Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA

Gorbatchev Ambroise

▶ **To cite this version:**

Gorbatchev Ambroise. Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS079 . tel-01253743

HAL Id: tel-01253743

https://theses.hal.science/tel-01253743

Submitted on 11 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS079

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Hôpital Paul Brousse, Villejuif

ÉCOLE DOCTORALE N°582
Cancérologie : Biologie – Médecine - Santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

M Gorbatchev Ambroise

Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA

Thèse présentée et soutenue à l'Hôpital Paul Brousse, le 19/11/15 :

Composition du Jury :

Mme, Wiels, Joëlle	DR2, Institut Gustave Roussy	Présidente
M, Juin, Philippe	DR2, Institut de Recherche Thérapeutique	Rapporteur
Mme, Desagher, Solange	CR1, Institut de Génétique Moléculaire	Rapporteur
M, Solary, Eric	PR, Institut Gustave Roussy	Examinateur
M, Billard, Christian	CR1, Centre de Recherche des Cordeliers	Examinateur
M, Vazquez, Aimé	Emérite, Hôpital Paul Brousse	Directeur de thèse

NNT : 2015SACLS079

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Hôpital Paul Brousse, Villejuif

ÉCOLE DOCTORALE N°582
Cancérologie : Biologie – Médecine - Santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

M Gorbatchev Ambroise

Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA

Thèse présentée et soutenue à l'Hôpital Paul Brousse, le 19/11/15 :

Composition du Jury :

Mme, Wiels, Joëlle	DR2, Institut Gustave Roussy	Présidente
M, Juin, Philippe	DR2, Institut de Recherche Thérapeutique	Rapporteur
Mme, Desagher, Solange	CR1, Institut de Génétique Moléculaire	Rapporteur
M, Solary, Eric	PR, Institut Gustave Roussy	Examinateur
M, Billard, Christian	CR1, Centre de Recherche des Cordeliers	Examinateur
M, Vazquez, Aimé	Emérite, Hôpital Paul Brousse	Directeur de thèse

A tous ceux qui comptent pour moi…

Une thèse, c'est d'abord l'aboutissement d'un long travail d'équipe, associé à la mise en évidence de faits nouveaux, qui contribuent à une meilleure compréhension du monde au sein duquel nous évoluons (la première moitié de la devise de l'université Paris Sud/Paris Saclay). Cependant, une thèse, c'est aussi l'évaluation de ce travail par un jury d'experts.
Je souhaite donc remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie le Docteur Joëlle Wiels, toujours au rendez-vous pour la présentation de mon poster pendant les journées scientifiques de Roscoff, présente aussi lors de ma présentation de mi-thèse, que vous présidiez déjà. Il a été tout naturel pour moi de vous demander de présider le jury qui va évaluer mon travail de thèse dont les contours vous sont désormais plutôt familiers, pour refermer la boucle. Je suis très heureux que vous ayez accepté l'invitation.

Je remercie les Docteurs Philippe Juin et Solange Desagher, que j'ai eu la chance de rencontrer au cours du congrès « Cancer, Cell Death and Resistance », il y a un peu plus de 2 ans à Toulouse. A l'époque déjà, vous aviez porté de l'intérêt à mes travaux et m'aviez fait part de votre envie de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie de ne pas avoir changé d'avis et d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Last but not least, je remercie le Professeur Eric Solary, très intéressé par mes travaux, notamment ceux portant sur la régulation de l'expression de la protéine Mcl-1 et le Docteur Christian Billard, également ancien membre de mon jury de mi-thèse, de me faire l'honneur d'être les examinateurs de cette thèse.

Les travaux qui sont introduits, présentés et discutés tout au long de ce manuscrit, ont été réalisés au sein de l'unité INSERM U1014, nouvellement INSERM U1197, au sein de l'hôpital Paul Brousse à Villejuif. Il est donc naturel pour moi d'en remercier les membres, qui ont tous participé à leur manière à mon épanouissement au sein de l'équipe et à la qualité du travail que j'ai pu y accomplir.

