574, 1995.

201. Antunes, F., Cadenas, E., and Brunk, U. T. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture, *Biochem J.* 356: 549-555, 2001.
202. Brunk, U. T., Zhang, H., Dalen, H., and Ollinger, K. Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization, *Free Radic Biol Med.* 19: 813-822, 1995.
203. Brunk, U. T., Dalen, H., Roberg, K., and Hellquist, H. B. Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts, *Free Radic Biol Med.* 23: 616-626, 1997.
204. Brunk, U. T. and Svensson, I. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak, *Redox Rep.* 4: 3-11, 1999.
205. Brunk, U. T., Neuzil, J., and Eaton, J. W. Lysosomal involvement in apoptosis, *Redox Rep.* 6: 91-97, 2001.
206. Li, W., Yuan, X., Nordgren, G., Dalen, H., Dubowchik, G. M., Firestone, R. A., and Brunk, U. T. Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH, *FEBS Lett.* 470: 35-39, 2000.
207. Neuzil, J., Svensson, I., Weber, T., Weber, C., and Brunk, U. T. Alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation, *FEBS Lett.* 445: 295-300, 1999.
208. Zdolsek, J., Zhang, H., Roberg, K., and Brunk, U. H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells, *Free Radic Res Commun.* 18: 71-85, 1993.
209. Roberg, K. and Ollinger, K. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes, *Am J Pathol.* 152: 1151-1156, 1998.
210. Roberg, K., Johansson, U., and Ollinger, K. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress, *Free Radic Biol Med.* 27: 1228-1237, 1999.
211. Brunk, U. T., Zhang, H., Roberg, K., and Ollinger, K. Lethal hydrogen peroxide toxicity involves lysosomal iron-catalyzed reactions with membrane damage, *Redox Rep.* 1: 267-277, 1995.
212. Hellquist, H. B., Svensson, I., and Brunk, U. T. Oxidant-induced apoptosis: a consequence of lethal lysosomal leak, *Redox Rep.* 3: 65-70, 1997.
213. Hishita, T., Tada-Oikawa, T., Tohyama, K., Miura, Y., Nishihara, T., Tohyama, Y., Yoshida, Y., Uchiyama, T., and Kawanishi, S. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39, *Cancer Res.* 61: 2878-2884, 2001.
214. Ishisaka, R., Utsumi, T., Kanno, T., Arita, K., Katunuma, N., Akiyama, J., and Utsumi, K. Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3, *Cell Struct Funct.* 24: 465-470, 1999.
215. Katunuma, N., Matsui, A., Le, Q. T., Utsumi, K., Salvesen, G., and Ohashi, A. Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis, *Adv Enzyme Regul.* 41: 237-250, 2001.
216. Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X. M., Turk, V., and Salvensen, G. S. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route, *J Biol Chem.* 276: 3149-3157, 2001.
217. Zhao, M., Eaton, J. W., and Brunk, U. T. Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2?, *FEBS Lett.* 485: 104-108, 2000.
218. Franke, T. F. and Cantley, L. C. Apoptosis: a Bad kinase makes good, *Nature.* 390: 116-117, 1997.
219. Zha, J. P., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x(L), *Cell.* 87: 619-628, 1996.

220. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H. A., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell*. *91*: 231-241, 1997.
221. Del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of Bad through the protein kinase Akt, *Science*. *278*: 687-689, 1997.
222. Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J. S., Taylor, S. S., Scott, J. D., and Korsmeyer, S. J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A, *Mol Cell*. *3*: 413-422, 1999.
223. Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M. R., and Comb, M. J. p90(RSK) blocks Bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway, *J Biol Chem*. *274*: 34859-34867, 1999.
224. Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B., and Greenberg, M. E. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation, *Mol Cell*. *6*: 41-51, 2000.
225. Lizcano, J. M., Morrice, N., and Cohen, P. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155, *Biochem J*. *349*: 547-557, 2000.
226. Tan, Y., Demeter, M. R., Ruan, H., and Comb, M. J. Bad Ser-155 phosphorylation regulates Bad/Bcl-xL interaction and cell survival, *J Biol Chem*. *275*: 25865-25869, 2000.
227. Virdee, K., Parone, P. A., and Tolkovsky, A. M. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival, *Curr Biol*. *10*: 1151-1154, 2000.
228. Zhou, X. M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R. J., and Chittenden, T. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on ser155, *J Biol Chem*. *275*: 25046-25051, 2000.
229. Holmstrom, T. H., Chow, S. C., Elo, I., Coffey, E. T., Orrenius, S., Sistonen, L., and Eriksson, J. E. Suppression of Fas/Apo-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling, *J Immunol*. *160*: 2626-2636, 1998.
230. Bertolotto, C., Maulon, L., Filippa, N., Baier, G., and Auberger, P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a Rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD, *J Biol Chem*. *275*: 37246-37250, 2000.
231. Villalba, M., Bushway, P., and Altman, A. Protein kinase c-theta mediates a selective t cell survival signal via phosphorylation of bad, *J Immunol*. *166*: 5955-5963, 2001.
232. Dramsi, S., Scheid, M. P., Maiti, A., Hojabrpour, P., Chen, X., Schubert, K., Goodlett, D. R., Aebersold, R., and Duronio, V. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of Bad pro-apoptotic activity, *J Biol Chem*. *277*: 6399-6405, 2002.
233. Konishi, Y., Lehtinen, M., Donovan, N., and Bonni, A. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery, *Mol Cell*. *9*: 1005-1016, 2002.
234. Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., and Reed, J. C. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD, *Science*. *284*: 339-343, 1999.
235. Ayllon, V., Martinez, A. C., Garcia, A., Cayla, X., and Rebollo, A. Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis, *Embo J*. *19*: 2237-2246, 2000.
236. Chiang, C. W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S. C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B. E., and Yang, E. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation, *Blood*. *97*: 1289-1297, 2001.
237. Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Roncal, F., Fernandez, R., Albar, J. P., Martinez, C., and Rebollo, A. Bcl-2 targets protein phosphatase 1alpha to bad, *J Immunol*. *166*: 7345-7352, 2001.
238. Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Fleischer, A., and Rebollo, A. The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad, *Eur J Immunol*. *32*: 1847-1855, 2002.

239. Basu, S., Bayoumy, S., Zhang, Y., Lozano, J., and Kolesnick, R. Bad enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1, *J Biol Chem.* 273: 30419-30426, 1998.
240. Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8, *Mol Cell.* 8: 601-611, 2001.
241. Verma, S., Zhao, L. J., and Chinnadurai, G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis, *J Biol Chem.* 276: 4671-4676, 2001.
242. Blagosklonny, M. V. Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation, *Leukemia.* 15: 869-74, 2001.
243. Ruvolo, P. P., Deng, X., and May, W. S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis, *Leukemia.* 15: 515-522, 2001.
244. Ito, T., Deng, X. M., Carr, B., and May, W. S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function, *J Biol Chem.* 272: 11671-11673, 1997.
245. May, W. S., Tyler, P. G., Ito, T., Armstrong, D. K., Qatsha, K. A., and Davidson, N. E. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis, *J Biol Chem.* 269: 26865-26870, 1994.
246. Wertz, I. E. and Hanley, M. R. Diverse molecular provocation of programmed cell death, *Trends Biochem Sci.* 21: 359-364, 1996.
247. Hu, Z. B., Minden, M. D., and McCulloch, E. A. Phosphorylation of Bcl-2 after exposure of human leukemic cells to retinoic acid, *Blood.* 92: 1768-1775, 1998.
248. Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B., and May, W. S., Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 1578-1583, 2000.
249. Maundrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vialknecht, E., Martinou, J. C., and Arkinstall, S. Bcl-2 undergoes phosphorylation by C-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1, *J Biol Chem.* 272: 25238-25242, 1997.
250. Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T., and Dzau, V. J. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis, *J Biol Chem.* 272: 19022-19026, 1997.
251. Ueno, H., Kondo, E., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Nakamoto, T., Sasaki, K., Mitani, K., Furusaka, A., Tanaka, T., Tsujimoto, Y., Kadowaki, T., and Hirai, H. Association of insulin receptor substrate proteins with Bcl-2 and their effects on its phosphorylation and antiapoptotic function, *Mol Biol Cell.* 11: 735-746, 2000.
252. Jordan, M. A. and Wilson, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy, *Curr Opin Cell Biol.* 10: 123-130, 1998.
253. Haldar, S., Jena, N., and Croce, C. M. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 92: 4507-4511, 1995.
254. Haldar, S., Chintapalli, J., and Croce, C. M. Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells, *Cancer Res.* 56: 1253-1255, 1996.
255. Haldar, S., Basu, A., and Croce, C. M. Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells, *Cancer Res.* 58: 1609-1615, 1998.
256. Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M, *Mol Cell Biol.* 19: 8469-8478, 1999.
257. Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., Eldeiry, W. S., Kingston, D. G. I., Higgs, P. I., Neckers, L., and Fojo, T. Raf-1/Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death, *Cancer Res.* 57: 130-135, 1997.
258. Blagosklonny, M. V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., and Neckers, L. M. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway, *Cancer Res.* 56: 1851-1854, 1996.

259. Blagosklonny, M. V., Chuman, Y., Bergan, R. C., and Fojo, T. Mitogen-activated protein kinase pathway is dispensable for microtubule-active drug-induced Raf-1/Bcl-2 phosphorylation and apoptosis in leukemia cells, *Leukemia*. *13*: 1028-1036, 1999.
260. Srivastava, R. K., Mi, Q. S., Hardwick, J. M., and Longo, D. L. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis, *Proc Natl Acad Sci (USA)*. *96*: 3775-3780, 1999.
261. Ling, Y. H., Tornos, C., and Perez-Soler, R. Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis, *J Biol Chem*. *273*: 18984-18991, 1998.
262. Scatena, C. D., Stewart, Z. A., Mays, D., Tang, L. J., Keefer, C. J., Leach, S. D., and Pietenpol, J. A. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest, *J Biol Chem*. *273*: 30777-30784, 1998.
263. Fan, M., Goodwin, M., Vu, T., Brantley-Finley, C., Gaarde, W. A., and Chambers, T. C. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade, *J Biol Chem*. *275*: 29980-29985, 2000.
264. Calastretti, A., Bevilacqua, A., Ceriani, C., Vigano, S., Zancai, P., Capaccioli, S., and Nicolin, A. Damaged microtubules can inactivate BCL-2 by means of the mTOR kinase, *Oncogene*. *20*: 6172-6180, 2001.
265. Ojala, P. M., Yamamoto, K., Castanos-Velez, E., Biberfeld, P., Korsmeyer, S. J., and Makela, T. P. The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2, *Nat Cell Biol*. *2*: 819-825, 2000.
266. Deng, X. M., Ito, T., Carr, B., Mumby, M., and May, W. S. Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A, *J Biol Chem*. *273*: 34157-34163, 1998.
267. Ruvolo, P. P., Deng, X., Ito, T., Carr, B. K., and May, W. S. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A, *J Biol Chem*. *274*: 20296-20300, 1999.
268. Haldar, S., Basu, A., and Croce, C. M. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity, *Cancer Res*. *57*: 229-233, 1997.
269. Domina, A. M., Smith, J. H., and Craig, R. W. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition, *J Biol Chem*. *275*: 21688-21694, 2000.
270. Poruchynsky, M. S., Wang, E. E., Rudin, C. M., Blagosklonny, M. V., and Fojo, T. Bcl-X(L) is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption, *Cancer Res*. *58*: 3331-3338, 1998.
271. Burri, S. H., Kim, C. N., Fang, G. F., Chang, B. S., Perkins, C., Harris, W., Davis, L. W., Thompson, C. B., and Bhalla, K. N. 'Loop' domain deletional mutant of Bcl-xL is as effective as p29Bcl-xL in inhibiting radiation-induced cytosolic accumulation of cytochrome C (cyt c), caspase-3 activity, and apoptosis, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. *43*: 423-430, 1999.
272. Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y. N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z. M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C., and Kufe, D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage, *J Biol Chem*. *275*: 322-327, 2000.
273. Johnson, A. L., Bridgham, J. T., and Jensen, T. Bcl-X(LONG) protein expression and phosphorylation in granulosa cells, *Endocrinology*. *140*: 4521-4529, 1999.
274. Domina, A. M., Smith, J. H., and Craig, R. W. MCL-1 is phosphorylated by two distinct pathways, one through MAP kinase and the other through protein phosphatase inhibition or microtubule damage. *In*: 90th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Philadelphia, PA, 1999, pp. 307.
275. Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Millman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is

- required for cytochrome c release, while BCL-X-L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death, *J Biol Chem.* 274: 1156-1163, 1999.
276. Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria, *Nat Cell Biol.* 2: 754-761, 2000.
277. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis, *Science.* 290: 1761-1765, 2000.
278. Esposti, M. D., Erler, J. T., Hickman, J. A., and Dive, C. Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the bcl-2 family, displays lipid transfer activity, *Mol Cell Biol.* 21: 7268-7276, 2001.
279. Roucou, X., Rostovtseva, T., Montessuit, S., Martinou, J. C., and Antonsson, B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes, *Biochem J.* 363: 547-552, 2002.
280. Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E., and Gross, A. tBID homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis, *J Biol Chem.* 277: 12237-12245, 2002.
281. Bossy-Wetzell, E. and Green, D. R. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors, *J Biol Chem.* 274: 17484-17490, 1999.
282. Slee, E. A., Keogh, S. A., and Martin, S. J. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release, *Cell Death Differ.* 7: 556-565, 2000.
283. Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W., and Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide: caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of Granzyme B, *J Biol Chem.* 273: 21261-21266, 1998.
284. Atkinson, E. A. and Bleackley, R. C. Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells, *Crit Rev Immunol.* 15: 359-384, 1995.
285. Barry, M., Heibin, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R., and Bleackley, R. C. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid, *Mol Cell Biol.* 20: 3781-3794, 2000.
286. Talanian, R. V., Yang, X. H., Turbov, J., Seth, P., Ghayur, T., Casiano, C. A., Orth, K., and Froelich, C. J. Granule-mediated killing: pathways for Granzyme B-initiated apoptosis, *J Exp Med.* 186: 1323-1331, 1997.
287. Van de Craen, M., Van den Brande, I., Declercq, W., Irmeler, M., Beyaert, R., Tschopp, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro, *Eur J Immunol.* 27: 1296-1299, 1997.
288. Wood, D. E., Thomas, A., Devi, L. A., Berman, Y., Beavis, R. C., Reed, J. C., and Newcomb, E. W. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis, *Oncogene.* 17: 1069-1078, 1998.
289. Wood, D. E. and Newcomb, E. W. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis, *J Biol Chem.* 274: 8309-8315, 1999.
290. Varghese, J., Radhika, G., and Sarin, A. The role of calpain in caspase activation during etoposide induced apoptosis in T cells, *Eur J Immunol.* 31: 2035-2041, 2001.
291. Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., and Gottlieb, R. A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion, *J Biol Chem.* 276: 30724-30728, 2001.
292. Mandic, A., Viktorsson, K., Strandberg, L., Heiden, T., Hansson, J., Linder, S., and Shoshan, M. C. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis, *Mol Cell Biol.* 22: 3003-3013, 2002.
293. Wood, D. E. and Newcomb, E. W. Cleavage of Bax enhances its cell death function, *Exp Cell Res.* 256: 375-382, 2000.

294. Condorelli, F., Salomoni, P., Cotteret, S., Cesi, V., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., and Calabretta, B. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD, *Mol Cell Biol.* *21*: 3025-3036, 2001.
295. Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S., and Tsuruo, T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-xL protein by caspase-3-like proteases, *Oncogene.* *17*: 1295-1304, 1998.
296. Fadeel, B., Hassan, Z., Hellstrom-Lindberg, E., Henter, J. I., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells, *Leukemia.* *13*: 719-728, 1999.
297. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *J Cell Biol.* *139*: 1281-1292, 1997.
298. Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. Regulated targeting of Bax to mitochondria, *J Cell Biol.* *143*: 207-215, 1998.
299. Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death, *Embo J.* *18*: 2330-2341, 1999.
300. Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell.* *103*: 645-654, 2000.
301. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis, *J Cell Biol.* *144*: 891-901, 1999.
302. Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A., and Saikumar, P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane, *J Biol Chem.* *276*: 18361-18374, 2001.
303. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells, *J Biol Chem.* *276*: 11615-11623, 2001.
304. Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H., and Youle, R. J. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis, *J Cell Biol.* *153*: 1265-1276, 2001.
305. Ruffolo, S. C., Breckenridge, D. G., Nguyen, M., Goping, I. S., Gross, A., Korsmeyer, S. J., Li, H., Yuan, J., and Shore, G. C. BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria, *Cell Death Differ.* *7*: 1101-1108, 2000.
306. Yamaguchi, H. and Wang, H. G. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome c release independent of interacting with Bax or BimEL, *J Biol Chem.* *277*: 41604-41612, 2002.
307. Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues, *Mol Cell.* *6*: 1389-1399, 2000.
308. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science.* *292*: 727-730, 2001.
309. Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C., and White, E. Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria, *J Biol Chem.* *277*: 14127-14134, 2002.
310. Gilmore, A. P., Metcalfe, A. D., Romer, L. H., and Streuli, C. H. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization, *J Cell Biol.* *149*: 431-446, 2000.

311. Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria, *J Biol Chem.* 277: 14040-14047, 2002.
312. Ghatan, S., Lerner, S., Kinoshita, Y., Hetman, M., Patel, L., Xia, Z., Youle, R. J., and Morrison, R. S. p38 MAP kinase mediates Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons, *J Cell Biol.* 150: 335-348, 2000.
313. Deng, Y. and Wu, X. Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 12050-12055, 2000.
314. Cuddeback, S. M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H. G. Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax, *J Biol Chem.* 276: 20559-20565, 2001.
315. Samuel, T., Weber, H. O., Rauch, P., Verdoodt, B., Eppel, J. T., McShea, A., Hermeking, H., and Funk, J. O. The G2/M regulator 14-3-3 sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax, *J Biol Chem.* 276: 45201-45206, 2001.
316. Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I., and Borst, J. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax, *J Biol Chem.* 277: 22781-22788, 2002.
317. Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A., and Reed, J. C. Cloning and functional analysis of Bag-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity, *Cell.* 80: 279-284, 1995.
318. Wang, H. G., Takayama, S., Rapp, U. R., and Reed, J. C. Bcl-2 interacting protein, Bag-1, binds to and activates the kinase Raf-1, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 93: 7063-7068, 1996.
319. Lee, J. H., Takahashi, T., Yasuhara, N., Inazawa, J., Kamada, S., and Tsujimoto, Y. Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death, *Oncogene.* 18: 6183-6190, 1999.
320. Grassme, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., and Gulbins, E. Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering, *J Immunol.* 168: 298-307, 2002.
321. Brown, D. A. and London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14: 111-136, 1998.
322. Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M., and Deans, J. P. Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidence toward a role in calcium regulation, *J Immunol.* 165: 1220-1227, 2000.
323. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting, *J Exp Med.* 190: 1549-1560, 1999.
324. Aman, M. J. and Ravichandran, K. S. A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux, *Curr Biol.* 10: 393-396, 2000.
325. Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *J Biol Chem.* 276: 20589-20596, 2001.
326. Ayllon, V., Fleischer, A., Cayla, X., Garcia, A., and Rebollo, A. Segregation of bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis, *J Immunol.* 168: 3387-3393, 2002.
327. U, M., Miyashita, T., Shikama, Y., Tadokoro, K., and Yamada, M. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family(1), *FEBS Lett.* 509: 135-141, 2001.
328. Liu, J. W., Chandra, D., Tang, S. H., Chopra, D., and Tang, D. G. Identification and characterization of Bimgamma, a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim, *Cancer Res.* 62: 2976-2981, 2002.
329. Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N. R. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis, *Mol Cell Biol.* 22: 3577-3589, 2002.

330. Bouillet, P., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., Puthalakath, H., O'Connor, L., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death, *Ann N Y Acad Sci.* 926: 83-89, 2000.
331. Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D. C., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Cullen, L., Cory, S., and Adams, J. M. The role of Bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control, *Ann N Y Acad Sci.* 917: 541-548, 2000.
332. Hochstrasser, M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation, *Curr Opin Cell Biol.* 7: 215-223, 1995.
333. Dou, Q. P. and Li, B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents, *Drug Resist Update.* 2: 215-223, 1999.
334. Jesenberger, V. and Jentsch, S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 112-121, 2002.
335. Imajohohmi, S., Kawaguchi, T., Sugiyama, S., Tanaka, K., Omura, S., and Kikuchi, H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells, *Biochem Biophys Res Comm.* 217: 1070-1077, 1995.
336. Drexler, H. C. A. Programmed cell death and the proteasome, *Apoptosis.* 3: 1-7, 1998.
337. An, B., Goldfarb, R. H., Siman, R., and Dou, Q. P. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts, *Cell Death Differ.* 5: 1062-1075, 1998.
338. Marshansky, V., Wang, X., Bertrand, R., Luo, H., Duguid, W., Chinnadurai, G., Kanaan, N., Vu, M. D., and Wu, J. Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells, *J Immunol.* 166: 3130-3142, 2001.
339. Li, B. and Dou, Q. P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression, *Proc Natl Acad Sci (USA).* 97: 3850-3855, 2000.
340. Breitschopf, K., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction, *J Biol Chem.* 275: 21648-21652, 2000.
341. Thomas, M. and Banks, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6, *Oncogene.* 17: 2943-2954, 1998.
342. Chadebech, P., Brichese, L., Baldin, V., Vidal, S., and Valette, A. Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage, *Biochem Biophys Res Commun.* 262: 823-827, 1999.
343. Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway, *Mol Cell Biol.* 20: 1886-1896, 2000.
344. Brichese, L., Barboule, N., Heliez, C., and Valette, A. Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to bid, *Exp Cell Res.* 278: 101-111, 2002.