J'aimerais remercier en tout premier lieu le Docteur Aimé Vazquez qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui a été un très bon superviseur tout au long de ma modeste expérience scientifique. Vous m'avez fait confiance et enrôlé en Master 2 alors que mon expérience de laboratoire se résumait aux quelques TP que j'avais pu réaliser à la fac et avez fait en sorte que j'aie un financement tout au long de ma thèse. Avec vous, j'ai eu l'occasion de découvrir ce qu'est vraiment le monde de la recherche et de confirmer que c'est la voie qui me sied le mieux. De plus, il a lu puis relu le manuscrit que vous avez entre les mains. Toutefois, je tiens à souligner que les erreurs qui pourraient encore subsister ne relèvent pas entièrement de sa responsabilité.
Merci pour tout.

Je ne peux pas remercier Aimé sans remercier le Pr Jean Kanellopoulos qui m'a aiguillé vers lui et a sans doute glissé quelques bons mots à mon égard.

Je remercie le Docteur Catherine (Cathy) Alexia, qui a pris en main toute ma formation. Il y a un peu de ta patte dans chacun de mes blots ! Tu n'étais pas désagréable au quotidien non plus, je n'ai donc jamais regretté d'avoir la paillasse qui jouxte la tienne. Tu as quitté le laboratoire maintenant mais j'ai gardé ton petit dessin avec moi.

Je remercie le Docteur Damien Arnoult avec qui j'ai eu de nombreuses discussions, toujours (ou presque) constructives et positives, qui m'ont poussées à aller toujours plus loin dans ma réflexion. Tu as été un catalyseur important. Et puis avoir un fan de foot au labo, c'est vraiment un plus ! J'avais quelqu'un avec qui faire un debrief en milieu de semaine après la Ligue des champions et en début de semaine après les matches de Ligue 1, c'était sympa.

Je remercie le Docteur Nicolas Bidère, qui souvent m'a fait des remarques pertinentes par rapport à mon projet et qui m'a informé du congrès qui se déroulait à Toulouse. Ton humour, comme celui de Damien était (presque) toujours bien senti, j'ai bien rigolé !

Je remercie le Pr Antoine Durrbach qui a porté de l'intérêt à mes travaux et qui porte de l'intérêt à mon avenir.

Je remercie Kostas, mon frère grec, ainsi que Emeline et Naïma, qui ont débuté leur thèse en même temps que moi, et qui sont tous désormais de très bons amis. Mon expérience au sein du laboratoire n'aurait pas été aussi positive sans vous.

Je remercie Nath qui a pris le relai de ces 3 loustics au labo lors de ma 4e année de thèse. Avec toi, je ne me suis pas ennuyé une seule seconde et puis tu m'as filé un coup de main salvateur pour le papier qui porte sur la régulation de l'activité pro-apoptotique de PUMA. Tu es géniale ! Ne change rien.

Je remercie Jesus (Chus) pour son humour et sa bonne humeur communicative. Ca a été un enrichissement de faire ta connaissance, personnellement parce que tu es quelqu'un que j'estime et professionnellement, puisqu'on co-signe un papier.

Je remercie Alain, jamais avare en conseils et qui a su apporter sa pierre à l'édifice dans le développement de mon projet de thèse.

Je remercie Céline pour son enthousiasme, pour m'avoir chouchouté à mon arrivée au laboratoire et pour avoir pris la peine de lire mon mémoire à la fin de mon Master 2.

Je remercie tous les membres de notre groupe, passés et présents, au bâtiment Lwoff, qui ont partagés avec moi cette aventure : Gabrielle, Marie, Aline, Claire, Emilie, Roxane, Charlotte, Neslihan, Veronica, Mélissa, Sophie, Estefania, Judith, Aurélie, Florence, Sonia, Franck, Ahmed, Lassad et Léo.