7.2 Annexe II

Bcl-xES, a BH4- and BH3-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation

(Oncogene, vol.23(22): 3915-31, 2004)

Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation

Estelle Schmitt¹, Claudie Paquet¹, Myriam Beauchemin¹ and Richard Bertrand^{*1}

¹Centre de recherche, Centre hospitalier de l' Université of Montréal (CHUM), Hôpital Notre-Dame and Institut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Bcl-2 family members either negatively or positively regulate the apoptotic threshold of cells. Bcl-xES (extra short), a novel Bcl-x member, possesses a unique combination of BH4 and BH2 domains as well as a COOH-terminal hydrophobic transmembrane anchor domain. Bcl-xES contains sequences of hydrophobic α -6 helices but lacks sequences of α -5 helices, suggesting that it does not have pore channel-forming activity but functions uniquely as a trapping protein. mRNA expression analysis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and RNase protection assay reveal that Bcl-xES is expressed in a variety of human cancer cell lines and human tumors, including bone marrow from patients with acute lymphoblastic leukemia. Bcl-xES expression is much less pronounced in some specimens of normal human tissues, including the breast, ovary, testis and lung. Stable, transfected human B lymphoma Namalwa variant cells expressing Bcl-xES were derived to investigate its role in apoptosis. Bcl-xES had a preventive effect on cell death induced by tumor necrosis factor- α and various concentrations of anticancer drugs, including camptothecin, etoposide and cisplatin. Its protective action on cell death was correlated with the inhibition of mitochondrial cytochrome *c* release and caspase activation. In a yeast two-hybrid system, Bcl-xES interacted with most Bcl-2 family members, including those containing only a BH3 domain, and with the Ced-4 homolog Apaf-1. Co-immunoprecipitation and gel filtration chromatography experiments suggest that Bcl-xES delays drug-induced apoptosis by disturbing the formation of Bax oligomers and preventing cytochrome *c* release, but also by interacting with Apaf-1 and inhibiting procaspase-9 activation, thus averting the apoptogenic proteolytic caspase cascade and cell death.

Oncogene (2004) 23, 3915–3931. doi:10.1038/sj.onc.1207554
Published online 29 March 2004

Keywords: Bcl-x; Bax; Apaf-1; caspase; apoptosis

Introduction

Mammalian Bcl-2 family proteins share homology that is principally clustered within conserved Bcl-2 homology domains (BH1, BH2, BH3 and BH4), but could also contain a long flexible loop (LOOP), a pore-forming domain consisting of α -5 and α -6 helices, and a carboxy-terminal hydrophobic transmembrane domain (TM) responsible for their sublocalization to subcellular organelles, including the mitochondria, endoplasmic reticulum and nucleus. Members of this family of proteins are critical regulators of apoptosis that either promote cell survival or facilitate cell death. The antiapoptotic members of the family are multidomain proteins (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), while the proapoptotic members are subdivided into two classes: multidomain proteins that contain Bcl-2 homology (BH) domains 1–3 (e.g. Bax, Bak), and BH3-only proteins constituted of a unique BH3 motif (e.g. Bad, Bid, Bik, Bim, Hkr) (Kroemer, 1997; Reed, 1997; Chao and Korsmeyer, 1998; Adams and Cory, 2001).

The various forms of Bcl-2 family proteins possess unique combinations of structure-function domains that determine their capacity to interact with each other and with other proteins, forming a complex network of homo- and hetero-oligomers upon stimulation (Yang and Korsmeyer, 1996; Kroemer, 1997; Reed, 1997; Chao and Korsmeyer, 1998; Kroemer and Reed, 2000). The localization of these proteins at the outer mitochondrial membrane indicates that they influence the opening and/or closing of mitochondrial megachannels by so-called permeability transition pores (mPTP) (Bernardi *et al.*, 1994; Zoratti and Szabo, 1996) as well as the release of apoptogenic activators from the mitochondria, including apoptosis-inducing factor (Susin *et al.*, 1996, 1999b), cytochrome *c* (Kluck *et al.*, 1997a, b; Yang *et al.*, 1997a), Diablo/Smac (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), EndoG (Li *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2001), Omi/HtrA2 (Suzuki *et al.*, 2001), and some procaspases such as procaspase-9 and -2 (Susin *et al.*, 1999a). The formation of homo- and hetero-complexes between proteins of the Bcl-2 family and those containing only a BH3 domain is well-described, and recent studies have shown that the multidomain Bax and Bak proteins are essential for cell death, acting downstream of the BH3 domain-only members (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001).

*Correspondence: R Bertrand, Centre de recherche, Centre hospitalier de l' Université of Montréal (CHUM), Hôpital Notre-Dame and Institut du cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke St East (Room Y-5634), Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada;
E-mail: richard.bertrand@umontreal.ca

Received 5 July 2002; revised 17 December 2003; accepted 18 December 2003; Published online 29 March 2004

Current views on the role of the BH3 domain-only proteins encompass not only the binding and sequestration of antiapoptotic members like Bcl-2 and Bcl-xL, but also the binding and activation of proapoptotic members like Bax and Bak. In turn, upon activation, these form high molecular weight oligomer complexes and clusters in the mitochondrial outer membrane (Franke and Cantley, 1997; Hsu *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Goping *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999; Nechushtan *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000; Korsmeyer *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2001; Makin *et al.*, 2001; Mikhailov *et al.*, 2001; Nechushtan *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). These complexes then possibly form high-conductance pore channels by themselves (Muchmore *et al.*, 1996; Antonsson *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997) and/or in association with yet unknown partners to beget the so-called mitochondrial apoptosis-induced channel (Pavlov *et al.*, 2001) and/or modulate the opening/closing of mPTP in cooperation with adenine nucleotide translocator protein (ANT) (Marzo *et al.*, 1998) and the mitochondrial porin channel or voltage-dependent anion channel (VDAC1) (Shimizu *et al.*, 1999, 2000; Shimizu and Tsujimoto, 2000). Activated proapoptotic proteins like Bax accelerate VDAC1 opening in a manner that permits cytochrome *c* to pass directly through, while the BH4-containing antiapoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2 impede such opening (Shimizu *et al.*, 1999, 2000; Shimizu and Tsujimoto, 2000).

In addition, initial studies have demonstrated interaction of Bcl-xL, Bcl-2 and Boo/Diva with Ced-4/Apaf-1 (Hu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999). In the mitochondrial pathway of caspase activation, Apaf-1 binds to procaspase-9 in the presence of dATP and cytochrome *c*, and this interaction is mediated by caspase recruitment domains found on the two proteins (Qin *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999). Complex formation between Apaf-1 and procaspase-9 zymogen leads to caspase-9 cleavage and activation, probably through autoproteolytic processing, and caspase-9 in turn directly activates caspase-3 and -7 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998). Bcl-xL, Bcl-2 and Boo/Diva binding to Apaf-1 appears to inhibit Apaf-1 oligomerization and caspase-9 activation (Hu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999), situations similar to that described in *C. elegans*, whereas the prosurvival Ced-9 binds and sequesters Ced-4, but also forms a ternary complex with Ced-3, thereby preventing Ced-4 oligomerization and Ced-3 activation (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Seshagiri and Miller, 1997; Spector *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997a, b; Chaudhary *et al.*, 1998). However, other investigations have been unable to demonstrate either an association of Bcl-xL or Bcl-2 with Apaf-1 or cellular co-localization of these proteins (Moriishi *et al.*, 1999; Conus *et al.*, 2000; Haraguchi *et al.*, 2000; Hausmann *et al.*, 2000; Newmeyer *et al.*, 2000). Whether other antiapoptotic Bcl-2 family members

bind and/or sequester Apaf-1 remains an unresolved question.

In this paper, we report the identification and characterization of Bcl-xES (extra short), a novel Bcl-x member expressed in various human tissues and cancer cell lines. Bcl-xES has a unique structure compared to others, and contains BH4 and BH2 domains, sequences of α -6 helices and a COOH-terminal hydrophobic transmembrane anchor domain, but lacks the BH1, BH3 and flexible LOOP domains and sequences corresponding to α -5 helices. In a yeast two-hybrid system, Bcl-xES interacted with most Bcl-2 family members, including those containing only a BH3 domain, and also with the Ced-4 homolog Apaf-1. Bcl-xES deletion mutants indicated that BH4 and BH2 are required for these interactions. In addition, our data suggest that Bcl-xES delays drug-induced apoptosis by disturbing the formation of Bax oligomers and preventing cytochrome *c* release and Apaf-1 oligomerization, but also by directly interacting with Apaf-1 and inhibiting procaspase-9 activation, blocking the mitochondrial apoptogenic proteolytic cascade and cell death.

Results

Bcl-xES, a unique BH4-, BH2- and transmembrane anchor domain-containing protein

Among all the Bcl-2 family members, Bcl-xES contains a unique combination of BH4, BH2 and TM domains (Figure 1). First identified and cloned from human promyelocytic HL-60 cells, bcl-xES mRNA expression was investigated in various human cell lines and tissues by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and, in some specimens, by ribonucleotidase protection assay. Table 1 (upper panel) summarizes the detection of Bcl-xES mRNA compared to Bcl-xL and Bcl-xS in a series of human cancer cell lines and normal or cancerous human tissues of various origins. Bcl-xES was detected in most cancer cell lines and tissues with the exception of normal human breast, ovary, testis and lung. The relative amount of Bcl-xES was semiquantitated and normalized to the amount of Bcl-xL by autoradiograph densitometry. In the panel of cancer cell lines analysed, the relative ratios (bcl-xES to bcl-xL) were found to be highly heterogenous among samples ($n = 19$), ranging from 0 to 1 and 0.74 to 1. In the panel of human tissues analysed, Bcl-xES levels were much lower than Bcl-xL levels, with a few exceptions (bone marrow samples #1 and #3), as shown in the representative autoradiographs (Table 1, lower panel).

To investigate whether Bcl-xES is expressed at the protein level, we first analysed total cellular extracts obtained from HL-60, U-937 and Namalwa cells by Western immunoblotting, using Bcl-x-specific monoclonal antibodies generated from amino acids 18–233 of rat Bcl-xL. These extracts were prepared in the presence of a cocktail of protease inhibitors and lactacystin, a potent proteasome activity inhibitor. We detected three

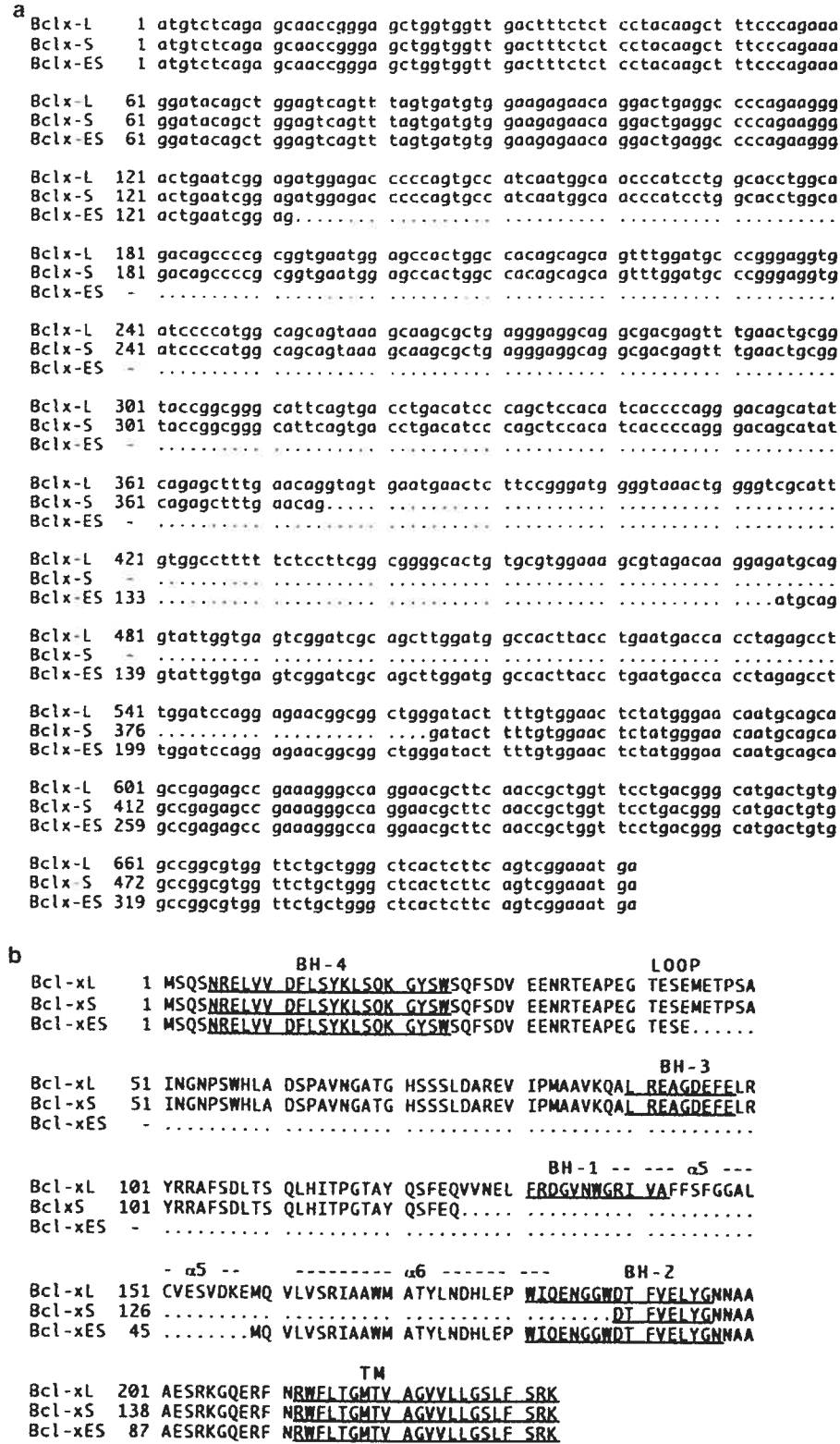
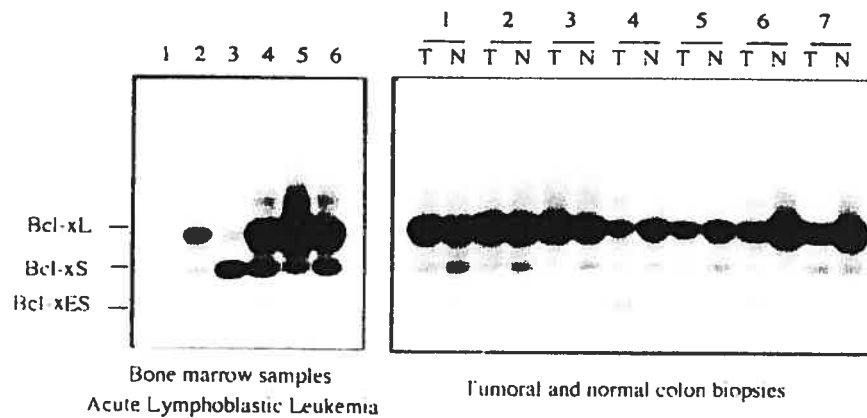


Figure 1 Bcl-xES, a novel member of the Bcl-2 family. (a) Nucleotide sequence alignment of Bcl-xES compared to that of Bcl-xL and Bcl-xS. (b) Amino-acid sequence alignment of Bcl-xES. The BH4, BH3, BH1 and BH2 domains and the COOH-terminal hydrophobic domain (TM) are indicated

Table 1 Expression of Bcl-xES, Bcl-xL and Bcl-xS in human tissues and human cancer cell lines

Types	Origin	Bcl-xES	Bcl-xL	Bcl-xS
HL-60	Promyelocytic leukemia	+	+	+
U-937	Histiocytic lymphoma	+	+	+
Namalwa	Burkitt's lymphoma	+	+	+
NL-2	Burkitt's lymphoma	+	+	+
Raji	Burkitt's lymphoma	+	+	+
Jurkatt	Acute T-cell leukemia	+	+	+
H9	T-cell lymphoma	+	+	+
CCRF CEM	Acute lymphoblastic leukemia	+	+	+
MCF 7	Breast adenocarcinoma	±	+	+
MDA-MB-468	Breast adenocarcinoma	+	+	+
SK-BR-3	Breast adenocarcinoma	+	+	+
OVCAR-3	Ovary adenocarcinoma	+	+	+
DU 145	Prostate carcinoma	+	+	+
PC-3	Prostate adenocarcinoma	±	+	+
LNCap-FCG-10	Prostate carcinoma	+	±	+
Calu-1	Lung carcinoma	+	+	+
A-431	Epidermoid carcinoma	+	+	+
NCI-H69	Small-cell lung carcinoma	+	+	+
NCI-N417	Small-cell lung carcinoma	+	+	+
Colo-205	Colon adenocarcinoma	-	-	-
Colo-320DM	Colon adenocarcinoma	-	-	-
HT-29	Colon adenocarcinoma	+	+	+
Bone marrow	Children with ALL (mixed)	+ (5/6)	+ (6/6)	+ (6/6)
Colon	Adenocarcinoma (mixed)	+ (7/7)	+ (7/7)	+ (7/7)
Colon	Normal (mixed)	+ (6/7)	+ (7/7)	+ (7/7)
Spleen	Normal tissue (male)	±	+	+
Skin	Normal tissue (male)	±	+	+
Breast	Normal tissue (female)	-	+	+
Ovary	Normal tissue (female)	-	+	+
Testis	Normal tissue (male)	-	+	+
Lung	Normal tissue (male)	-	+	+
Colon	Normal tissue (male)	±	+	+
Brain	Normal tissue (male)	±	+	+

Symbols are (+) positive; (-) negative; (±) very weak. ALL means acute lymphoblastic leukemia. Note: Human Bcl-xEs, Bcl-xL and Bcl-xS expression was detected by RT-PCR from total RNA using specific primers at the ATG start codon and TGA stop codon. Electrophoresis was done in 1.6% agarose gel and the amplified fragments transferred to GeneScreen nylon membranes. Blot were hybridized with a human Bcl-xL cDNA probe labeled with [³²P]dCTP by random priming procedure. Representative autoradiographs are shown in the lower panels



bands corresponding to approximately Mr 26 000, Mr 17 000 and Mr 13 000 kDa, most probably representing Bcl-xL, Bcl-xS and Bcl-xES, respectively (Figure 2a). Subcellular fractionation and Western immunoblot analysis indicated that in Namalwa cells, endogenous Bcl-xES protein was expressed in mitochondrial, cytosolic and nuclear fractions (Figure 2b). To investigate

the activity and mode of action of Bcl-xES on cell death, first, Bcl-xES cDNA was subcloned in a modified pCEP4 expression vector that contained consensus Kozak and hemagglutinin epitope tag sequences (HA-tag) (Schmitt *et al.*, 1998a, b, 2000). After transfection, a stable Namalwa variant line that expresses HA-Bcl-xES was selected under hygromycin B1. Control Namalwa

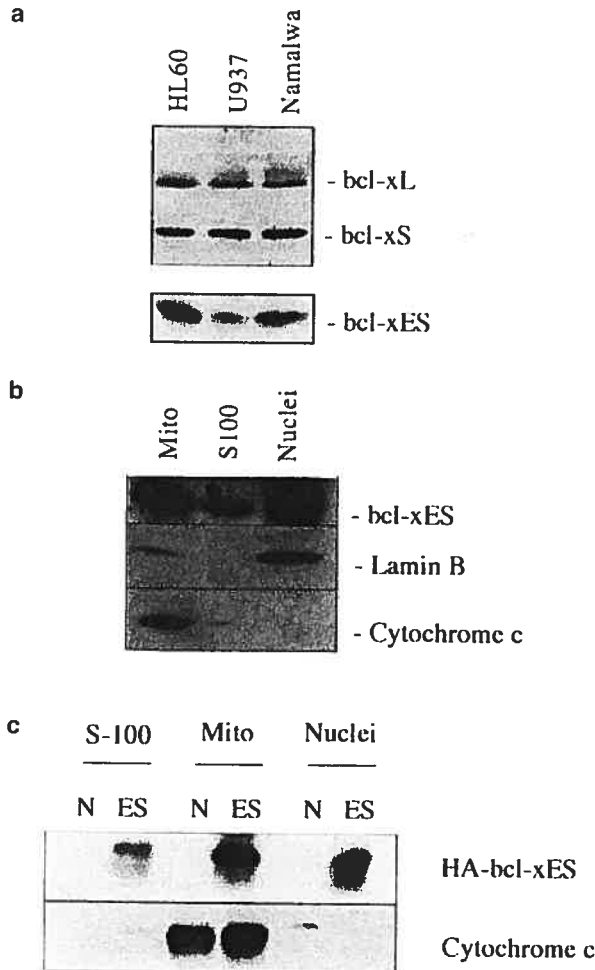


Figure 2 Expression and subcellular localization of Bcl-xES in human cancer cell lines and in transfected human B lymphoma Namalwa cells. **(a)** Western blot analysis of endogenous Bcl-xL, Bcl-xS and Bcl-xES in whole cell extracts (200 μ g per lane) obtained from HL-60, U-937 and Namalwa cell lines. After SDS-PAGE (12%) and electrophoretic transfer (1 h, 60 V, 4°C), Bcl-xL, Bcl-xS and Bcl-xES were immunodetected, using anti-Bcl-x-specific monoclonal antibody (clone 44; BD Transduction Laboratories), and revealed by enhanced chemiluminescence reaction and film exposure. Upper panel = 1 : 500 dilution; 20-min exposure. Lower panel = 4 : 500 dilution; overnight exposure. **(b)** Subcellular localization of endogenous Bcl-xES in Namalwa cells. Subcellular extracts were prepared as described in Materials and methods. Bcl-xES was immunodetected, using anti-Bcl-x-specific monoclonal antibody. Cytochrome *c* and Lamin B were monitored as controls. Visualization was performed by enhanced chemiluminescence reaction and film exposure. **(c)** Subcellular localization of HA-Bcl-xES in transfected Namalwa cells. Subcellular extracts were prepared from control Namalwa (N) and stable Namalwa cells transfected by electroporation with pCEP4-HA-Bcl-xES and selected at 1.5 mg/ml hygromycin B (ES), as described in Materials and methods. After SDS-PAGE and electrophoretic transfer, HA-Bcl-xES protein was detected using anti-HA peptide monoclonal antibodies. Cytochrome *c* was monitored as control. Visualization was performed by enhanced chemiluminescence reaction and film exposure

cells did not survive, whereas a pCEP4-mock vector-transfected Namalwa cell line was selected under hygromycin B1. Immunohistochemical staining of the exogenous proteins indicated that HA-Bcl-xES was expressed in all transfected cells (data not shown). Subcellular fractionation and Western immunoblot analysis indicated that HA-Bcl-xES protein migrated to approximately a Mr 14000 kDa band, and was expressed in cytosolic, mitochondrial and nuclear fractions (Figure 2c).

Effect of HA-Bcl-xES on the kinetics of apoptosis induced by cytotoxic agents

Previous studies have shown that 20-S-camptothecin (CPT), a DNA topoisomerase I inhibitor, etoposide (VP-16), a DNA topoisomerase II inhibitor, *cis*-platinum (II) diamine dichloride (*cis*PT), a DNA adduct-inducing agent, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) elicit morphological changes, caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation associated with apoptosis in Namalwa cells (Schmitt *et al.*, 1998a, b, 2000). To assess the effect of overexpressing Bcl-xES in these cells, the kinetics of DNA fragmentation associated with apoptosis induced by these agents were monitored and quantitated by filter DNA elution assay. Namalwa cells overexpressing Bcl-xES presented significant modulation of and protection against apoptosis evoked by these cytotoxic drugs (Figure 3). Compared to the reported effect of Bcl-xL in Namalwa cells (Schmitt *et al.*, 1998b), Bcl-xES seems to have a less pronounced protective action after various treatments. However, it is difficult to really compare the effect of the two proteins, simply because the Bcl-xL and Bcl-xES expression levels achieved in these cells after transfection are different.

Translocation of mitochondrial intermembrane protein cytochrome *c* to the cytosol is associated with anticancer drug-induced apoptosis. To define the effect of Bcl-xES in the mitochondrial pathway of caspase activation, first, cytochrome *c* release was monitored after CPT treatment. Bcl-xES delayed cytochrome *c* release into the cytosol of transfected Namalwa cells, compared to wild-type cells, for at least 4 h after 0.1 μ M CPT, and sustainingly for 4 h after 1.0 μ M CPT (Figure 4a). Cytochrome *c* release allows Apaf-1/procaspase-9 oligomerization and interaction that result in the rapid activation of caspase-9, which, in turn, directly activates effector caspase-3 and -7 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998). To study the consequence of cytochrome *c* release inhibition in Namalwa-Bcl-xES cells, we monitored the kinetics of caspase-9 (LEHDase) and caspase-3- and -7-like (DEV-Dase) activities. Both LEHDase and DEV-Dase activities were retarded in Namalwa cells overexpressing Bcl-xES compared to wild-type cells after CPT treatments (Figure 4b). The kinetics of DNA fragmentation presented in Figure 3 are in accordance with those of cytochrome *c* release and caspase activities, and were further visualized by agarose gel electrophoresis after CPT treatment (Figure 4c). Altogether, these results

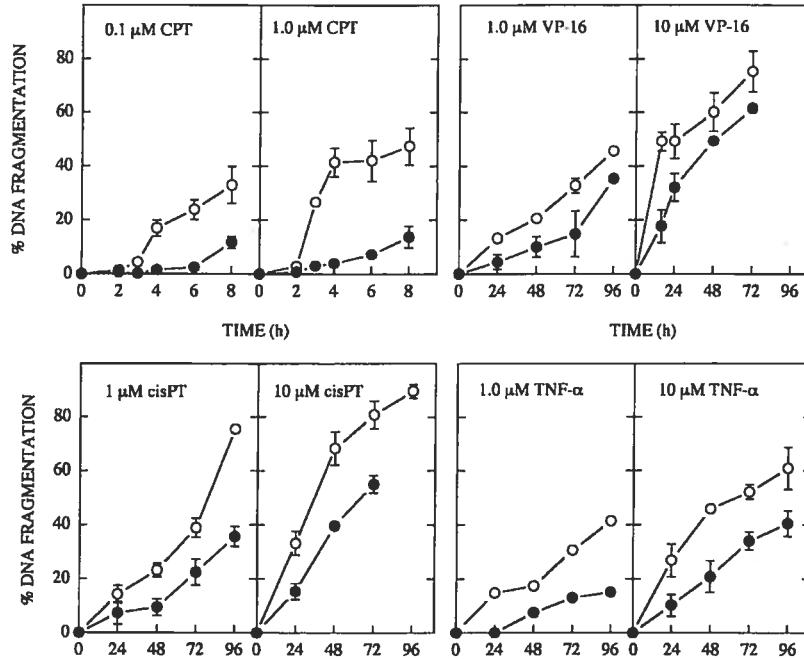


Figure 3 Kinetics of DNA fragmentation in control and Bcl-xES Namalwa cells. [¹⁴C]-Thymidine-labeled cells were treated with various concentrations of camptothecin (CPT), etoposide (VP-16), *cis*-platinum(II) diammine dichloride (cisPT) or tumor necrosis factor- α (TNF- α). At the indicated times (x-axis; h), DNA fragmentation was determined by DNA filter elution assays. The results are expressed as percent DNA fragmentation. Points represent the means \pm s.e. of three independent experiments performed in triplicate. Symbols are Namalwa cells (open circles); Bcl-xES-transfected Namalwa cells selected at 1.5 mg/ml hygromycin (closed circles). Mock vector-transfected Namalwa cells selected at 1.5 mg/ml hygromycin show similar sensitivity to control Namalwa cells

indicated that Bcl-xES prevented cytochrome *c* release, subsequent caspase-9, -3 and -7 activation and DNA fragmentation.

Interaction of Bcl-xES with human Bcl-2 family members and Apaf-1

The affinity of Bcl-xES dimerization among various Bcl-2 family members and Apaf-1 was monitored in a yeast two-hybrid system. Transmembrane hydrophobic anchor sequences were removed from the cDNAs to promote their nuclear translocation, to avoid the toxicity of proapoptotic members in yeast cells, and to prevent unspecific interactions through their hydrophobic transmembrane domain. Interestingly, Bcl-xES interacted strongly with all family members tested, including BH3-only members and the Ced-4 homolog Apaf-1 (Figure 5a). Most likely, the absence of BH1, BH3 and α -5 helices confers increased exposure of the BH2 and BH4 domains of the protein, compared to other Bcl-2 members like Bcl-xL or Bcl-2 that show multiglobular conformation. In addition, the ability of Bcl-xES to interact strongly with Apaf-1 seems specific, since we previously reported that a Bax isoform had no affinity for Apaf-1, in the same yeast two-hybrid system (Schmitt *et al.*, 2000). To further analyse these interactions, we first compared the ability of Bcl-xL to interact with Apaf-1 and a BH3-only protein in this yeast

two-hybrid system, and we generated two Bcl-xES deletion mutants lacking either BH4 (Bcl-xES Δ BH4) or BH2 (Bcl-xES Δ BH2) (Figure 5b). In this two-hybrid system, Bcl-xL did not interact with Apaf-1, but rather with a BH3-only family member. Bcl-xES strongly interacted with Apaf-1, Bcl-xES Δ BH4 did not interact with Apaf-1, while Bcl-xES Δ BH2 showed a weak interaction with it. Interestingly, neither Bcl-xES Δ BH4 nor Bcl-xES Δ BH2 interacted with a BH3-only family member. These results suggested that BH4 is required for the Bcl-xES interaction with Apaf-1, while both BH4 and BH2 seem to be needed for Bcl-xES interaction with other Bcl-2 family members. The strong affinity of Bcl-xES for most Bcl-2 family members and Apaf-1 indicates that multiple interactions within cells could possibly account for the antiapoptotic effect of Bcl-xES.

Bcl-xES interferes with the formation of Bax oligomers after CPT treatment

To explore the mechanisms by which Bcl-xES prevented cytochrome *c* release from the mitochondria after CPT treatment, we monitored its effect on Bax activation and oligomer formation. Since Bcl-xES interacted strongly with multidomain and BH3 domain-only proapoptotic proteins in the yeast two-hybrid system, we postulated that such interactions in cells could interfere with and

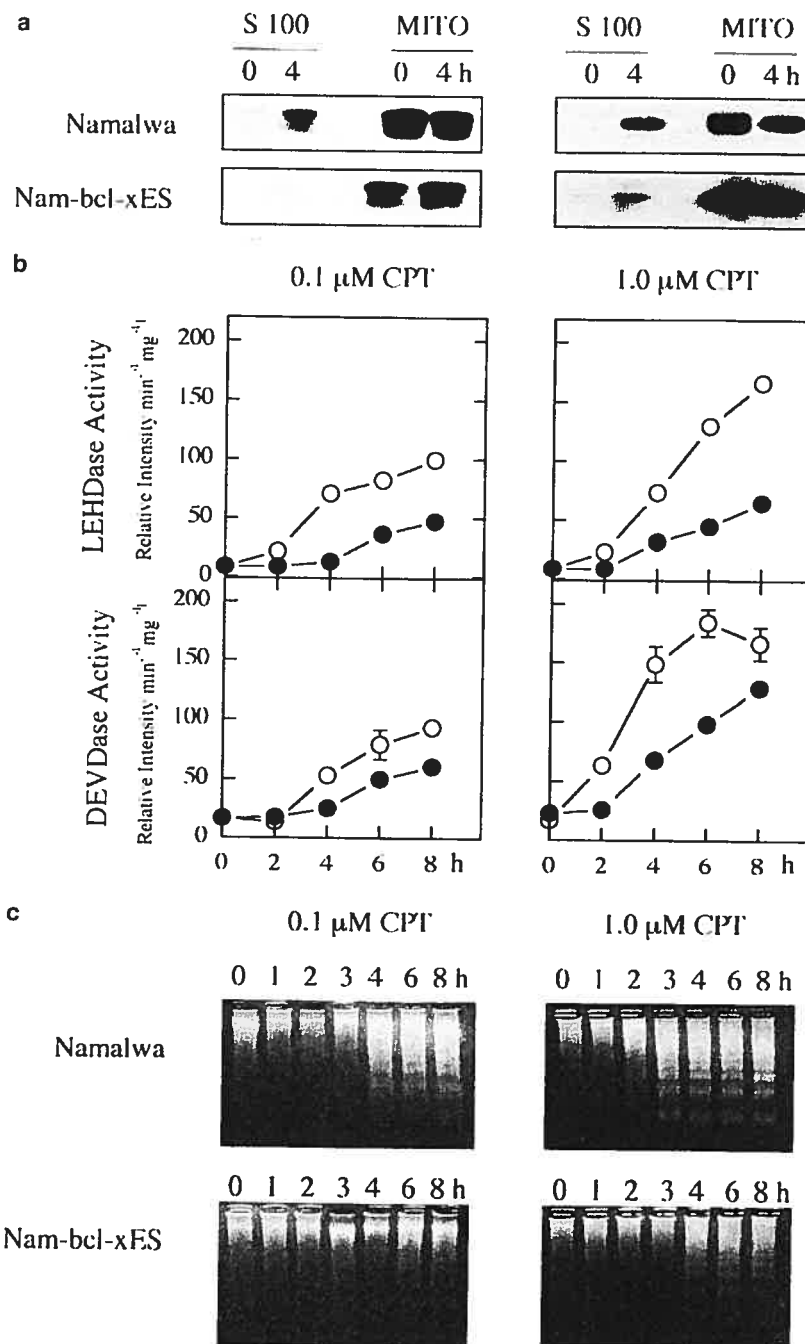


Figure 4 Cytochrome *c* release, caspase activation and oligonucleosome-sized DNA fragmentation after CPT treatment. (a) Cytochrome *c* release. Cytosolic S-100 and mitochondrial extracts were prepared from Namalwa and Namalwa/Bcl-xES-transfected cells at the indicated times (0, 4h) after 30-min treatment with 0.1 μ M CPT (left panel) or 1.0 μ M CPT (right panel). Immunoblot analysis of cytochrome *c* was performed using anticytochrome *c*-specific antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence and film exposure. (b) LEHDase and DEVDase activities. Namalwa and Namalwa/Bcl-xES-transfected cells were treated for 30 min with 0.1 μ M (left panels) or 1.0 μ M CPT (right panels). Cytosolic extracts were then prepared from Namalwa (open circles) and Namalwa/Bcl-xES cells (closed circles) at the indicated times after treatment. LEHDase (upper panels) and DEVDase (lower panels) activities were monitored continuously at 37°C by detecting fluorescence emission in the presence of Ac-LEHD-AFC and Ac-DEVD-AMC, respectively. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg. Points represent the means \pm s.d. of three independent experiments. (c) Oligonucleosome-sized DNA fragmentation. At the indicated times after 30-min treatment with 0.1 μ M (left panels) or 1.0 μ M CPT (right panels), total DNA was extracted from Namalwa (upper panels) and Namalwa/Bcl-xES (lower panels) cells, and visualized after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining

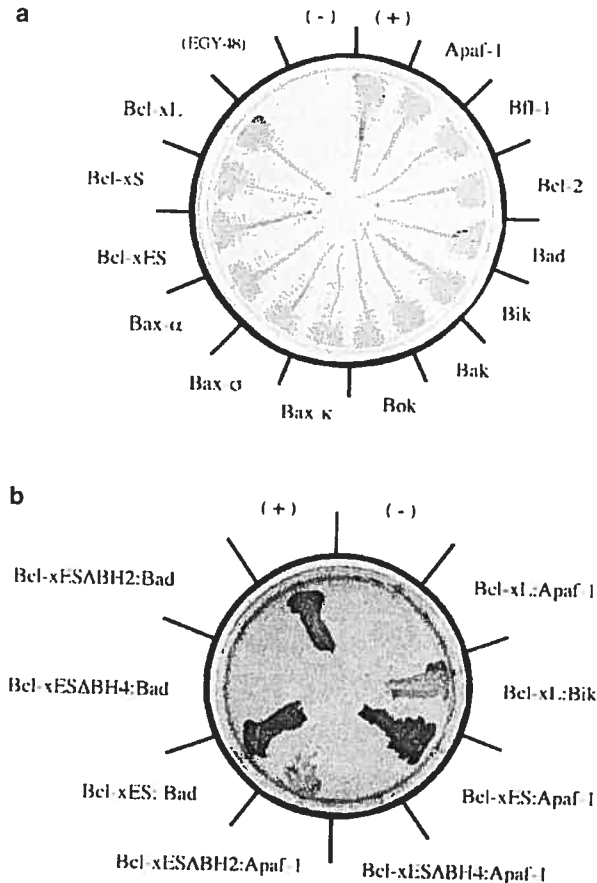


Figure 5 Interaction of Bcl-xES and deletion mutants in yeast two-hybrid assay. (a) Bcl-xES deleted of its transmembrane domain, Bcl-xES(ΔTM), was subcloned in two-hybrid plasmid pLexA vector. The Bcl-2 family members Bcl-xL (ΔTM), Bcl-xS (ΔTM), Bfl-1 (ΔTM), Bcl-2 (ΔTM), Bax-α (ΔTM), Bax-σ (ΔTM), Bax-κ (ΔTM), Bak (ΔTM), Bok (ΔTM), Bik (ΔTM), Bad and the human Ced-4 homologue Apaf-1 were subcloned in the two-hybrid plasmid pB42AD. Positive controls (+) represent pLexA p53 and pB42 SV40 T, and negative controls (-) represent pLexA-lamin C and pB42 SV40 T. EGY 48 represents untransformed yeast cells. (b) Bcl-xES(ΔTM), Bcl-xL(ΔTM) and the deletion mutants Bcl-xES(ΔBH4ΔTM) and Bcl-xES(ΔBH2ΔTM) were subcloned in two-hybrid plasmid pLexA vector. Apaf-1, Bik(ΔTM) and Bad were subcloned in the two-hybrid plasmid pB42AD. Positive and negative controls are as above. In all cases, sequential transformations were conducted by the lithium acetate method in yeast strain EGY48, and the cells were plated on histidine/tryptophan/leucine-deficient (for LEU2 reporter gene assay) minimal SD induction/selection media

delay Bax activation and oligomer formation after CPT treatment. To monitor the effect of Bcl-xES on Bax oligomerization, protein extracts obtained from control and CPT-treated cells were subjected to gel filtration chromatography. The elution profiles of Bax after CPT treatment in Namalwa cells showed a strong shift of the proteins toward fractions of higher molecular weight, compared to its detection in untreated control cells, as early as 2 h after 0.1 μM and 1.0 μM CPT (Figure 6a, upper panels). The shift of Bax toward fractions of

higher molecular weight was even more dramatic after 1.0 μM CPT. In contrast, the elution profiles of Bax after similar treatment in Namalwa/Bcl-xES-transfected cells revealed much more moderate shifts toward fractions of higher molecular weight (Figure 6a, lower panels). In fact, the elution profiles of Bax in Namalwa/Bcl-xES after 1.0 μM CPT were more or less equivalent to those seen in Namalwa cells after 0.1 μM CPT, a 10-fold difference of CPT concentration. These results indicated that Bax formed high molecular weight oligomers very rapidly after DNA damage induced by CPT, an observation that correlates with the activation of apoptosis. In addition, Bcl-xES expression had a pronounced impact on the kinetics and amplitude of Bax oligomerization induced by CPT, in accordance with the Bcl-xES effect on cytochrome *c* release.

To further analyse the effect of Bcl-xES on Bax oligomerization, co-immunoprecipitation experiments were conducted to monitor if Bcl-xES binds to multi-domain proapoptotic Bax in untreated and CPT-treated Namalwa cells. Mitochondria-enriched fractions were incubated with dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP), a homobifunctional *N*-hydroxysuccinimide ester crosslinker, to stabilize protein interactions and to ease the detection of other proteins in Bcl-xES immunocomplexes. Higher amounts of Bax and Bak proteins were immunoprecipitated from mitochondrial extracts obtained 2 and 4 h after CPT treatment compared to untreated cells (Figure 6b). These results suggested that the inhibition of Bax high molecular weight oligomerization, observed in Figure 6a, could be explained in part by the ability of Bcl-xES to bind Bax protein, thus averting its oligomerization. The interaction of Bcl-xES with Bak could potentially have a similar effect, obviating Bak oligomerization or Bax/Bak heteromerization.

Interaction of Bcl-xES with Apaf-1

Initial studies showed interactions between some antiapoptotic members of the Bcl-2 family, including Bcl-xL, Bcl-2 and Diva with Ced4/Apaf 1 (Hu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999). However, contrasting observations have also been reported (Moriishi *et al.*, 1999; Conus *et al.*, 2000; Haraguchi *et al.*, 2000; Hausmann *et al.*, 2000; Newmeyer *et al.*, 2000). Interestingly, we noted a strong interaction between Bcl-xES and Apaf-1 in the yeast two-hybrid system (Figure 5). To explore the possibility that Bcl-xES can interfere with Apaf-1 oligomerization in Namalwa cells, we first studied the effect of Bcl-xES on Apaf-1 oligomerization and procaspase-9 activation. Protein extracts were obtained from control and CPT-treated cells and subjected to gel filtration chromatography. To avoid Apaf-1 self-oligomerization during the lysis procedure, 10 mM adenosine 5'-*O*-(3-thiotriphosphate) (ATP-γS) was added to the lysis buffer. In Namalwa cells, the elution profiles of Apaf-1 showed a prominent shift of the protein toward fractions of higher molecular weight 2 h after 0.1 μM CPT treatment (Figure 7a, upper panels). Apaf-1

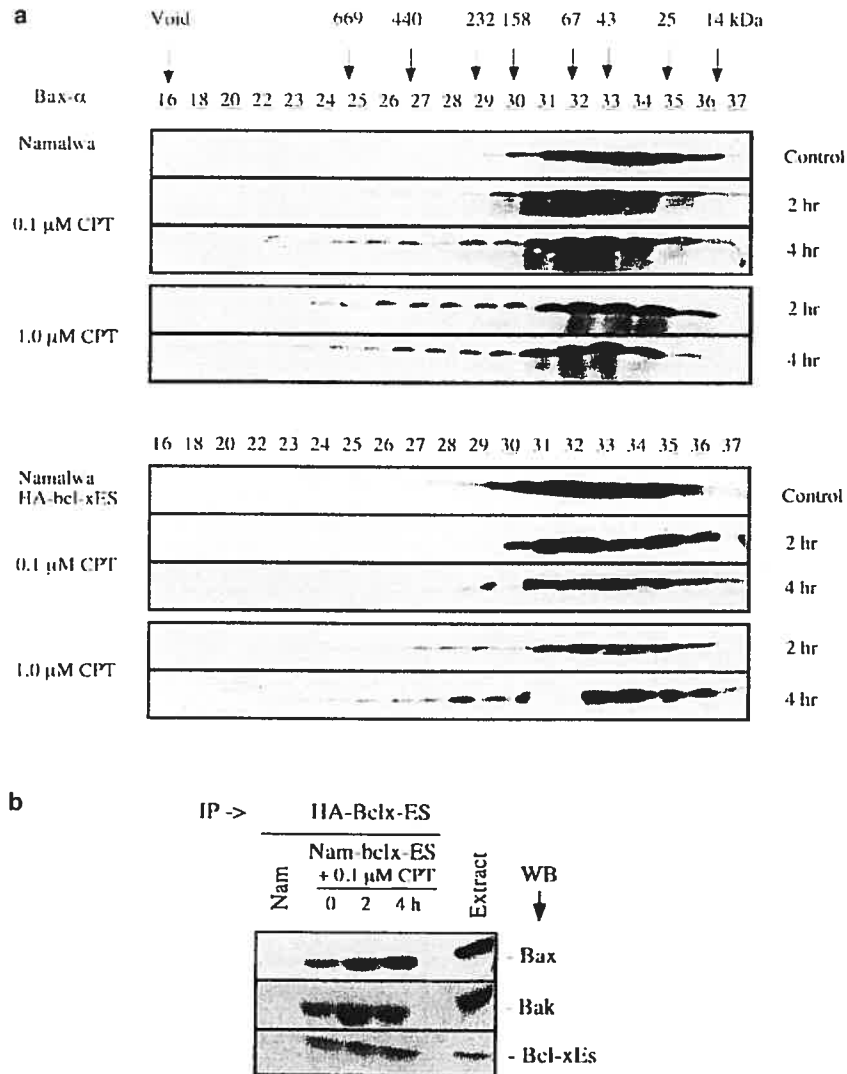


Figure 6 Kinetics of Bax- α oligomer formation after CPT treatment. (a) FPLC elution profiles of Bax- α from Namalwa and Namalwa/Bcl-xES-transfected cells on Superose 6-HR 16/50, as described in Materials and methods. Cellular extracts were prepared at the indicated times from 5×10^6 control and drug-treated Namalwa (upper panels) and control and drug-treated Namalwa/Bcl-xES (lower panels) cells at the indicated times after 0.1 and 1.0 μ M CPT. The elution peaks of the molecular weight standards (kDa) are indicated by arrows. After chromatography, 80 μ l of each fraction (numbers above each lane) was run on SDS-PAGE and electrotransferred. Immunoblots were revealed using anti-Bax polyclonal antibody and visualized by enhanced chemiluminescence and film exposure. (b) Mitochondria-enriched fractions were prepared, as described under Materials and methods, from control (0 h), 2-h and 4-h CPT-treated Namalwa/Bcl-xES cells, incubated with DSP crosslinker and lysed in 2% CHAPS-containing buffer. A 100- μ g protein fraction was incubated with anti-HA antibodies. After capture of the immunocomplexes, the covalent bonds created by DSP were cleaved under reducing conditions and the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE, and analysed by Western blotting with specific antibodies. Extraction and immunoprecipitation from mitochondria-enriched, untransfected Namalwa cells (Nam) and a whole cells extract obtained from Namalwa/Bcl-xES cells (extract) were used as negative and positive controls, respectively