Je remercie aussi bien entendu tous les membres de notre équipe de « l'autre bâtiment », Lavoisier : Sandy, (Xiao)Meng, Lola, Vincent, Julien, Séverine, Zhu (en fait Chaobin), Mélanie, Myriam, Ye, Hilal, Marion, Pierre, Cindy, Hans et Aurore.

Et puis je remercie les autres, qui, bien que ne faisant pas partie de notre superbe équipe de recherche, sont quand même des gens sympa : Nassim, le capitaine de la team INSERM au cours des 2 tournois de foot à Montesson pour le Challenge Nathalie et l'association NRB qui a financé mes 3 premières années de thèse, ainsi que Ola, Eric, Richard, Ségolène, Philippe, Sonia, Vincent et Gladys.

Je remercie Mbaye, qui m'a filé le virus de la course à pied (même si mes genoux brûlent un peu maintenant, de temps en temps) et m'a fait découvrir le jus d'hibiscus, un délicieux nectar que je conseille à tout le monde.

Je remercie tous mes autres amis, que je ne vais pas énumérer ici. Dans la mesure où la probabilité que ce manuscrit tombe entre leurs mains doit être inférieure à celle de gagner au Loto, je pense qu'ils ne m'en tiendront pas rigueur.

Je tiens ensuite à remercier toute ma famille qui a toujours été derrière moi.
Tout particulièrement, mon père, mon premier fan, qui malheureusement vient de nous quitter et qui n'aura pas l'occasion de me voir devenir Docteur. J'espère quand même t'avoir rendu fier.
Ma mère, pour son support de tous les instants.
Je remercie aussi mes frères et sœurs : Lindsay, pour m'avoir ouvert les yeux sur ma condition. « Si ton labeur est dur et si tes résultats sont minces, rappelle-toi qu'un jour le chêne a été un gland comme toi. » (Proverbe chinois) est le proverbe que tu m'as envoyé pendant ma première année de thèse, je l'aurai toujours au dessus de mon bureau, en espérant un jour devenir un chêne. Luc-Germain, entre autre pour ton intérêt pour mes travaux, tu m'as permis de m'entraîner à la vulgarisation de ceux-ci et Ashley, la petite dernière.

Merci à vous tous, en espérant n'avoir oublié personne.

Pour finir, un petit mot sur l'Etat français qui, malgré les carences dont il peut faire preuve, notamment en matière de financement et de soutien de la recherche française, m'a permis de réaliser mes études dans des conditions idéales, à travers les bourses qui m'ont été attribuées. Je pense que ma famille vivant aux Etats-Unis, doit toujours être sous le choc du fait que mon inscription en année universitaire ne me coûtait pas beaucoup plus cher que 2 hot dogs. J'espère que j'aurai l'opportunité d'offrir un retour sur investissement.

LISTE DES ABREVIATION

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Acinus : Apoptosis Chromatin condensation Inducer in the NUcleuS
AIF : Apoptosis-Inducing Factor
AMSH-LP : Associated Molecule with SH3 domain-Like Protease
ANT : Adenin Nucleotide Translocase
Apaf-1 : Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC : Anaphase-Promoting Complex
APF1 : ATP-dependant Proteolysis Factor 1
Apo : APOlipoprotein
ARF-BP1 : ARF-Binding Protein 1
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia mutated-Rad3-related protein

B

Bcl-2 : B Cell Lymphoma-2
Bcl-XL : B Cell Lymphoma X Long
Bcl-w : B Cell Lymphoma w
Bad : Bcl-2-Associated Death promoter
Bak : BCL2-Antagonist/Killer
Bax : Bcl-2-Associated X protein
BH : Bcl-2 Homology
Bid : BH3 Interacting-domain Death agonist
Bim : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
Bik : Bcl-2 Interacting Killer
Bmf : Bcl-2 Modifying Factor
BL41 : Burkitt's Lymphoma 41
Bok : Bcl-2 related Ovarian Killer
β-TrCP : β-Transducin Repeats-Containing Proteins