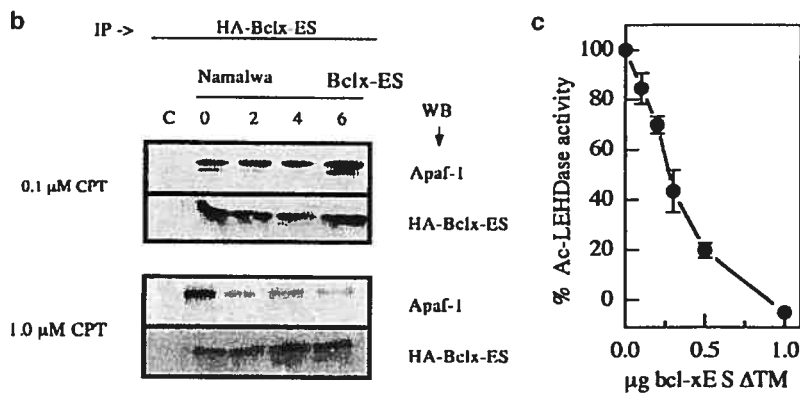
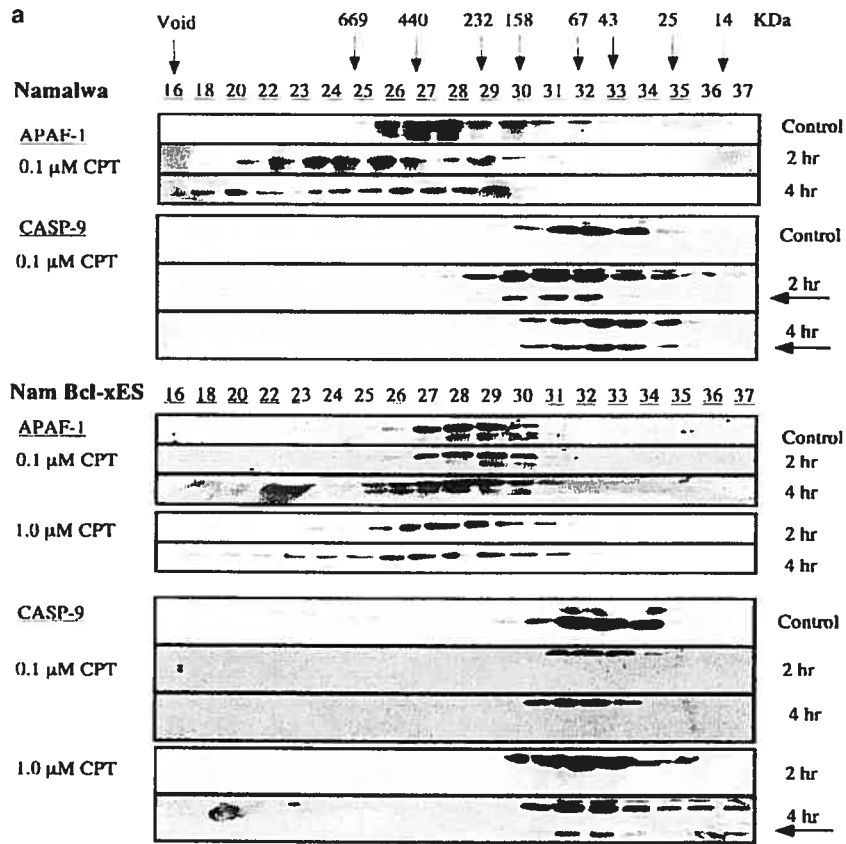
oligomerization coincided with the appearance of active caspase-9 fragments (Figure 7a, upper panels). In contrast, in Namalwa/Bcl-xES-transfected cells, the elution profiles of Apaf-1 obtained after 0.1 μ M CPT treatment showed neither Apaf-1 oligomerization nor procaspase-9 activation, even 4 h after drug treatment (Figure 7a, lower panels). When these cells were treated with 1.0 μ M CPT, a sustaining amount of Apaf-1 protein shifted toward fractions of higher molecular weight,

from 2 to 4 h after drug treatment (Figure 7a, lower panels). Also, Apaf-1 oligomerization was associated with the appearance of active caspase-9 fragments 4 h after drug treatment (Figure 7a, lower panels). Together, these experiments indicated that Bcl-xES modulated Apaf-1 oligomerization and procaspase-9 activation after CPT treatment.

To further analyse this effect of Bcl-xES, a series of co-immunoprecipitation experiments were performed

in control and CPT-treated Namalwa/Bcl-xES cells. Bcl-xES was able to bind and to precipitate Apaf-1 (Figure 7b). Apaf-1 binding to Bcl-xES remained constant for at least 6 h when Namalwa/Bcl-xES cells were treated with 0.1 μM CPT (Figure 7b, upper panels), a condition where Bax oligomer formation, cytochrome *c* release, caspase activation and apoptosis were impaired in these cells. In contrast, Apaf-1 interaction with Bcl-xES was diminished when the cells were exposed to 1.0 μM CPT (Figure 7b, lower panels), a condition where Bax oligomerization, cytochrome *c* release and caspase activation were observed, albeit

attenuated when compared to untransfected cells. Thus, Bcl-xES binding to Apaf-1 could possibly interfere with its oligomerization, as well as procaspase-9 recruitment and activation, in addition to its prevention of Bax oligomerization and cytochrome *c* release. To test this possibility, we deployed a cell-free system in which procaspase-9 is activated by the addition of cytochrome *c* and dATP. Cell-free extracts were prepared from untreated U-937 cells, and caspase-9 activity was monitored with a fluorogenic peptide substrate in the absence or presence of various amounts of recombinant Bcl-xES protein deleted of its TM



domain (Bcl-xES(Δ TM)). The addition of recombinant Bcl xES(Δ TM) induced dose-dependent inhibition of Ac-LEHD-AFC hydrolysis (Figure 7c). As a negative control, the addition of recombinant Bcl-xES(Δ TM) in cellular extracts obtained from apoptotic cells had no inhibitory effect on caspase activities (data not shown).

Discussion

Several iso-proteins of the Bcl-2 family, which either show similar or opposite effects, have been identified in mammalian cells. These include Bcl-2 (Bcl-2-a, -2 β) (Tsujimoto and Croce, 1986), Bcl-x (Bcl-xL, -xS, -x β , -x γ) (Boise *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997b; Ban *et al.*, 1998), Bax (Bax- α , - β , - γ , - δ , - ω , - ϵ , - σ) (Oltvai *et al.*, 1993; Apte *et al.*, 1995; He *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2000), Bim/Bod (Bim-L, -EL, -S, - α 1, - α 2, - β 1, - β 2, - β 3, - β 4) (O'Connor *et al.*, 1998; U *et al.*, 2001), BNip1 (BNip-1, -1a, -1b, -1c) (Zhang *et al.*, 1999), Bok/Mtd (Hsu and Hsueh, 1998) and Bcl-g (Bcl-gL, -gS) (Guo *et al.*, 2001). In the present study, we noted that an apparent alternative spliced isoform of the Bcl-x gene, which encoded a protein containing only the BH4, BH2 and COOH-terminus hydrophobic transmembrane domains, behaves as an antiapoptotic family member. To the best of our knowledge, it is the only member of the family that shows this specific combination of BH2 and BH4 domains. The BH2 and BH4 domains of Bcl-2 and Bcl-xL are functional domains associated with their antiapoptotic activities. While BH2 is important for homo- and hetero-dimerization with other members of the Bcl family (Borner *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1994; Hanada *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 1996), the BH4 domain is reported to be involved in the interaction between Bcl-2 and Bcl-xL with Raf-1, calcineurin and Ced-4/Apaf-1 (Wang *et al.*, 1996; Shibasaki *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998). In addition, the BH4 domain is implicated in the modulation of VDAC1 activity (Shimizu *et al.*, 2000). More recently, other investigators have revealed a role for the

BH4 domain of Bcl-2 in modulating I κ B α through an unknown mechanism that could involve ANT (de Moissac *et al.*, 1999; Bottero *et al.*, 2001).

The expression profile of bcl-xES mRNA is relatively similar to that of bcl-xL and bcl-xS, but seems to vary in the breast, ovary, testis and lung. Bcl-xES protein is also observed among diverse human leukemic cell lines, although at a lower level compared to Bcl-xL. However, the expression level of the protein was stabilized by the addition of the proteasome inhibitor lactacystin, suggesting that Bcl-xES could have a high turnover in these cells (data not reported). This indicates that the physiological role of the various isoforms in modulating apoptosis might be highly tissue- and environment-specific.

Following CPT treatment, Bcl-xES overexpression delayed cytochrome *c* release, a common observation with antiapoptotic members of the Bcl-2 family. Most likely, Bcl-xES, that showed strong interactions in yeast two-hybrid assay, binds and inhibits proapoptotic members, including those containing only a BH3 domain that would be activated after CPT-induced DNA damage. In a recent study, we found that multidomain and BH3 domain-only proteins are induced rapidly and translocated to the mitochondria within 1–2 h after CPT treatment in Namalwa cells. The ratio between anti- and proapoptotic members of the Bcl-2 families is an important mechanism controlling cell death. Upon cell death stimulation, translocation and oligomerization of proapoptotic members to the mitochondria switch the mitochondrial equilibrium toward apoptosis (Yang and Korsmeyer, 1996; Kroemer and Reed, 2000). Perhaps the degree of protection conferred by Bcl-xES depends on its level of expression. In this study, we speculated that Bcl-xES sequesters various proapoptotic proteins, thus impeding the activation and oligomerization of Bax into active high molecular weight complexes. A recent investigation indicated that Bcl-2 and Bcl-xL sequestered BH3 domain-only proteins, preventing the activation of Bax or Bak (Cheng *et al.*, 2001). Although all possible protein–protein interactions were not addressed in this study, we showed that Bax oligomerization was delayed after CPT treatment in Namalwa/Bcl-xES-transfected

Figure 7 Effects of Bcl-xES on Apaf-1 oligomerization and procaspase-9 activation. (a) FPLC elution profiles of Apaf-1 and caspase-9 from control and drug-treated Namalwa (upper panels) and Namalwa/Bcl-xES cells (lower panels) on Superose 6-HR 16/50, as described in Materials and methods. Cellular extracts were prepared at the indicated times from 5×10^6 control and drug-treated cells. Lysis buffer contained 25 mM HEPES (pH 7.4), 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 2% CHAPS, 6 mM sucrose and a cocktail of protease inhibitors. To avoid Apaf-1 self-oligomerization during the lysis procedure, 10 mM ATP- γ S was added. The elution peaks of the molecular weight standards (kDa) are indicated by vertical arrows. Following chromatography, 80 μ l of each fraction was run on SDS-PAGE and electrot transferred. Blots were revealed using anti-Apaf-1 monoclonal antibody and anti-caspase-9 monoclonal antibody that recognized the precursor and an active cleaved fragment (indicated by arrows), and visualized by enhanced chemiluminescence and film exposure. (b) Co-immunoprecipitation of Bcl-xES and Apaf-1. Co-immunoprecipitation experiments on control and transfected Namalwa/Bcl-xES cells were performed with anti-HA antibody (Roche Molecular Biochemicals, clone 12CA5), at the indicated times after 30-min treatment with 0.1 μ M CPT (upper panels) or 1.0 μ M CPT (lower panels). Immunoblots were revealed using anti-Apaf-1 monoclonal antibody (R&D Systems, clone 94408.11) and anti-HA monoclonal antibody (Roche Molecular Biochemicals, clone 12CA5) before enhanced chemiluminescence and film exposure. (c) Bcl-xES(Δ TM) interferes with procaspase-9 activation in a cell-free assay. U-937 cell-free extracts were incubated with cytochrome *c*/dATP in the absence or presence of different amounts of purified recombinant Bcl-xES(Δ TM) protein. Cleavage of Ac-LEHD-AFC was monitored as initial velocities. The results are expressed as percentages of relative enzyme activity, using the formula $[(V_i - V_o/V_a - V_o) \times 100]$, where V_i is the initial velocity measured in the presence of various fixed amounts of inhibitor, V_o is the basal initial velocity measured in unactivated control extract, and V_a is the initial velocity measured in activated extracts in the absence of inhibitor. Data points represent the means \pm s.d. of four independent experiments

cells compared to parental Namalwa cells. In addition, we observed in co-immunoprecipitation experiments that Bcl-xES binds directly to Bax and Bak. Similar findings have been made reported in Hela cells exposed to staurosporine or ultraviolet irradiation (Antonsson *et al.*, 2001) and in rat kidney proximal tubule cells treated with carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazine (Mikhailov *et al.*, 2001), using different biochemical techniques, including gel filtration chromatography and protein crosslinking. Bax oligomer formation and insertion into the mitochondrial membrane were inhibited in the presence of antiapoptotic Bcl-2 protein in these studies (Antonsson *et al.*, 2001; Mikhailov *et al.*, 2001). Employing confocal microscopy and immunogold-labeling electron microscopy, others have also observed that Bcl-xL completely inhibited the formation of Bax and Bak high molecular weight clusters in staurosporine-treated cells (Nechushtan *et al.*, 2001). Thus, it appeared in our study that the delay of cytochrome *c* release in Namalwa/Bcl-xES-transfected cells could be attributed to the effect of Bcl-xES on Bax activation and oligomer formation.

Bcl-xES showed strong interaction with Apaf-1 in yeast two-hybrid assay. In *C. elegans*, the pro-survival Ced-9 binds and sequesters Ced-4, but also forms a ternary complex with Ced-3, preventing Ced-4 oligomerization and Ced-3 activation (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Seshagiri and Miller, 1997; Spector *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997a,b; Chaudhary *et al.*, 1998). Initial studies revealed similar interactions in mammalian cells between some antiapoptotic members of the Bcl-2 family, including Bcl-xL, Bcl-2 and Diva, and Apaf-1 (Hu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999). Bcl-xL, Bcl-2 and Boo/Divia binding to Apaf-1 appeared to inhibit cytochrome *c*-dependent Apaf-1 oligomerization and procaspase-9 activation (Hu *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999). However, contrary observations have also been reported (Moriishi *et al.*, 1999; Conus *et al.*, 2000; Haraguchi *et al.*, 2000; Hausmann *et al.*, 2000; Newmeyer *et al.*, 2000). In addition, heat shock protein 70 (HSP70) was shown to interact directly with Apaf-1, while HSP27 was reported to bind cytochrome *c*, and both could prevent Apaf-1 oligomerization and subsequent caspase-9 activation (Garrido *et al.*, 1999; Beere *et al.*, 2000; Bruey *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000). Using co-immunoprecipitation assays, we found an interaction between Bcl-xES and Apaf-1 in Namalwa cells. The association between the two proteins was also detected in cells treated with 0.1 μ M CPT, but was diminished when they were treated with 1.0 μ M CPT. To further elaborate these observations, we monitored the kinetics of Apaf-1 oligomerization and caspase-9 activation in Namalwa/Bcl-xES-transfected cells compared to wild-type Namalwa cells after CPT treatment. In untransfected Namalwa cells, the elution profiles of Apaf-1 showed a prominent shift of the protein toward fractions of higher molecular weight 2 h after 0.1 μ M CPT treatment, and Apaf-1 oligomerization coincided with the appearance of active caspase-9 fragments. In contrast, in Namalwa/Bcl-xES-

transfected cells, the elution profiles of Apaf-1 after 0.1 μ M CPT treatment presented neither Apaf-1 oligomerization nor procaspase-9 activation, even 4 h after drug treatment. The lack of Apaf-1 oligomerization in Namalwa/Bcl-xES cells was possibly caused by two phenomena. First, as discussed above, Bcl-xES delayed Bax oligomer formation and cytochrome *c* release, an essential cofactor required for Apaf-1 oligomerization. Thus, the lack of cytochrome *c* release is consistent with the lack of Apaf-1 oligomerization. However, Bcl-xES binding to Apaf-1 could possibly interfere with Apaf-1 oligomerization, even in the presence of cytochrome *c*. The results obtained in a cell-free system where caspase-9 activity, initiated by adding cytochrome *c* and dATP, is inhibited by adding various amounts of Bcl-xES are also consistent with this hypothesis. Controversial data have been reported by different investigators using a similar cell-free system (Hu *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Hausmann *et al.*, 2000). The reasons behind these differences are unknown. Perhaps, such contradictory results indicate that other factors present or absent in these extracts contribute to or interfere with the action of antiapoptotic proteins utilized in these assays. Perhaps the level of expression of other Bcl-2 family members and/or of various HSP and/or of Aven, a protein that binds to both Bcl-xL and Apaf-1, should be considered (Garrido *et al.*, 1999; Beere *et al.*, 2000; Bruey *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000). Nevertheless, other experiments will be required to identify these putative factors.

In summary, we have identified a novel Bcl-x member expressed in various human tissues and cancer cell lines. Bcl-xES has antiapoptotic activity in Namalwa cells. Our results indicated that Bcl-xES delayed drug-induced apoptosis by disturbing the formation of Bax oligomers, thus preventing cytochrome *c* release and Apaf-1 oligomerization. In addition, the interaction of Bcl-xES with Apaf-1 suggested that Bcl-xES could also sequester Apaf-1, preventing procaspase-9 activation.

Materials and methods

Chemicals

Radioactive precursors [α - 32 P]-dCTP (> 3000 Ci/mmol), [α - 32 P]-dUTP (800 Ci/mmol) and [2- 14 C]-thymidine (59 mCi/mmol) were obtained from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA, USA). 20-S-camptothecin lactone (CPT), etoposide (VP-16), *cis*-platinum(II) diammine dichloride (*cis*PT) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were purchased from the Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). The fluorogenic peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC) were bought from Bachem Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA, USA) and Calbiochem-Novobiochem Corporation (San Diego, CA, USA), respectively. Hygromycin B was procured from Roche Molecular Biochemicals (Laval, Quebec, Canada). Dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP) was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma and ICN Biomedicals or from local sources.

CDNA cloning of human Bcl-xES

Human Bcl-xES cDNA was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from mRNA obtained from human HL-60 cells, using specific adapter primers containing *NotI* sequences at the ATG start codon (5'-primer GCGGCCGCATGTCTCAGAGCAACCGGGAG) and TGA stop codon (complementary 3'-primer GCGGCCGCTCATTCCGACTGAAGAGTGA). The amplified fragment was first cloned in pCRII vector (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then subcloned at the *NotI* restriction site in the eucaryotic expression vector pCEP4 (InVitrogen) modified to include consensus Kozak and hemagglutinin epitope Tag sequences (HA-tag) (Schmitt *et al.*, 1998a, b, 2000). All vectors were sequenced by ALF DNA sequencer (LKB-Pharmacia Biotech, Upsalla, Sweden). Restriction and modification enzymes were purchased either from Pharmacia Biotech or Gibco-BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA).

Cell culture, transfection and DNA labeling

All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and grown in suspension culture at 37°C in the presence of 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. Cell culture products were purchased from Gibco-BRL Life Technologies. Cesium chloride-purified pCEP4-HA-Bcl-xES and pCEP4-HA-mock vectors were transfected in Namalwa cells by electroporation at 0.27 kV (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA, USA). To obtain stable transfected lines, the cells were grown under hygromycin B selection at 1.5 mg/ml for 3 months prior to the experiments, as described elsewhere (Schmitt *et al.*, 1998a, b, 2000). For DNA labeling, Namalwa cells were grown with [¹⁴C]-thymidine (0.02 µCi/ml) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to drug treatment (Schmitt *et al.*, 1998a, b, 2000).

Expression studies by RT-PCR and ribonuclease protection assays

Total RNA was isolated from exponentially growing cells with TRIzol[®] reagent according to the manufacturer's procedure (Gibco-BRL Life Technologies), and first-strand cDNA was synthesized from 2.0 µg of RNA, employing Moloney murine leukemia virus RT (2.5 U) (Perkin-Elmer Biosystem, Branchburg, NJ, USA) with oligo dT(16) priming. cDNAs from normal tissues were procured from InVitrogen, bone marrow samples were acquired from biopsies of acute lymphocytic leukemia patients (Dr Yves Theoret, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Que., Canada) and colon adenocarcinoma samples were obtained through the US National Cancer Institute's Cooperative Human Tissue Network. Bcl-x cDNAs were amplified with 50 ng of the 5'-primer ATGTCTCAGAGCAACCGGGAG and 50 ng of the complementary 3'-primer TCATTCCG ACTGAAGAGTGA in a reaction mixture containing 200 µM dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), and 0.5 U Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Biosystem). The reaction mixtures were heated for 5 min at 95°C and amplified for 30 cycles with denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 45 s. The amplified products were electrophoresed on 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0) and transferred by capillarity to GeneScreen nylon membranes (Dupont-NEM Research Products, Boston, MA, USA). After DNA denaturation and fixation, blots were hybridized with purified human Bcl-xL

cDNA probe labeled with [³²P]-dCTP by a random priming procedure. Hybridizations were undertaken overnight at 42°C in a solution containing 2 × SSC, 2 × Denhart, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) formamide and 100 µg/ml salmon sperm DNA. The blots were washed for 30 min at 42°C in 0.1 × SSC and 0.1% (w/v) SDS, then for 45 min at 68°C in 0.05 × SSC and 0.05% (w/v) SDS. DNA was visualized by autoradiography on Kodak X-AR film. Isoform expression was confirmed by RNase protection assays in some samples. Specific [³²P]-dUTP-labeled Bcl-xES cRNA probes were generated with the MAXIscript SP6 and T7[®] kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) using, as template, the *SfiI* linearized pCRII plasmid containing Bcl-xES. The probes were eluted from 5% polyacrylamide urea gel after electrophoresis, hybridized with total RNA (10 µg) for 16 h, then digested with RNase A and T1. The protected fragments were precipitated and then separated on 5% polyacrylamide urea gel. RNA double strands were visualized by autoradiography on Kodak X-AR film. β-actin served as controls in the RT-PCR and RNase protection assays. Relative densitometry analysis of autoradiographs was based on integrated density values (IDV) using an AlphaImager 2000 scanner (Alpha innovatech, San Jose, CA, USA).

Subcellular fractionation, immunoprecipitation, crosslinking and Western blot analysis

To prepare whole-cell protein extracts, control and CPT-treated cells were collected by centrifugation and then homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 120 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, a cocktail of protease inhibitors (Complete[®], Roche Molecular Biochemicals, Laval, Que., Canada) and 10 µg/ml lactacystin. The supernatants were collected after centrifugation (10 000 g for 15 min at 4°C). For subcellular fractionation, the cells were first swelled in deionized water for 4 min on ice. The samples were adjusted to 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.4, and 1.0 mM EDTA (isotonic buffer), then dounced briefly on ice. Nuclei (1000 g, 15 min) and mitochondria (10 000 g, 15 min) were pelleted by sequential differential centrifugation. The supernatants were clarified further by centrifugation at 100 000 g for 60 min (S-100 fraction). For standard co-immunoprecipitations, cells were collected by centrifugation, washed twice with ice-cold PBS, and then homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM NaVO₄, 1% BSA, 1% nonidet P-40, 2 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinin) at 4°C for 30 min. The extracts were centrifuged and supernatants collected. For co-immunoprecipitation experiments performed from mitochondria-enriched fractions, untreated and CPT-treated Namalwa cells were swelled in deionized water for 4 min on ice, and the samples adjusted in isotonic buffer as above. The cells were disrupted by passing the samples 30-fold through a 26G 3/8 needle, with subsequent centrifugation at 1000 g for 15 min. The supernatant was centrifuged at 10 000 g for 15 min to obtain a mitochondria-enriched pellet. This mitochondrial pellet was resuspended in isotonic buffer containing 5 mM DSP crosslinker agent, and incubated for 30 min by rotation at room temperature. The crosslinking reaction was quenched by the addition of Tris (pH 7.5) to a final concentration of 50 mM, and incubated for an additional 15 min. After centrifugation at 10 000 g for 15 min, the supernatant containing DSP was discarded, and the mitochondrial pellet was lysed in buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 2% (w/v) CHAPS, 5% sucrose (w/v), a

cocktail of protease inhibitors (Complete[®], Roche Molecular Biochemicals) and 10 µg/ml lactacystin. After lysis and a final centrifugation step (10 000 *g* for 15 min at 4 °C), the supernatant was used as a mitochondria-enriched fraction.

Specific anti-HA monoclonal antibodies were added for 3 h, and immunocomplexes were captured and precipitated with protein A/G-sepharose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Antibodies against the peptide epitope derived from the HA protein of human influenza virus (clone 12CA5) were obtained from Roche Molecular Biochemicals, anti-Bcl-x mouse antibody (clone 44) was purchased from BD Transduction Laboratories (Mississauga, Ont., Canada), anti-cytochrome *c* mouse monoclonal antibody (clone 7H8.2C12) and anti-caspase-9 mouse monoclonal antibody (clone 2-22) were from BD PharMingen (Mississauga, Ont., Canada), anti-Bax rabbit polyclonal antibody (N-20) was from Santa Cruz Biotechnology, anti-Bak rabbit polyclonal antibody (06-536) was from Upstate Biotechnology, and anti-Apaf-1 monoclonal antibody (clone 94408.11) was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). In samples where the crosslinker agent was used, the covalent amide bonds created were cleaved by incubating the immunocomplexes in Leamml buffer containing 75 mM DTT for 30 min at 37 °C. After SDS-PAGE, the composition of the immunocomplexes was analysed by Western blotting. Enhanced chemiluminescence detection of peroxidase-labeled secondary antibodies was performed with Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) reagents.

DNA fragmentation assay

DNA filter elution assays were designed to monitor and quantitate DNA fragmentation associated with apoptosis (Bertrand *et al.*, 1991). 5×10^6 [¹⁴C]-Thymidine-labeled cells were loaded onto protein-adsorbing filters (vinyl/acrylic copolymer filters, Metrical membrane, 0.8-µm pore size, 25-mm diameter, Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI, USA), and washed with 5 ml of PBS. As soon as the washing solution dripped through by gravity, lysis was performed with 5 ml of lysis solution (2% SDS, 0.04 M EDTA, pH 10.0). After the lysis solution had dripped through by gravity, the filters were washed with 5 ml of 0.02 M EDTA (pH 10.0), and then processed as described earlier (Bertrand *et al.*, 1991). Briefly, they were placed in scintillation vials to which 1.0 ml of 1 N HCl was added. The vials were sealed and heated for 1 h at 60 °C to depurinate the DNA. Then, 2.5 ml of 0.4 N NaOH was added and allowed to stand for 1 h at room temperature to release labeled DNA from the filters. Radioactivity was counted in each fraction (loading wash, lysis, EDTA wash, filter) by liquid scintillation spectrometry. DNA fragmentation was determined as the DNA fraction in the loading wash fraction + lysis fraction + EDTA wash fraction relative to total DNA (loading wash + lysis + EDTA wash + filter). The results were expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in untreated cells (background) according to the formula

$$(F - F_0 / 1 - F_0) \times 100$$

where *F* and *F*₀ represent DNA fragmentation in treated and control cells, respectively.

LEHDase and DEVDase activity measurement

Cytosolic extracts were prepared by washing control and transfected Namalwa cells twice by centrifugation/resuspension

in 10 ml ice-cold PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺). The cells were then 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 (13 000 *g* for 10 min at 4 °C), and supernatants collected as cytosolic extracts. Caspase activities were measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence LS 50B fluorometer (Perkin-Elmer Biosystem) at an excitation wavelength of 400 nm and an emission wavelength of 505 nm for the substrate Ac-LEHD-AFC, and an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm for Ac-DEVD-AMC. Reactions were carried out in cuvettes, and temperature was maintained at 37 °C with a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH 7.5), 20% (v/v) glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 500 µM Ac-LEHD-AFC or 200 µM Ac-DEVD-AMC. In all, 200 µg of total cell extracts were used per assay. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg.

Yeast two-hybrid system

The MatchMaker LexA[®] two-hybrid system (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA) was employed according to the manufacturer's instructions. Bcl-xES and Bcl-xL deleted of their TM domains (Bcl-xES(ΔTM), Bcl-xL(ΔTM)) and the deletion mutants Bcl-xES(ΔBH2ΔTM) and Bcl-xES(ΔBH4ΔTM) were subcloned in the two-hybrid plasmid pLexA vector. All other cDNAs were cloned in the two-hybrid plasmid pB42AD, as described previously (Schmitt *et al.*, 2000). Sequential transformations were conducted by the lithium acetate method in yeast strain EGY48, and the cells were plated on histidine-deficient (for pLexA marker), tryptophan-deficient (for pB42AD marker) and histidine/tryptophan/leucine-deficient (for LEU2 reporter gene assay) minimal SD induction/selection media. pLexA p53, pLex Lam and pB42AD T from Clontech Laboratories served as positive and negative controls.

Gel filtration chromatography

Gel filtration chromatography was performed on a Superose 6-HR 16/50 column (Amersham-Pharmacia Biotech) connected to a FPLC system (LKB-Pharmacia Biotech) and calibrated with gel filtration standard proteins (Amersham Pharmacia Biotech), including ribonuclease A (13.7 kDa, 16.4 Å), chymotrypsinogen A (25 kDa, 20.9 Å), ovalbumin (43 kDa, 30.5 Å), albumin (67 kDa, 35.5 Å), aldolase (158 kDa, 48.1 Å), catalase (232 kDa, 52.2 Å), apoferritin (440 kDa, 61.0 Å) and thyroglobulin (669 kDa, 85 Å). Void volume corresponded to the elution of Blue Dextran 2000. Conditions were based on previously described methods with modifications (Cain *et al.*, 1999; Antonsson *et al.*, 2001). The equilibration, lysis and elution buffer contains 25 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.2 mM DDT, 2% (w/v) CHAPS, 5% sucrose (w/v) and a cocktail of protease inhibitors (Complete[®], Roche Molecular Biochemicals). To avoid Apaf-1 self-oligomerization during the lysis procedure, 10 mM ATP-γS was added to the lysis buffer. Cellular extracts were prepared from 5×10^8 control and CPT-treated cells. The soluble fractions after lysis (30 min on ice) and centrifugation (10 000 *g* for 15 min at 4 °C) were loaded onto the column in 500-µl volume. Elutions were performed at a flow rate of 500 µl/min, and fractions of 2.5 µl were collected at 5-min intervals. After chromatography, 80-µl aliquots of each fraction were analysed by Western blotting.

Recombinant Bcl-xES(Δ TM) protein and cell-free system

Human Bcl-xES cDNA without the sequences coding for its carboxyl hydrophobic domain (TM) was first amplified by PCR with specific adapter primers containing a *Nde*I sequence at the ATG start codon and a *Bam*HI sequence at the TAA added stop codon. The PCR product was inserted in the pCRII vector (TA cloning system; InVitrogen) and then subcloned in the bacterial expression vector pET-14b(+)-His-TAG (Novagen, Madison, WI, USA) between the *Nde*I and *Bam*HI sites. The vectors were sequenced by ALF DNA sequencer (LKB-Pharmacia Biotech), using both vector and internal primers. *E. Coli* BL21 (DE3) was transfected with purified plasmids, and recombinant protein expression was induced for up to 15 h by adding 100 μ M IPTG to exponentially growing bacteria at room temperature. The bacteria were collected by centrifugation, resuspended in 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9) and 6 M urea, then kept on ice for 1 h. After centrifugation at 39000 g for 20 min, the bacterial lysates were applied to a charged and equilibrated Chelating Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech) chromatography column. The column was then washed with 20 volumes of 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris HCl (pH 7.9) and 10 volumes of 50 mM imidazole, 0.5 M NaCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.9). The bound protein was eluted with 6 volumes of 1 M imidazole, 0.5 M NaCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.9). Fractions were collected, and the purity of the recombinant His8-Bcl-xES(Δ TM) protein preparations was determined by SDS-PAGE and Coomassie Blue R-250 staining (not shown). Fractions of interest were pooled and concentrated/dialysed several times in UltrafreeTM-MC (5000 NMWL) centrifugal filter devices (Millipore, Bedford, MA, USA) prior to use.

For the cell-free system, cell extracts were generated from U-937 cells as described elsewhere (Droin *et al.*, 2000). 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 μ g/ml leupeptin and 2 μ g/ml aprotinin prior to dounce-type cell homogenization. After centrifugation at 15000 g for 15 min at 4 °C, the supernatants were collected and

frozen at -80 °C. In the cell-free system, caspase activation was initiated by adding 50 μ g/ml cytochrome *c* and 1.0 mM dATP in 200 μ g cell-free extract per assay in the absence or presence of various amounts of purified recombinant His8-Bcl-xES(Δ TM) protein. Caspase-9 activities were monitored continuously by monitoring fluorescence in a dual luminescence LS 50B fluorometer (Perkin-Elmer Biosystem) at an excitation wavelength of 400 nm and an emission wavelength of 505 nm, with Ac-LEHD-AFC as substrate.

Abbreviations

Ac-DEVD-AMC, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin; Ac-LEHD-AFC, Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin; ANT, adenine nucleotide translocator; ATP- γ S, adenosine 5'-O-(γ -thiotriphosphate); BH, Bcl-2 homology domain; cisPT, *cis*-platinum(II) diammine dichloride; CPT, 20-S-camptothecin lactone; DSP, dithiobis[succinimidylpropionate]; HA-tag, hemagglutinin epitope tag sequences; HSP, heat shock protein; LOOP, long flexible loop domain; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; TM, transmembrane domain; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; VDAC, voltage-dependent anion channel; VP-16, etoposide; $\Delta\psi_m$, mitochondrial inner transmembrane potential.

Acknowledgements

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society to RB. RB is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. CP obtained a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Dr Yves Théoret (Hôpital Sainte Justine, Montreal, Que.) for providing bone marrow samples from acute lymphoblastic leukemia patients and Mr Ovid Da Silva (Research Support Office, Centre de recherche, CHUM) for editing this manuscript.

References

- Adams JM and Cory S. (2001). *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 61-66.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R and Martinou JC. (1997). *Science*, **277**, 370-372.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B and Martinou JC. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 11615-11623.
- Apte SS, Mattei MG and Olsen BR. (1995). *Genomics*, **26**, 592-594.
- Ban J, Eckhart L, Weninger W, Mildner M and Tschachler E. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 147-152.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR. (2000). *Nat. Cell Biol.*, **2**, 469-475.
- Bernardi P, Broekemeier KM and Pfeiffer DR. (1994). *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 509-517.
- Bertrand R, Sarang M, Jenkin J, Kerrigan D and Pommier Y. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 6280-6285.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G and Thompson CB. (1993). *Cell*, **74**, 597-608.
- Borner C, Martinou I, Mattmann C, Irmeler M, Schaerer E, Martinou JC and Tschopp J. (1994). *J. Cell. Biol.*, **126**, 1059-1068.
- Bottero V, Rossi F, Samson M, Mari M, Hofman P and Peyron JF. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 21317-21324.
- Brucy JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E and Garrido C. (2000). *Nat. Cell Biol.*, **2**, 645-652.
- Cain K, Brown DG, Langlais C and Cohen GM. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 22686-22692.
- Chao DT and Korsmeyer SJ. (1998). *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 395-419.
- Chaudhary D, Orourke K, Chinnaiyan AM and Dixit VM. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 17708-17712.
- Cheng EH-YA, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T and Korsmeyer SJ. (2001). *Mol. Cell*, **8**, 705-711.
- Chinnaiyan AM, Orourke K, Lane BR and Dixit VM. (1997). *Science*, **275**, 1122-1126.
- Conus S, Rosse T and Borner C. (2000). *Cell. Death Differ.*, **7**, 947-954.
- de Moissac D, Zheng H and Kirshenbaum LA. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 29505-29509.

- Droin N, Beauchemin M, Solary E and Bertrand R. (2000). *Cancer Res.*, **60**, 7039–7047.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X. (2000). *Cell*, **102**, 33–42.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B and Martinou JC. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 929–935.
- Franke TF and Cantley LC. (1997). *Nature*, **390**, 116–117.
- Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP and Solary E. (1999). *FASEB J.*, **13**, 2061–2070.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ and Shore GC. (1998). *J. Cell. Biol.*, **143**, 207–215.
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C and Hickman JA. (1999). *J. Cell. Biol.*, **144**, 903–914.
- Gross A, Jockel J, Wei MC and Korsmeyer SJ. (1998). *EMBO J.*, **17**, 3878–3885.
- Guo B, Godzik A and Reed JC. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 2780–2785.
- Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T and Reed JC. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 11962–11969.
- Haraguchi M, Torii S, Matsuzawa S, Xie Z, Kitada S, Krajewski S, Yoshida H, Mak TW and Reed JC. (2000). *J. Exp. Med.*, **191**, 1709–1720.
- Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, Adams JM and Huang DC. (2000). *J. Cell. Biol.*, **149**, 623–634.
- He HL, Hershberger PA and McCarthy SA. (1998). *J. Immunol.*, **161**, 1169–1175.
- Hsu SY and Hsueh AJW. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 30139–30146.
- Hsu YT, Wolter KG and Youle RJ. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3668–3672.
- Hu YM, Benedict MA, Wu DY, Inohara N and Nunez G. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4386–4391.
- Huang DCS, Adams JM and Cory S. (1998). *EMBO J.*, **17**, 1029–1039.
- Hunter JJ, Bond BL and Parslow TG. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 877–883.
- Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia L, Koseki T, Hu YM, Chen S and Nunez G. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 32479–32486.
- Jia L, Patwari Y, Srinivasula SM, Newland AC, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES and Kelsey SM. (2001). *Oncogene*, **20**, 4817–4826.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD. (1997a). *Science*, **275**, 1132–1136.
- Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR and Newmeyer DD. (1997b). *EMBO J.*, **16**, 4639–4649.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH. (2000). *Cell. Death Differ.*, **7**, 1166–1173.
- Kroemer G. (1997). *Nat. Med.*, **3**, 614–620.
- Kroemer G and Reed JC. (2000). *Nat. Med.*, **6**, 513–519.
- Li HL, Zhu H, Xu CJ and Yuan JY. (1998). *Cell*, **94**, 491–501.
- Li LY, Luo X and Wang X. (2001). *Nature*, **412**, 95–99.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X. (1997). *Cell*, **91**, 479–489.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR and Thompson CB. (2000). *Mol. Cell.*, **6**, 1389–1399.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang XD. (1998). *Cell*, **94**, 481–490.
- Makin GW, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA and Dive C. (2001). *EMBO J.*, **20**, 6306–6315.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HLA, Prevost MC, Xie ZH, Matsuyama S, Reed JC and Kroemer G. (1998). *Science*, **281**, 2027–2031.
- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA and Saikumar P. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 18361–18374.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M and Thompson CB. (1997). *Nature*, **385**, 353–357.
- Moriishi K, Huang DC, Cory S and Adams JM. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9683–9688.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettekheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SC and Fesik SW. (1996). *Nature*, **381**, 335–341.
- Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT and Youle RJ. (1999). *EMBO J.*, **18**, 2330–2341.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH and Youle RJ. (2001). *J. Cell. Biol.*, **153**, 1265–1276.
- Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM and Green DR. (2000). *Cell. Death Differ.*, **7**, 402–407.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S and Huang DCS. (1998). *EMBO J.*, **17**, 384–395.
- Oltvai ZN, Millman CL and Korsmeyer SJ. (1993). *Cell*, **74**, 609–619.
- Pan GH, O'Rourke K and Dixit VM. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 5841–5845.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X and Xue D. (2001). *Nature*, **412**, 90–94.
- Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA and Kinnally KW. (2001). *J. Cell. Biol.*, **155**, 725–732.
- Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES and Shi Y. (1999). *Nature*, **399**, 549–557.
- Reed JC. (1997). *Nature*, **387**, 773–776.
- Salch A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD and Alnemri ES. (2000). *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 476–483.
- Schendel SL, Xie ZH, Montal MO, Matsuyama S, Montal M and Reed JC. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5113–5118.
- Schmitt E, Cimoli G, Steyaert A and Bertrand R. (1998a). *Exp. Cell Res.*, **240**, 107–121.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J and Bertrand R. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 868–879.
- Schmitt E, Steyaert A, Cimoli G and Bertrand R. (1998b). *Cell. Death Differ.*, **5**, 506–516.
- Seshagiri S and Miller LK. (1997). *Curr. Biol.*, **7**, 455–460.
- Shi B, Triebe D, Kajiji S, Iwata KK, Bruskin A and Mahajna J. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 779–785.
- Shibasaki F, Kondo E, Akagi T and McKeon F. (1997). *Nature*, **386**, 728–731.
- Shimizu S, Konishi A, Kodama T and Tsujimoto Y. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3100–3105.
- Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y. (1999). *Nature*, **399**, 483–487.
- Shimizu S and Tsujimoto Y. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 577–582.
- Song QZ, Kuang YP, Dixit VM and Vincenz C. (1999). *EMBO J.*, **18**, 167–178.
- Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ and Hengartner MO. (1997). *Nature*, **385**, 653–656.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. (1998). *Mol. Cell.*, **1**, 949–957.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM and Kroemer G. (1999a). *J. Exp. Med.*, **189**, 381–393.

- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G. (1999b). *Nature*, **397**, 441–446.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M and Kroemer G. (1996). *J. Exp. Med.*, **184**, 1331–1341.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K and Takahashi R. (2001). *Mol. Cell.*, **8**, 613–621.
- Tsujimoto Y and Croce CM. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5214–5218.
- U M Miyashita T, Shikama Y, Tadokoro K and Yamada M. (2001). *FEBS Lett.*, **509**, 135–141.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL. (2000). *Cell*, **102**, 43–53.
- Wang HG, Rapp UR and Reed JC. (1996). *Cell*, **87**, 629–638.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB and Korsmeyer SJ. (2000). *Genes Dev.*, **14**, 2060–2071.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ. (2001). *Science*, **292**, 727–730.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG and Youle RJ. (1997). *J. Cell Biol.*, **139**, 1281–1292.
- Wu DY, Wallen HD, Inohara N and Nunez G. (1997a). *J. Biol. Chem.*, **272**, 21449–21454.
- Wu DY, Wallen HD and Nunez G. (1997b). *Science*, **275**, 1126–1129.
- Yang E and Korsmeyer SJ. (1996). *Blood*, **88**, 386–401.
- Yang J, Liu XS, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai JY, Peng TI, Jones DP and Wang XD. (1997a). *Science*, **275**, 1129–1132.
- Yang XF, Weber GF and Cantor H. (1997b). *Immunity*, **7**, 629–639.
- Yin XM, Oltval ZN and Korsmeyer SJ. (1994). *Nature*, **369**, 321–323.
- Zhang H, Heim J and Meyhack B. (1999). *FEBS Lett.*, **448**, 23–27.
- Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK and Yin XM. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 27432–27440.
- Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R and Bitler CM. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 11930–11936.
- Zhou P, Chou J, Olca RS, Yuan J and Wagner G. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11265–11270.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR and Thompson CB. (2001). *Genes Dev.*, **15**, 1481–1486.
- Zoratti M and Szabo I. (1996). *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 543–553.
- Zou H, Henzel WJ, Liu XS, Lutschg A and Wang XD. (1997). *Cell*, **90**, 405–413.

7.3 Annexe III Characterization of Bax- σ , a cell death-inducing isoform of Bax
(*Biochem Biophys Res Commun*, vol.270(3): 868-79,2000)

Characterization of Bax- σ , a Cell Death-Inducing Isoform of Bax

Estelle Schmitt, Claudie Paquet, Myriam Beauchemin,
Jessica Dever-Bertrand, and Richard Bertrand¹

Research Centre of the University of Montreal Hospital Centre, Notre Dame Hospital,
Montreal Cancer Institute, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1

Received March 18, 2000

The *Ced-9/Bcl*-like family of genes codes for proteins that have antiapoptotic and proapoptotic activity. Several Bax isoproteins have been detected by 2-D gel electrophoresis, and a novel human member, designated as Bax- σ , has been identified and cloned from human cancer promyelocytic cells. Bax- σ contains BH-3, BH-1, and BH-2 domains, putative α -5 and α -6 helices, and the carboxy-terminal hydrophobic transmembrane domain but lacks amino acids 159 to 171 compared to Bax- α . mRNA expression analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction and RNase protection assays have revealed that Bax- σ is expressed in a variety of human cancer cell lines and normal tissues. To investigate the potential role of Bax- σ in apoptosis, first its effects were compared to those of Bax- α by transient expression in human B lymphoma Namalwa cells. Both Bax- σ and Bax- α promoted apoptosis, as detected by DNA fragmentation and morphological analysis by electron microscopy. The apoptosis induced by Bax- σ and Bax- α was correlated with their expression, cytochrome *c* release, and caspase activation. In a yeast two-hybrid system, Bax- σ interacted with several *Ced-9/Bcl* family members but had no affinity for the human *Egl-1* homologs *Bik* and *Bad* and the *Ced-4* homolog *Apaf-1*. In human cells, Bax- σ function was counteracted by *Bcl-xL* overexpression, and co-immunoprecipitation experiments indicated that Bax- σ was associated with *Bcl-xL*. Furthermore, Bax- σ overexpression increased cell death

Abbreviations used: MPT, mitochondrial permeability transition; $\Delta\psi_m$, mitochondrial inner transmembrane potential; ANT, adenine nucleotide translocator; VDAC, voltage-dependent anion channel; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; HA-tag, hemagglutinin epitope tag sequences; Ac-DEVD-AMC, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin; CPT, 20-S-camptothecin lactone; VP-16, etoposide; VINB, vinblastine; Taxol, paclitaxel; cisPT, cisplatinum(II) diammine dichloride.

¹ To whom correspondence should be addressed at Research Centre of the University of Montreal Hospital Centre (CHUM), Notre-Dame Hospital, Montreal Cancer Institute (Room Y-5634), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1. Fax: (514) 896 4689. [REDACTED]

induced by various concentrations of genotoxic agents with the most pronounced effect occurring at low camptothecin and vinblastine dose levels. Our results suggest that Bax- σ , a novel variant of Bax, encodes a protein with a proapoptotic effect and mode of action similar to those of Bax- α . © 2000 Academic Press

Key Words: Bax; mitochondria; caspase; DNA damage; apoptosis.

Pro- and antiapoptotic proteins of the *Bcl-2* family play a critical role in controlling mitochondrial permeability transition (MPT), maintenance of mitochondrial inner transmembrane potential ($\Delta\psi_m$), cellular redox equilibrium and caspase activation during apoptosis (1–3). Although these proteins are found in the cytosol, most of them have a transmembrane domain that stabilizes them for intracellular membranes, primarily the outer mitochondrial membrane, endoplasmic reticulum and nuclear envelope (4–6).

Bax was the first described pro-apoptotic member of the family, and mRNA expression analysis showed its wide expression and splicing pattern that vary between lineages and cell types (7). Bax- α mRNA contains exon-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and encodes a protein of 192 amino acids that has BH-3, BH-2, and BH-1 domains, putative α -5 and α -6 helices and the carboxy-terminal hydrophobic transmembrane domain (TM) (7). Bax- γ mRNA contains exon-1, -3, -4, -5 and -6 and differs by an alternative splicing of intron-5; the absence of exon-2 leads to a translational frameshift, resulting in a protein of 41 amino acids that lacks all the known functional domains of Bax- α (7). Bax- β mRNA contains exon-1, -2, -3, -4, -5, intron-5 and exon-6; the resulting protein contains 218 amino acids and lacks the COOH terminus domain due to the presence of a stop codon within the coding sequence of intron-5 (7). Bax- δ lacks exon-3 but contains all the others and retains the same reading frame; the protein contains 143 amino acids and lacks the BH-3 domain

(8). Bax- ω mRNA contains exon-1, -2, -3, -4, -5, an unspliced intron-5 and exon-6; the resulting protein contains 221 amino acids and lacks the COOH-terminus domain due to a translational frameshift (9). Finally, Bax- ϵ lacks the BH2 and the transmembrane domain (10). The presence of 18- and 16-kDa proteins, abundant in B-cell chronic lymphocytic leukemia and hemopoietic tissues, has been detected using anti-Bax antibodies (11, 12).

Extensive work has been done so far to understand the function and mode of action of Bax- α in mediating apoptosis. Bax- α itself can induce cell death when it is overexpressed. Moreover, overexpressed Bax- α accelerates apoptotic cell death following exposure to various death stimuli and can counteract the anti-apoptotic activity of Bcl-2 (7, 13). Currently available data suggest that ordered balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic activities of the Bcl-2 protein family regulates the decision of a cell to survive or die, forming a checkpoint upstream of mitochondrial dysfunction and caspase activation (1, 7). Redistribution of Bax- α from the cytosol to the mitochondria after exposure to cell death stimuli has been suggested as an important change promoting cell death (14–17).

Bax- α overexpression is associated with mitochondrial dysfunction that includes cytochrome *c* release and, in some instance, loss of $\Delta\psi_m$ (16, 18–20). Three-dimensional structure analysis of Bcl-xL suggests that some Bcl-related proteins, such as Bax- α , may possess pore- or channel-forming activity (21–25). When added to artificial membrane bilayers, Bax- α can form pore-channels with several levels of conductance and ion selectivity that can be impeded by Bcl-2 (23).

More recent observations have revealed that Bax- α binds to mitochondrial permeability transition pore complexes (MPTP) and cooperates with adenine nucleotide translocator protein (ANT) to increase mitochondrial membrane permeability and potentially transduce cell death (26). In reconstituted liposomes that contain the mitochondrial porin channel or voltage-dependent anion channel (VDAC), Bax- α accelerates VDAC opening in a manner that permits cytochrome *c* to pass directly through VDAC (20). In contrast, other studies have indicated that Bax- α -induced cytochrome *c* release is independent of MPTP but highly dependent on Mg^{2+} ions (27). Some have shown that the mitochondrial F_0F_1 -ATPase proton pump is also required for Bax- α to transduce cell death (28). Much less is known about the mechanism of action and functional role of the other Bax isoforms, including Bax- γ , Bax- β , Bax- δ and Bax- ϵ . Recently, Bax- ω was shown to increase basal cell death at a level similar to that of Bax- α but did not appear to potentiate death induced by other stimuli (9).

In this paper, we report the identification of several Bax isoproteins by 2-D gel electrophoresis and cloning of Bax- σ , a novel isoform of Bax expressed in a variety

of human tissues and cancer cell lines. Bax- σ has a structure very similar to that of Bax- α with the exception of a fragment of 13 amino acids located between the BH-2 domain and the TM.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Radioactive precursors [α - ^{32}P]dCTP (>3000 Ci/mmol), [α - ^{32}P]dUTP (800 Ci/mmol) and [2 - ^{14}C]thymidine (59 mCi/mmol) were obtained from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). 20-S-camptothecin lactone, etoposide, vinblastine, paclitaxel and cisplatinum(II) diammine dichloride were purchased from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and dissolved in dimethyl sulfoxide (at 10 mmol/L) prior to each experiment. The fluorogenic peptide derivative Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) was bought from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA). Hygromycin B was obtained from Boehringer Mannheim (Laval, Quebec). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma and ICN or from local sources.

cDNA cloning of human Bax- α and Bax- σ . Human Bax- α and Bax- σ cDNAs were cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from mRNA obtained from human HL-60 cells using specific adapter primers containing *NotI* sequences at the ATG start codon (5'-GCGGCCGCATGGACGGGTCCGGGGAGCAG) and TGA stop codon (complementary 3'-GCGGCCGCTCAGCCCATCTTCTCCAGAT). The amplified fragments were first cloned in pCRII vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then subcloned at the *NotI* restriction site in the eukaryotic expression vector pCEP4 (Invitrogen) modified to include consensus Kosak and hemagglutinin epitope Tag sequences (HA-tag) (29, 30). All vectors were sequenced by ALF DNA sequencer (LKB-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Restriction and modification enzymes were purchased either from Pharmacia Biotech or Gibco-BRL Life Technologies (Grand Island, NY).

Cell culture, transfection and DNA labeling. All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and grown in suspension culture at 37°C in the presence of 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cell culture products were purchased from Gibco-BRL Life Technologies. Cesium chloride-purified pCEP4-HA-Bax- α , pCEP4-HA-Bax- σ , pCDNA3-Bcl-xL-myc, pCDNA3-mock-myc and pCEP4-HA-mock vectors were transfected in Namalwa cells and/or Namalwa cells overexpressing Bcl-xL (30) by electroporation at 0.27 kV (Gene Pulser, Bio-Rad, Hercules, CA). To obtain stable transfected lines, the cells were grown under hygromycin B selection at 1.5 mg/ml for 3 months prior to the experiments, as described elsewhere (29, 30). For DNA labeling, Namalwa cells were grown with [^{14}C]thymidine (0.02 μ Ci/ml) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to electroporation or drug treatment (51).

Protein extracts, subcellular fractionation, co-immunoprecipitation, and Western blot analysis. For sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), control and transfected cells were collected by centrifugation, washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), then homogenized in a lysis buffer containing 5 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (Hepes), pH 7.4, 160 mM KCl, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.5% NP-40 and a cocktail of protease inhibitors (Complete, Boehringer Mannheim) at 4°C for 30 min with gentle agitation. After centrifugation (10,000g, 10 min), the supernatants were collected as protein extracts.

For 2-D gel electrophoresis, lysis was performed in buffer containing 8.8 M urea, 2% Triton, 0.25 M β -mercaptoethanol, 8.0 mM PMSF and a mixture of Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Isoelectric focusing (IEF) was run on Immobiline

DryStrip gel (pH 3–10) with rehydration in appropriate IPG buffer using a Multiphor II apparatus according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Following IEF, the second dimension was run on ExcelGel SDS, gradient 8–18% (Amersham Pharmacia Biotech). For subcellular fractionation, Namalwa cells were first swelled in deionized water for 4 min on ice. The samples were then adjusted to 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Hepes, pH 7.4, and 1.0 mM EDTA and dounced briefly on ice. Nuclei (1000g, 15 min) and mitochondria (10,000g, 15 min) were pelleted by sequential differential centrifugation. The supernatants were clarified further by centrifugation at 100,000g for 60 min (S-100 fraction) (31).

For immunoprecipitation, whole cell extracts were prepared in PBS containing 1 mM PMSF, 1 mM DTT and 1.0% NP-40. Specific anti-HA or anti-myc monoclonal antibodies were added for 3 h and immunocomplexes were captured with protein A/G-Sepharose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Antibodies against the peptide epitope derived from the hemagglutinin protein of human influenza virus (HA) (clone 12CA5) were obtained from Boehringer Mannheim, and anti-myc tag antibodies (R950-25) from InVitrogen. Affinity-purified antibodies to human Bax (P-19 and P-20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc., and antibodies to cytochrome *c* (clone 7H8.2C12) were procured from PharMingen (San Diego, CA). Enhanced chemiluminescence (ECL) detection of peroxidase-labeled secondary antibodies was performed using Amersham Life Science reagents.

Expression studies by RT-PCR and ribonuclease protection assays. Total RNA was isolated from exponentially growing cells with TRIzol reagent according to the manufacturer's procedure (Gibco-BRL), and first strand cDNA was synthesized from 2.0 μ g of RNA employing Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (2.5 U) (Perkin-Elmer Biosystem, Branchburg, NJ) with oligo dT (16) priming. cDNA from normal tissues was obtained from InVitrogen. Bax cDNAs were amplified with 50 ng of 5'-primer ATGGACG GGTCCGGGAGCAG and 50 ng of complementary 3'-primer TCAGCCATCTTC TTCCAGAT in a reaction mixture containing 200 μ M dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Biosystem). The reaction mixtures were heated for 5 min at 95°C and amplified for 30 cycles with denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 45 s. The amplified products were electrophoresed on a 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0) and transferred by capillarity to GeneScreen nylon membranes (Dupont-NEM Research Products, Boston, MA). After DNA denaturation and fixation, blots were hybridized with purified human Bax- α cDNA probe labeled with [α -³²P]dCTP by a random priming procedure. Hybridizations were undertaken overnight at 42°C in a solution containing 2 \times SSC, 2 \times Denhart, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) formamide and 100 μ g/ml salmon sperm DNA. The blots were washed for 30 min at 42°C in 0.1 \times SSC and 0.1% (w/v) SDS, then for 45 min at 68°C in 0.05 \times SSC and 0.05% (w/v) SDS. DNA was visualized by autoradiography on Kodak X-AR film.

Expression of the isoforms was confirmed by RNase protection assays in some samples. Specific [α -³²P]dUTP-labeled Bax- σ and Bax- α cRNA probes were prepared using the MAXIscript SP6 and T7 kit (Ambion, Inc., Austin, TX) and eluted from 5% polyacrylamide urea gel after electrophoresis. These probes were hybridized with total RNA (10 μ g) for 16 h, then digested with RNase A and T1. The protected fragments were precipitated and then separated on 5% polyacrylamide urea gel. RNA double strands were visualized by autoradiography on Kodak X-AR film. β -Actin was used as control in the RT-PCR and RNase protection assays.

Yeast two-hybrid system. The MatchMaker LexA two-hybrid system (Clontech Laboratories Inc, Palo Alto, CA) was employed according to the manufacturer's instructions. Bax- σ deleted of its transmembrane domain, Bax- σ (Δ TM), was subcloned in the two-hybrid plasmid pLexA vector. The Bcl family members Bcl-xL(Δ TM), Bcl-xS(Δ TM), Bcl-xES(Δ TM), Bfl-1(Δ TM), Bax- α (Δ TM), Bax- σ (Δ TM),

Bax- κ (Δ TM), Bak(Δ TM), Bok(Δ TM), the human Egl-1 homolog Bik(Δ TM), Bad, and the human Ced-4 homolog Apaf-1 were subcloned in the two-hybrid plasmid pB42AD. Sequential transformations were conducted by the lithium acetate method in yeast strain EGY48, and the cells were plated on histidine-deficient (for pLexA marker), tryptophan-deficient (for pB42AD marker) and histidine/tryptophan/leucine-deficient (for LEU2 reporter gene assay) minimal SD induction/selection media. Apaf-1 cDNA was obtained from Dr. X. Wang (University of Texas Southwestern Center, Dallas TX) (36), Bok cDNA from Dr. A. J. W. Hsueh (Stanford University Medical School, Stanford CA) (52), Bad cDNA from Dr. S. J. Korsmeyer (Washington Medical School of Medicine, St. Louis MO) (53), Bfl-1 and Bik cDNAs from Dr. G. Chinnadurai (St. Louis University Medical Center, St. Louis, MO) (54, 55), and Bak cDNA from Dr. G. I. Evan (Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK) (56). All the others were cloned previously in our lab (30, 42, 57). pLexA p53, pLex Lam, and pB42AD T from Clontech Laboratories served as positive and negative controls.

DNA filter elution assay. DNA filter elution assays were designed to monitor and quantitate DNA fragmentation associated with apoptosis (51). 5×10^6 [¹⁴C]Thymidine-labeled cells were loaded onto protein-adsorbing filters (vinyl/acrylic copolymer filters, Metrical membrane, 0.8- μ m pore size, 25-mm diameter, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI), and then washed with 5 ml of PBS. As soon as the washing solution dripped through by gravity, lysis was performed with 5 ml of lysis solution (0.2% sodium sarkosyl, 2 M NaCl, 0.04 M EDTA, pH 10.0). After the lysis solution has dripped through by gravity, the filters were washed with 5 ml of 0.02 M EDTA (pH 10.0). They were then processed as described (58).

Briefly, they were placed in scintillation vials to which 1.0 ml of 1 N HCl was added. The vials were sealed and heated for 1 h at 60°C to deperinate the DNA. Then, 2.5 ml of 0.4 N NaOH was added and allowed to stand for 1 h at room temperature to release labeled DNA from the filters. Radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry in each fraction (loading wash, lysis, EDTA wash, filter). DNA fragmentation was determined as the fraction of DNA in the loading wash fraction + lysis fraction + EDTA wash fraction relative to total DNA (loading wash + lysis + EDTA wash + filter). The results were expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in untreated cells (background) using the formula $(F - F_0/1 - F_0) \times 100$, where F and F_0 represent DNA fragmentation in treated and control cells, respectively (58).

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis. To visualize oligonucleosome-sized DNA fragments, at specified times after drug treatment, cellular DNA was extracted by a salting-out procedure, as described previously (59). Electrophoresis was performed in 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0). After electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining.

DEVDase activity determination. Cytosolic extracts were prepared by washing control and transfected Namalwa cells twice by centrifugation/resuspension in 10 ml ice-cold PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺). The cells are then homogenized at 4°C for 30 min in a 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 (13,000g for 10 min at 4°C), and supernatants collected as cytosolic extracts. Caspase activities were 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. Reactions were carried out in cuvettes, and temperature was maintained at 37°C with a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM Hepes (pH 7.5), 20% (v/v) glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 100 μ M fluorogenic peptides. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg (60).

Electron microscopy. The cells were centrifuged at 400g for 10 min and washed in ice-cold PBS. They were fixed in 0.1 M Millonig's phosphate buffer (pH 7.4, 292 mOsm) containing 2.5% glutaraldehyde, stained with 2% uranyl acetate, and dehydrated with several ethanol treatments. Sections (500 to 700 Å) were mounted on copper grids and stained with lead citrate (61). The samples were examined by transmission electron microscopy using a Zeiss Em10 CA microscope (JFE Enterprises, Brookeville, MD).

RESULTS

Bax- σ is a novel splice variant of Bax. Several studies have strongly suggested the presence of various Bax isoforms (7–9, 11, 12). On SDS-PAGE (10–18% gradient) under reducing and denaturing conditions, several species of Bax protein were detected. Multiple Bax isoproteins were resolved following 2-D gel electrophoresis under reducing and denaturing conditions and immunoblotting (Fig. 1). Two Bax isoproteins possessed closed molecular weights of approximately 21- and 20-kDa and similar isoelectric points, approximately between pH 6.2 and 6.8 (Fig. 1).

In a search for novel Bax variants, cDNAs were obtained by RT-PCR using specific adapter primers of Bax- α at the ATG start codon and TGA stop codon. An amplified fragment of 540 bp was resolved from the 579-bp fragment coding for Bax- α by electrophoresis on 2% agarose gel, cloned and sequenced. Bax- σ contained exon-1, -2, -3, -4, -5 and a portion of exon-6 including sequences coding for the transmembrane domain. A 39-bp segment was spliced starting at the exon-5/exon-6 border. This deletion in a portion of exon-6 resulted in a protein that lacked amino acids 159 to 171 of Bax- α . These amino acids consisted of a small segment of Bax- α with unknown function, between the BH-2 and carboxy-terminal transmembrane domains. However, the reading frame of Bax- σ was unaffected and the C-terminal of the protein remained identical to that of Bax- α and contained the membrane anchor domain. Bax- σ contained also BH-3, BH-1, BH-2 domains and putative α -5 and α -6 helices (Fig. 2). First identified and cloned from human promyelocytic HL-60 cells, Bax- σ mRNA expression was investigated in various human cell lines and tissues by nonquantitative RT-PCR and ribonucleotidase protection assays. Table 1 summarizes the detection of Bax- α and Bax- σ in 23 human cancer cell lines and 8 normal human tissues of various origins. We found that Bax- σ had a pattern of expression almost identical to that of Bax- α .

Transient expression of Bax- σ in human B lymphoma Namalwa cells. To investigate the death-inducing activity of Bax- σ , first, we used a transient transfection assay in human B lymphoma Namalwa cells. Bax- σ and Bax- α cDNAs were subcloned in a modified pCEP4 expression vector that contained consensus Kosak and hemagglutinin epitope tag sequences (HA-tag) (29, 30). As seen in Fig. 3A, the expression of both Bax- σ and Bax- α proteins can be detected 24 h after transfection.

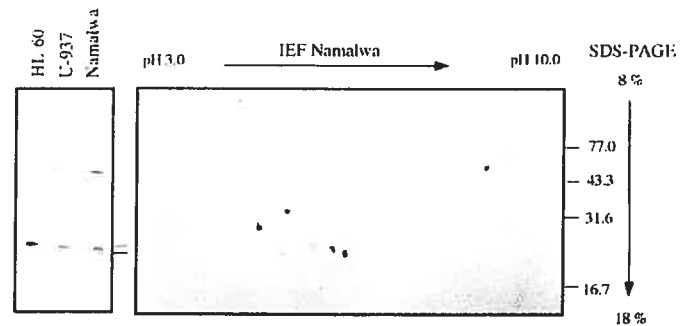


FIG. 1. Expression of Bax variants by SDS-PAGE and 2-D gel electrophoresis. (Left panel) Cell extracts were prepared from human HL-60, U-937 and Namalwa lines. Following SDS-PAGE on a 10–18% gradient under reducing and denaturing conditions and Western blotting, Bax variants were detected using anti-Bax polyclonal antibodies (P-19). Visualization was performed by enhanced chemiluminescence (ECL) and autoradiography. (Right panel) Protein extracts were prepared from Namalwa cells, and the first dimension (IEF) was run on Immobiline DryStrip gel (pH 3–10) using Multiphor II at 3500 V, 2.0 mA and 5 W for 8 h. Following IEF, the second dimension was run on ExcelGel SDS, gradient 8–18%. Bax variants were detected using anti-Bax polyclonal antibodies (P-20) and visualization was performed by ECL.

Protein expression increased 48 h post-transfection and remained stable for at least 96 h.

The kinetics of DNA fragmentation were monitored and quantitated by filter DNA elution assay. Transfection of Namalwa cells with Bax- σ and Bax- α induced DNA fragmentation in these cells as early as 24 h post-transfection, and the extent of DNA fragmentation increased with time (Fig. 3B). In cells transfected with a mock vector, no significant DNA fragmentation was observed until 48 h post-transfection (Fig. 3B). To confirm the specificity of the DNA fragmentation observed by the filter DNA elution assay, we visualized the intensity of the oligonucleosome-sized DNA fragments by agarose gel electrophoresis at specific times after transfection. Figure 3C shows that the DNA fragmentation pattern induced by Bax- σ and Bax- α was typical of apoptosis, with digestion of chromatin visualized as an oligonucleosome-sized DNA ladder on ethidium bromide-stained agarose gel. This oligonucleosome-sized DNA fragmentation pattern did not appear clearly in mock-transfected cells.

Activation of an apoptotic protease cascade is known to be a critical step in apoptosis induced by various death stimuli, including overexpression of pro-apoptotic proteins such as Bax- α . Several cysteine proteases, known as caspases, play a central role in the execution phase of apoptosis. In the mitochondrial pathway of caspase activation, mitochondrial volume dysregulation with matrix swelling, in response to death stimuli, leads to outer mitochondrial membrane rupture, loss of the mitochondrial voltage gradient and translocation of intermembrane proteins such as cytochrome *c* to the cytosol (31–35). The release of cyto-

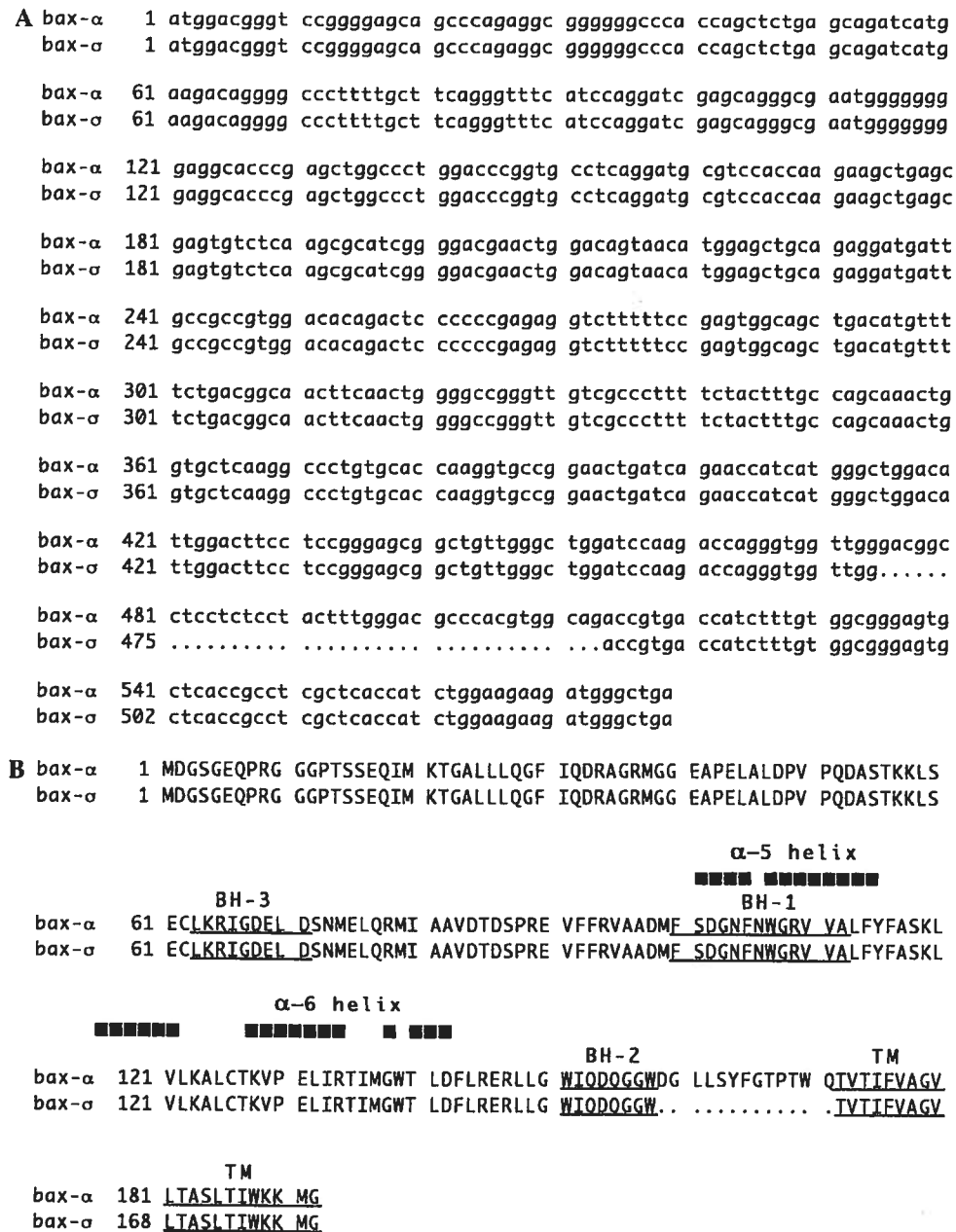


FIG. 2. Bax- σ is a novel member of the Bax gene. (A) Nucleotide sequence alignment of Bax- σ compared to Bax- α . These sequence data are available from GenBank (Accession No. AF247393). (B) Amino acid sequence alignment. BH-3, BH-1, BH-2 domains, putative α -5 and α -6 helices and the COOH-terminal hydrophobic domain are indicated.

chrome *c* allows Apaf-1/pro-caspase-9 interactions that result in the activation of caspase-9 which, in turn, activates directly effector caspase-3 and -7 (36–38).

The biochemical mechanism by which Bax- α promotes cell death remains elusive. However, Bax- α may have membrane pore or ion channel activity; it induces loss of mitochondrial membrane potential, cytochrome *c* release and caspase activation (18, 23, 26, 35, 39). Bax- α may act also as a docking protein by binding to and antagonizing anti-apoptotic members such as

Bcl-xL and Bcl-2 (40). To elucidate the mechanism of action of Bax- σ in mediating apoptosis, caspase activity and cytochrome *c* release from the mitochondria to the cytosol were monitored in Bax- σ - and Bax- α -transfected Namalwa cells. The kinetics of DEVDase activity were monitored using the specific fluoropeptide derivative Ac-DEVD-AMC as substrate. Figure 3D shows that DEVDase activity was detected rapidly in Bax- σ - and Bax- α -transfected cells. The kinetics of caspase activation correlated also with the appearance

TABLE 1
Expression of Bax- σ and Bax- α in Human Tissues and Cancer Cell Lines

Cell types	Origin	Bax- σ	Bax- α
HL-60*	Pro-myelocytic leukemia	+	+
U-937*	Histiocytic lymphoma	+	+
Namalwa*	Burkitt's lymphoma	+	+
NL-2	Burkitt's lymphoma	a	a
Raji	Burkitt's lymphoma	+	+
Jurkatt	Acute T-cell leukemia	a	a
H9	T-cell lymphoma	+	+
CCRF CEM	Acute lymphoblastic leukemia	+	+
MCF-7	Breast adenocarcinoma	+	+
MDA-MB-468	Breast adenocarcinoma	+	+
SK-BR-3	Breast adenocarcinoma	+	+
OVCAR-3	Ovary adenocarcinoma	+	+
A-2780	Ovary adenocarcinoma	+	+
DU-145	Prostate carcinoma	a	a
PC-3	Prostate adenocarcinoma	+	+
LNCap-FGC-10	Prostate carcinoma	-	+
Calu-1	Lung carcinoma	+	+
A-431	Epidermoid carcinoma	+	+
NCI-H69	Small cell lung carcinoma	+	+
NCI-N417	Small cell lung carcinoma	+	+
Colo-205	Colon adenocarcinoma	+	+
Colo-320DM	Colon adenocarcinoma	+	+
HT-29	Colon adenocarcinoma	+	+
Spleen	Normal	+	+
Skin	Normal	±	±
Breast	Normal	+	+
Ovary	Normal	+	+
Testis	Normal	+	+
Lung	Normal	+	±
Colon	Normal	+	+
Brain	Normal	+	+

Note. Symbols are (+) positive, (-) negative, (±) very weak, and (a) atypical forms. Human Bax- σ and Bax- α expression was detected by RT-PCR from total RNA using specific primers at the ATG start codon and TGA stop codon. Electrophoresis was done in 1.6% agarose gel and the amplified fragments were transferred to GeneScreen nylon membranes. Blots were hybridized with a human Bax- α cDNA probe labeled with [³²P]dCTP by random priming procedure. Expression of the isoforms was confirmed by RNase protection assays in selected samples (*).

of cytochrome *c* in the cytosol of Namalwa cells transfected with Bax- σ and Bax- α (Fig. 3E).

Activation of caspases after death stimuli results in typical morphological changes that culminate in disassembly of the dying cell and engulfment by neighboring cells. These morphological changes are best visualized by electron microscopy and include cytoplasmic shrinkage, membrane blebbing and chromatin condensation (41). Figure 4 presents electron micrographs of control Namalwa cells and Namalwa cells transfected by electroporation with pCEP4-HA mock vector, pCEP4-HA-Bax- σ or pCEP4-HA-Bax- α . Cells were collected and processed for electron microscopy 24 h (micrographs not shown) and 48 h (Fig. 4) after electroporation.

In control Namalwa cells, less than 1% were apoptotic and less than 1% were necrotic; in pCEP4-HA

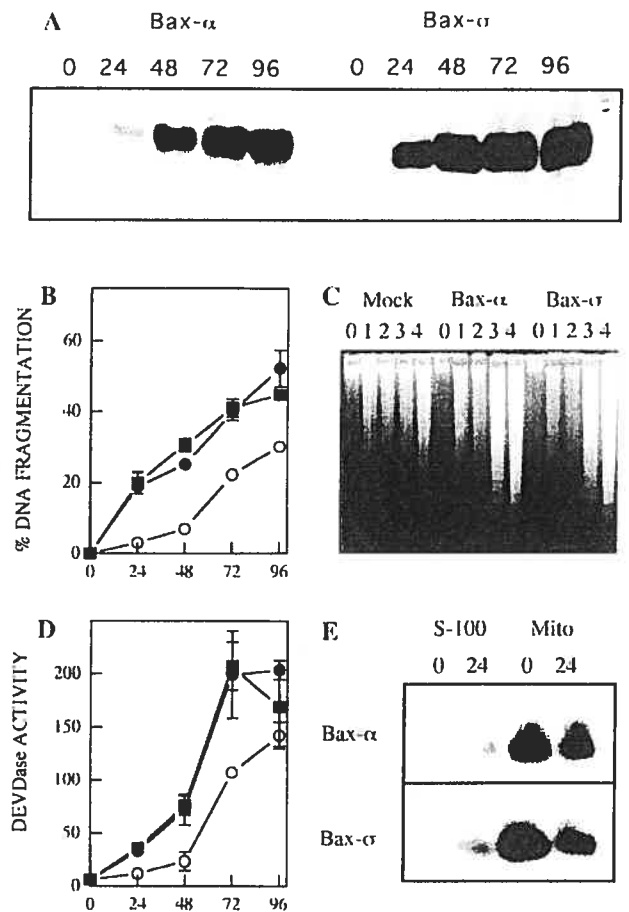


FIG. 3. Transient expression of Bax- σ in human B lymphoma Namalwa cells. (A) Bax- σ and Bax- α cDNAs were inserted in frame in a modified pCEP4 vector containing Kosak and HA epitope tag sequences. After electroporation (0.27 kV, 10 μ g plasmid/ 1.0×10^7 cells), Namalwa cells were grown in complete medium, and at indicated times (h) following electroporation, HA-Bax- σ and HA-Bax- α were immunoprecipitated using specific anti-HA-tag antibodies. After SDS-PAGE and transfer, proteins were revealed by anti-Bax antibodies and visualized by ECL. (B) [¹⁴C]Thymidine-prelabeled cells were electroporated with pCEP4-HA mock vector (○), pCEP4-HA-Bax- σ (●) or pCEP4-HA-Bax- α (■) and grown in complete medium. At the times indicated (*x* axis; h), DNA fragmentation was determined by filter elution assays. The results are expressed as percentage DNA fragmentation. The points represent the means \pm SE of six determinations. (C) Namalwa cells were electroporated with pCEP4-HA mock vector, pCEP4-HA-Bax- σ or pCEP4-HA-Bax- α . At the days indicated following electroporation, total DNA was extracted and visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. (D) Following electroporation with pCEP4-HA mock vector (○), pCEP4-HA-Bax- σ (●), or pCEP4-HA-Bax- α (■), cytosolic extracts were prepared from cells at the times indicated (*x* axis; h). DEVDase activity was monitored continuously at 37°C by detecting fluorescence emission in the presence of Ac-DEVD-AMC at an excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 460 nm. Caspase activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg. Points represent the means \pm SD of 3 independent experiments. (E) Cytosolic S-100 extracts and mitochondrial extracts were prepared from control Namalwa cells and Namalwa cells electroporated with pCEP4-HA-Bax- σ or pCEP4-HA-Bax- α after 24 h. Immunoblot analysis of cytochrome *c* was performed in both fractions using anti-cytochrome *c*-specific antibodies and enhanced chemiluminescence reaction.

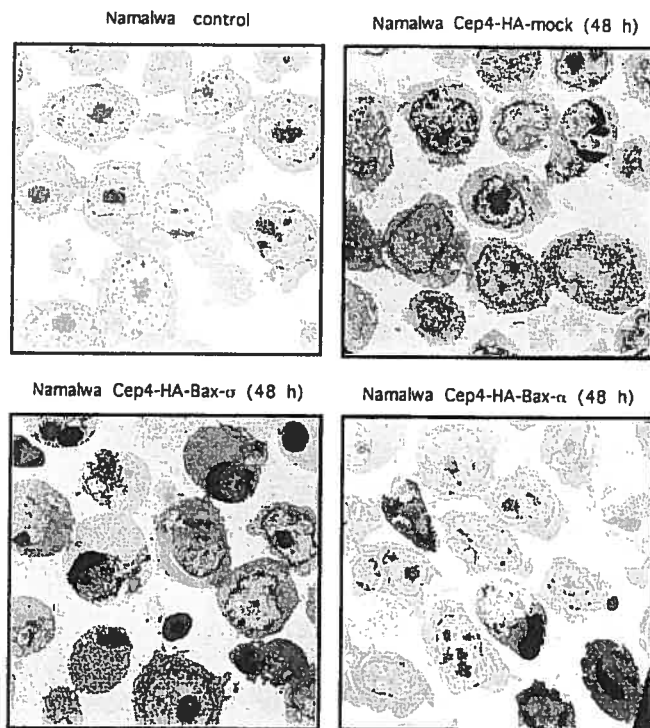


FIG. 4. Cellular morphology of Namalwa cells expressing Bax- σ . Electron micrographs of control Namalwa cells and Namalwa cells transfected by electroporation with pCEP4-HA mock vector, pCEP4-HA-Bax- σ or pCEP4-HA-Bax- α . The cells were collected and processed for electron microscopy 48 h after electroporation. In the controls, less than 1% were apoptotic and less than 1% were necrotic; in pCEP4-HA mock-transfected cells, 3–4% were apoptotic and 1% necrotic after 48 h; in pCEP4-HA-Bax- σ -transfected cells, 35% were apoptotic and 1% necrotic after 48 h; in pCEP4-HA-Bax- α -transfected cells, 25% were apoptotic and 1% necrotic after 48 h. Approximately 250–300 cells were observed by electron microscopy.

mock vector-transfected Namalwa cells, 1% were apoptotic and 1–2% were necrotic 24 h after transfection, while 3–4% were apoptotic and 1–2% necrotic 48 h posttransfection. In contrast, in pCEP4-HA-Bax- σ -transfected Namalwa cells, 1–2% were apoptotic and 1% necrotic 24 h after transfection, whereas 35% could be visualized as apoptotic and 1% as necrotic after 48 h. Similarly, in pCEP4-HA-Bax- α -transfected cells, 4–5% were apoptotic and 1–2% necrotic after 24 h, while 25% were apoptotic and 1% necrotic 48 h after transfection.

These morphological analyses clearly demonstrate that apoptosis was the main cell death mechanism activated by Bax- σ overexpression. Moreover, as with Bax- α , Bax- σ overexpression induced cell death by promoting cytochrome *c* release and caspase-3-like activation.

Interactions of Bax- σ with human Ced-9-, Egl-1-, and Ced-4-like family members. To investigate the selectivity of Bax- σ dimerization among various Ced-9-, Egl-1- and Ced-4-like human members, a yeast two-hybrid system assay was used where Bax- σ was ex-

pressed as fusion protein with the LexA DNA-binding domain and putative interacting protein fused with the B42 DNA activation domain. Anchor transmembrane sequences were removed from the cDNAs to promote their nuclear translocation and to avoid toxicity of pro-apoptotic members in yeast cells.

No growth of yeast cells in selective media without tryptophan, histidine and leucine was observed in colonies expressing LexA Bax- σ together with the BH-3-only containing Egl-1 family members Bik and Bad fused to B42AD. Similarly, no interaction with Apaf-1, the human homolog of Ced-4, was detected in the yeast two-hybrid assay (Fig. 5). However, besides its interaction with itself and other Bax isoforms, including Bax- κ , an isoform that lacks the BH-3 domain (unpublished observation), Bax- σ showed strong interaction with Ced-9 homologs containing combinations of BH-1, BH-2, BH-3, and BH-4 domains such as Bcl-xL, Bcl-xES, a BH-2- and BH-4-containing protein (42), and Bfl-1 that have anti-apoptotic activity compared to members of the family that have pro-apoptotic activities such as Bcl-xS, Bok and Bak (Fig. 5).

To study whether the yeast two-hybrid interactions observed with anti-apoptotic members of the Ced-9/Bcl family translate into biological effects in regulating apoptosis, we investigated the relationship between Bax- σ and Bcl-xL. We used the stable transfected line Namalwa-Bcl-xL (30) to assess whether high Bcl-xL expression would impede the pro-apoptotic activity of Bax- σ . First, the kinetics of DNA fragmentation were monitored and quantitated by filter DNA elution assay

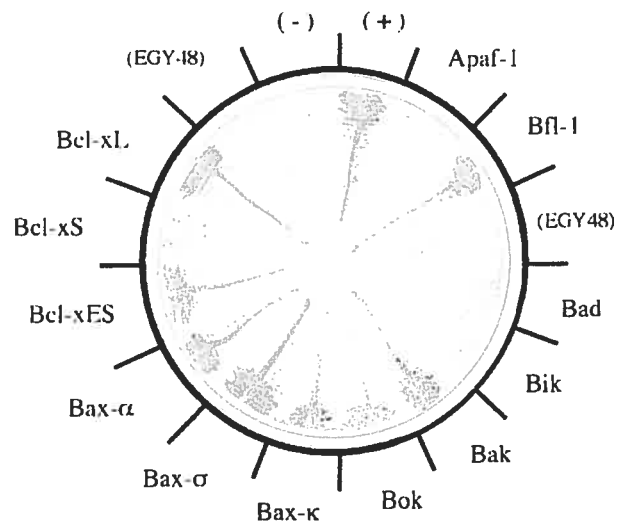


FIG. 5. Interaction of Bax- σ in yeast two-hybrid assay. EGY 48 yeast cells containing Bax- σ fused to the LexA DNA-binding domain were grown in selective medium without tryptophan, leucine and histidine in the presence of the various proteins fused to the B42 DNA activation domain as indicated. Positive controls (+) represent pLexA p53 and pB42 SV40 T, and negative controls (-) represent pLexA laminC and pB42 SV40 T. (EGY 48) represent untransformed yeast cells.

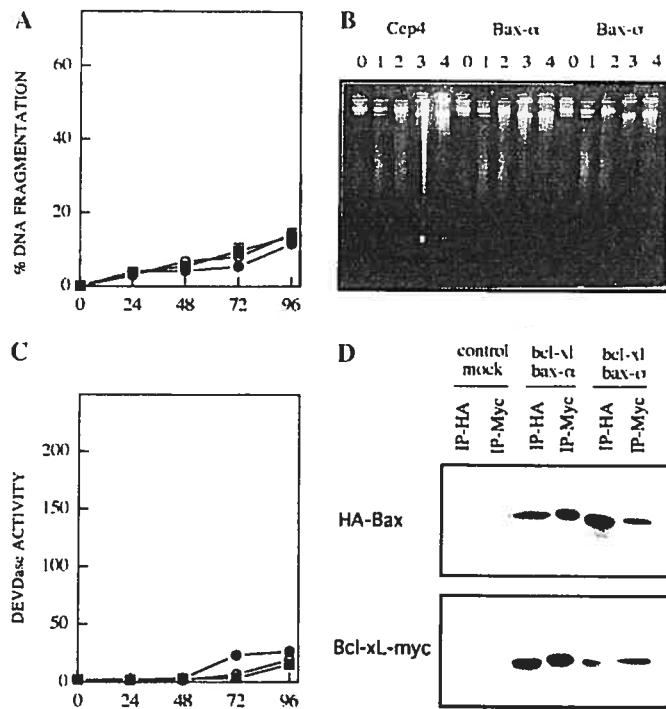


FIG. 6. Transient expression of Bax- σ in human B lymphoma Namalwa cells overexpressing Bcl-xL. (A) [14 C]Thymidine-prelabeled Namalwa cells overexpressing Bcl-xL were electroporated with pCEP4-HA mock vector (○), pCEP4-HA-Bax- σ (●), or pCEP4-HA-Bax- α (■) and grown in complete medium. At the indicated times (x axis; h), DNA fragmentation was determined by filter elution assays. The results are expressed as % DNA fragmentation. The points represent the means \pm SE of 3 determinations. (B) Namalwa cells overexpressing Bcl-xL were electroporated with pCEP4-HA mock vector, pCEP4-HA-Bax- σ or pCEP4-HA-Bax- α . At the days indicated following electroporation, total DNA was extracted and visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. (C) Following electroporation with pCEP4-HA mock vector (○), pCEP4-HA-Bax- σ (●), or pCEP4-HA-Bax- α (■), cytosolic extracts were prepared at the times indicated (x axis; h). DEVDase activity was measured as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg. The points represent the means of two independent experiments. (D) Control Namalwa cells were co-transfected with pCEP4-HA and pCDNA-Myc mock vectors, pCEP4-HA-Bax- σ and pCDNA-Bcl-xL-Myc vectors or pCEP4-HA-Bax- α and pCDNA-Bcl-xL-Myc vectors. After 48 h, extracts were prepared and immunoprecipitated (IP) with anti-HA and anti-Myc epitope tag antibodies. Immunocomplexes were trapped by protein A/G Sepharose, and the presence of HA-Bax- σ , HA-Bax- α and Bcl-xL-Myc was detected by immunoblotting with anti-HA and anti-Myc epitope tag antibodies (as indicated in the left margin).

at various times after transfection of Namalwa-Bcl-xL cells with pCEP4 expression vectors alone or containing Bax- σ and Bax- α sequences. As shown in Figs. 6A and 6B, Bcl-xL impeded the activation of DNA fragmentation induced by Bax- σ and Bax- α expression. In addition, no caspase activation was detected after transfection of Bax- σ and Bax- α in these cells overexpressing Bcl-xL (Fig. 6C).

To determine if Bax- σ bound Bcl-xL in mammalian cells, co-immunoprecipitation was performed in human

Namalwa cells. Consistent with the anti-apoptotic ability of Bcl-xL, HA-Bax- σ and HA-Bax- α were found to precipitate with Bcl-xL-Myc when cell extracts were immunoprecipitated either with anti-HA or with anti-Myc epitope tag antibodies (Fig. 6D). These results indicated that Bcl-xL effectively inhibited Bax- σ - and Bax- α -induced cell death.

Stable expression of Bax- σ in human B lymphoma Namalwa cells. To analyze the effect of Bax- σ expression on the drug response, we selected a stable Namalwa variant cell line that expresses Bax- σ . Five days after transfection, Namalwa cells were selected for bulk culture under hygromycin B (1.5 mg/ml) and maintained for about 3 months to obtain a stable line prior to the experiments (29, 30). Control Namalwa cells did not survive under hygromycin B selection whereas a pCEP4-mock vector-transfected Namalwa cell line was selected under hygromycin B. Western blot analysis indicated that HA-Bax- σ protein was expressed in transfected cells, being found primarily in subcellular mitochondrial and cytosolic fractions (Fig. 7).

To test Bax- σ activity in the selected transfected cell line, we first used the filter DNA elution assay to monitor and quantitate the kinetics of DNA fragmentation in cells undergoing apoptosis induced by several anti-cancer drugs including camptothecin, a DNA topoisomerase I inhibitor, etoposide, a DNA topoisomerase II inhibitor, cisplatin, a DNA adduct-inducing

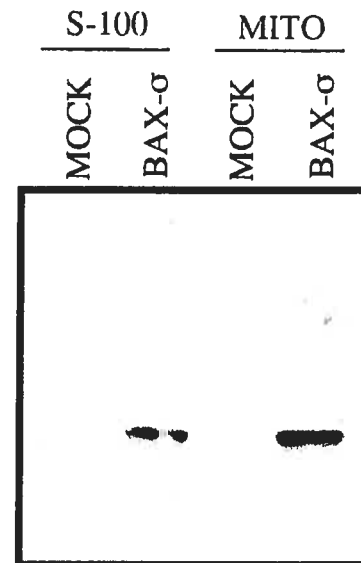


FIG. 7. Subcellular localization of Bax- σ in transfected Namalwa cells. Subcellular extracts were prepared, as described under Materials and Methods, from stable Namalwa cells transfected by electroporation with pCEP4-HA mock vector or pCEP4-HA-Bax- σ selected at 1.5 mg/ml hygromycin B. Following SDS-PAGE and electrophoretic transfer, HA-Bax- σ proteins were detected using anti-HA peptide monoclonal antibodies. Visualization was performed by enhanced chemiluminescence reaction and autoradiography.

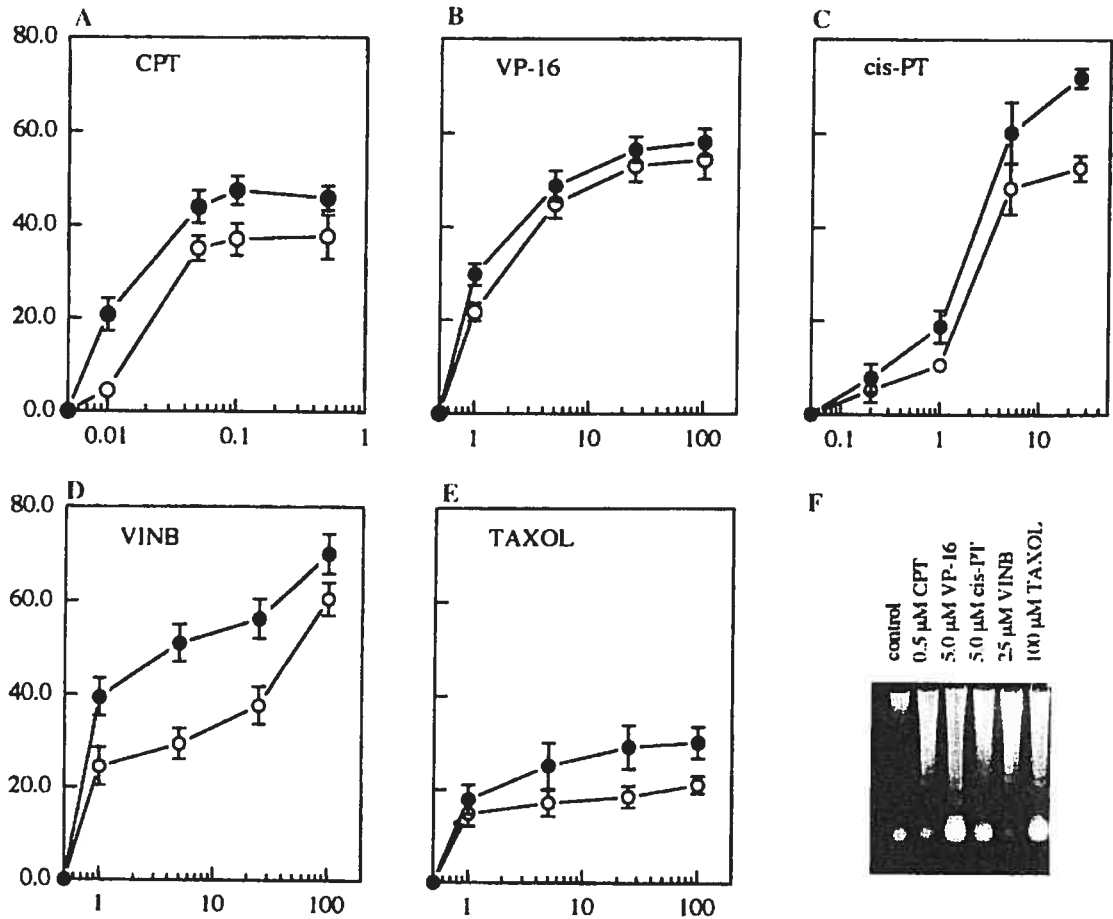


FIG. 8. Kinetics of DNA fragmentation in Namalwa and Namalwa Bax- σ -transfected cells. [14 C]thymidine-labeled cells were treated with various concentrations of camptothecin (CPT), etoposide (VP-16), cisplatin (cisPT), vinblastine (VINB) and paclitaxel (Taxol). DNA fragmentation was determined 18 h after drug treatments by DNA filter elution assays. The results are expressed as percentage DNA fragmentation. The points represent the means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. The symbols in *a b c d* and *e* are Namalwa cells transfected with mock vector selected at 1.5 mg/ml hygromycin (O) or Namalwa cells expressing Bax- σ and selected at 1.5 mg/ml hygromycin (\bullet). In *f*, Namalwa-Bax- σ cells were treated for 24 h with various drugs, and DNA was extracted by a salting-out procedure. Following agarose gel electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining.

agent, vinblastine, a tubulin polymerization inhibitor, and paclitaxel (Taxol), a microtubule depolymerization inhibitor. Several studies have shown that these compounds can activate the morphological changes and internucleosomal DNA fragmentation associated with apoptosis, in several human cancer cell lines, including Namalwa cells (29, 30). Treatment with these drugs induced apoptosis in mock-transfected Namalwa cells while low concentrations such as 0.01 μ M did not trigger significant apoptosis (Fig. 8). However, Bax- σ overexpression increased the rate of cell death induced by various concentrations of these drugs, with more pronounced effects at low doses of camptothecin and vinblastine (Fig. 8). These effects were similar to those reported for Bax- α in transfected lymphoma Namalwa cells (30), and were associated also with oligonucleosome-sized DNA fragmentation typical of apoptosis (Fig. 8F). Moreover, Bax- σ variant-transfected Na-

malwa cells treated with camptothecin exhibited morphological changes typical of apoptosis (Fig. 9).

DISCUSSION

Bax- σ lacks amino acids 159 to 171 of Bax- α , a small segment of Bax- α with an unknown function between the BH-2 and transmembrane domains. However, Bax- σ retains all the Bcl-homolog domains BH-1, BH-2 and BH-3, the putative α -5 and α -6 helices and the anchor transmembrane domain. Although the exact mechanisms by which Bax isoproteins transduce cell death remain controversial, 3 main mechanisms have been proposed: 1. Dimerization and interference with anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, 2. The formation of channels at the mitochondrial level, and 3. Interference with mitochondrial permeability transition pore complexes through adenine nucleotide trans-

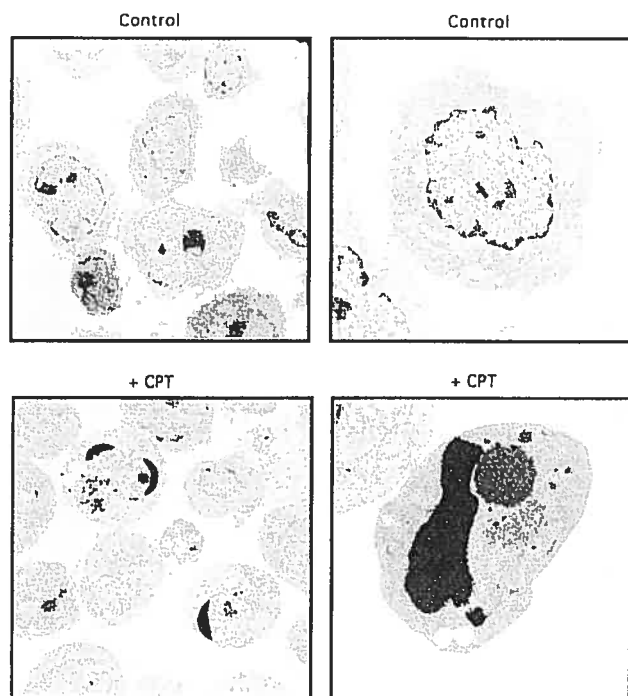


FIG. 9. Cellular morphology of Namalwa-HA-Bax- σ cells following camptothecin treatment. Electron micrographs of control and CPT-treated Namalwa-HA-Bax- σ variant lines. The cells were collected and processed for electron microscopy 8 h after drug treatment.

locator protein or voltage-dependent anion channel. Bax- σ binds to several anti-apoptotic members, including Bcl-xL, that impedes its apoptotic activity. However, the lack of amino acids 159 to 171 between the α -6 helix and the transmembrane domain may contribute to conformational changes of the protein. Such changes could modify the putative channel activity described for Bax- α , including the levels of conductance and ion selectivity. Similarly, the interaction of Bax- α to MPTP through adenine nucleotide translocator protein or VDAC is not clearly yet understood. Whether Bax- α that lacks amino acids 159 to 171 interacts or not with MPTP remains to be elucidated, and further investigations are underway to clarify the importance of this amino acid segment for the interaction with MPTP.

Reduced Bax- α expression was associated with poor response rates to chemotherapy in women with metastatic breast adenocarcinoma (43). Transfection studies in human breast cell lines showed also that Bax- α sensitized these cells to radiation- and drug-induced apoptosis (44–46). Others have indicated that the Bax:Bcl-2 ratio in human testicular tumors and B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to cell susceptibility to apoptosis (11, 47, 48). In FL5.12 cells, Bax- α can antagonize the protective effects of Bcl-xL during etoposide-induced apoptosis but is much less potent to promote cell death evoked by cisplatin (49). However,

others have reported that a mean 10-fold increased level of murine Bax expression in human SW626 ovarian cancer cells promotes cell death induced by paclitaxel (13, 50). In the human Namalwa cell line, Bax- α overexpression accelerated cell death by short or continuous treatments with various concentrations of camptothecin, etoposide or vinblastine but had no such effect in cisplatin- or paclitaxel-treated cells (30).

Our observations in this study indicate that Bax- σ exerted effects similar to those of Bax- α , accelerating apoptosis induced by camptothecin, vinblastine and paclitaxel but having a much less potent action with etoposide and cisplatin. Like Bax- α , the ability of Bax- σ to sensitize cells to anti-cancer drugs appears to vary, depending on the stimuli and perhaps the cell type.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society. R.B. obtained a scholarship from the Medical Research Council of Canada and the Cancer Research Society Inc. E.S. was supported by a studentship from the Faculté des Etudes Supérieures (Université de Montréal) and C.P. was the recipient of a summer studentship from the Leukemia Research Fund of Canada (Toronto, Ontario). The authors thank Alain Steyaert for his technical assistance in cloning Bax- σ . The editorial work of Ovid DaSilva of the Research Support Office of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre is much appreciated.

REFERENCES

1. Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1998) Bcl-2 family—Regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395–419.
2. Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., and Matsuyama, S. (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 127–137.
3. Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**, 2265–2282.
4. Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701–4714.
5. Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Nunez, G. (1994) bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* **120**, 3033–3042.
6. Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J. C. (1996) Structure–function comparisons of the pro-apoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6494–6508.
7. Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619.
8. Apte, S. S., Mattei, M. G., and Olsen, B. R. (1995) Mapping of the human Bax gene to chromosome 19q13.3–q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, Bax δ . *Genomics* **26**, 592–594.

9. Zhou, M., Demo, S. D., McClure, T. N., Crea, R., and Bitler, C. M. (1998) A novel splice variant of the cell death-promoting protein bax. *J. Biol. Chem.* **273**, 11930–11936.
10. Shi, B., Triebe, D., Kajiji, S., Iwata, K. K., Bruskin, A., and Mahajna, J. (1999) Identification and characterization of Bax epsilon, a novel Bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 779–785.
11. Thomas, A., Elrouby, S., Reed, J. C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M., and Newcomb, E. W. (1996) Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia—Relationship between p53 gene mutation and Bcl-2/Bax proteins in drug resistance. *Oncogene* **12**, 1055–1062.
12. He, H. L., Hershberger, P. A., and McCarthy, S. A. (1998) Characterization of a novel Bax-associated protein expressed in hemopoietic tissues and regulated during thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* **161**, 1169–1175.
13. Strobel, T., Swanson, L., Korsmeyer, S., and Cannistra, S. A. (1996) Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14094–14099.
14. Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3668–3672.
15. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* **139**, 1281–1292.
16. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C. *Nature* **391**, 496–499.
17. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (1998) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**, 3878–3885.
18. Xiang, J. L., Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1996) Bax-induced cell death may not require Interleukin 1-beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14559–14563.
19. Bossywetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998) Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* **17**, 37–49.
20. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487.
21. Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. C., and Fesik, S. W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335–341.
22. Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., and Thompson, C. B. (1997) Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353–357.
23. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370–372.
24. Schendel, S. L., Xie, Z. H., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J. C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5113–5118.
25. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11357–11362.
26. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L. A., Prevost, M. C., Xie, Z. H., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027–2031.
27. Eskes, R., Antonsson, B., Osensand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell Biol.* **143**, 217–224.
28. Matsuyama, S., Xu, Q. L., Velours, J., and Reed, J. C. (1998) The mitochondrial FOF1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell* **1**, 327–336.
29. 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.
30. Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G., and Bertrand, R. (1998) 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.
31. Kluck, R. M., Bossywetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome C from mitochondria—A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132–1136.
32. Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R., and Kroemer, G. (1997) Bcl-2 and Bcl-X(L) antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* **57**, 62–67.
33. Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis—Doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 151–165.
34. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997) Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**, 627–637.
35. Jurgensmeier, J. M., Xie, Z. H., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4997–5002.
36. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A., and Wang, X. D. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405–413.
37. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489.
38. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 949–957.
39. Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., and Farber, J. L. (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **273**, 7770–7775.
40. Yang, E., and Korsmeyer, S. J. (1996) Molecular thanatopsis—A discourse on the bcl2 family and cell death. *Blood* **88**, 386–401.
41. 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.

42. Schmitt, E., Steyeart, A., and Bertrand, R. (1995) Bcl-xES, a novel bcl-x-related cDNA in human cells: Potential role regulating apoptosis. *in* Programmed Cell Death Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
43. Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V. M., Niskanen, E., Nordling, S., and Reed, J. C. (1995) Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.* **55**, 4471–4478.
44. Bargou, R. C., Wagener, C., Bommert, K., Mapara, M. Y., Daniel, P. T., Arnold, W., Dietel, M., Guski, H., Feller, A., Royer, H. D., and Dorken, B. (1996) Overexpression of the death-promoting gene Bax-Alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in Scid mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 2651–2659.
45. Sakakura, C., Sweeney, E. A., Shirahama, T., Igarashi, Y., Hakomori, S., Nakatani, H., Tsujimoto, H., Imanishi, T., Ohgaki, M., Ohyama, T., Yamazaki, J., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Sawai, K., and Takahashi, T. (1996) Overexpression of Bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **67**, 101–105.
46. Wagener, C., Bargou, R. C., Daniel, P. T., Bommert, K., Mapara, M. Y., Royer, H. D., and Dorken, B. (1996) Induction of the death-promoting gene Bax-Alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **67**, 138–141.
47. Chresta, C. M., Masters, J. R. W., and Hickman, J. A. (1996) Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax-Bcl-2 ratio. *Cancer Res.* **56**, 1834–1841.
48. McConkey, D. J., Chandra, J., Wright, S., Plunkett, W., McDonnell, T. J., Reed, J. C., and Keating, M. (1996) Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and Bax. *J. Immunol.* **156**, 2624–2630.
49. Simonian, P. L., Grillot, D. A. M., Merino, R., and Nunez, G. (1996) Bax can antagonize Bcl-X(L) during etoposide and cisplatin-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-X(L). *J. Biol. Chem.* **271**, 22764–22772.
50. Strobel, T., Kraeft, S. K., Chen, L. B., and Cannistra, S. A. (1998) Bax expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel—A novel role for Bax during chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.* **58**, 4776–4781.
51. 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.
52. Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. W. (1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12401–12406.
53. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285–291.
54. Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., and Chinnadurai, G. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**, 1921–1928.
55. D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., and Chinnadurai, G. (1996) Bfl-1, a Bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. *Cancer Res.* **56**, 3879–3882.
56. Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 733–736.
57. Schmitt, E., Sane, A. T., Steyeart, A., Cimoli, G., and Bertrand, R. (1997) The Bcl-xL and Bax control points: Modulation of cancer chemotherapy-induced apoptosis and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Biochem. Cell. Biol.* **75**, 301–314.
58. Bertrand, R., and Pommier, Y. (1995) Assessment of DNA damage in mammalian cells by DNA filter elution methodology. *in* Cell Growth and Apoptosis: A Practical Approach (Studzinski, G. P., Ed.), Vol. 159, pp. 97–118, IRL Press, New York.
59. Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215.
60. 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.
61. Bertrand, R., Solary, E., Jenkins, J., and Pommier, Y. (1993) Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp. Cell Res.* **207**, 388–397.