C

CAD : Caspase Activated DNAse
CARD : CAspase Recrutment Domain
Caspase : Cysteine-ASPartic proteASE
Ced : Cell Death Abnormal
cFLIP : Cellular FLICE (FADD-Like IL-1β-Converting Enzyme)-Inhibitory Protein
Chk1 : CHecKpoint protein 1
CHOP : C/EBP HOmologous Protein
cIAP : Cellular Inhibitor of APoptosis
CYLD : CYLinDromatosis D

D

DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DFF40/45 : DNA Fragmentation Factor 40/45`
DIAP1/2 : *Drosophila* IAP1/2
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DR : Death Receptor
Drp1 : Dynamin-Related Protein-1
DUB : DeUBiquitinase

F

FADD : Fas-Associated protein with DD
FBW7 : F-Box and WD repeat domain-containing 7
FoxO3a : Forkhead bOX protein O3a

H

HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HIFα : Hypoxia Iducible Factor α
HSP70 : Heat Shock Protein 70
HTLV1 : Human T cell Leukemia Virus type 1
HUWE1 : HECT, UBA, WWE domain containing 1

I

IAP : Inhibitor of APoptosis
ICAD : Inhibitor of CAD
IL : InterLeukin
ILP2 : IAP-like Protein-2
INrF2 : cytosolic Inhibitor of NF-E2 Related Factor 2

J

JAMM : JAb1/Mov34/Mpr1

M

MAC : Mitochondrial Apoptosis-induced Channel
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1 : Myeloid Cell Leukemia 1
MCPIP : Monocyte Chemotactic Protein-Induced Proteases
MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
MJD : Machado-Josephin Domain proteases
ML-IAP : MeLanoma-IAP
Mule : Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3

N

NFκB : Nuclear Factor κB
NuMa : NUclear Mitosis Associated protein

O

Omi/HtrA2 : Omi/High Temperature Requirement A2
OTU : Ovarian TUmor proteases

P

PAK-2 : p21 protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 2
PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
PGE2 : ProstaGlandine E2
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PKA/C : Protein Kinase A/C
PP1/2A : Protein Phosphatase 1/2A
PS : Phosphatidyl-Sérine
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTP : Permeability Transition Pore
PUMA : p53-Upregulated Modulator of Apoptosis

R

Rb : RetinoBlastoma
RING : Really Interesting New Gene
RLR : RIG-I-Like Receptors

S

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise
Smac/DIABLO : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases

T

Terf : TEstis RING Finger protein
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TLR4 : Toll Like Receptor 4
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRADD : TNFR1-Associated DD protein
TRAF2/6 : TNF Receptor-Associated Factor 2/6
TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRIM17 : TRIpartite Motif containing 17

U

UBA1/6 : UBiquitin-like modifier Activating enzyme 1/6
UBC : UBiquitin-Conjugating
UCH : Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase
USP : Ubiquitin-Specific Protease
USP9X : Ubiquitin-Specific Protease 9 X-linked
UTP : Uridine TriPhosphate

V

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

X

XIAP : X-linked IAP

Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA

Mots clés : Apoptose, Famille Bcl-2, Cancer, Lymphome de Burkitt

Le cancer est un problème majeur de santé public, tuant chaque année plusieurs millions de personnes. L'inhibition de la mort cellulaire programmée, l'apoptose, est considérée comme l'un des paramètres principaux impliqués dans son initiation et son développement. La voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose est régulée par la famille Bcl-2. Jusqu'à maintenant, on pensait que la protéine PUMA, une protéine pro-apoptotique, était principalement exprimée au niveau mitochondrial. Nous avons montré qu'à l'état basal, PUMA était exprimé au niveau du cytosol des lymphocytes B humains. Cependant, suite à un signal apoptotique, PUMA est capable de transloquer du cytosol à la mitochondrie, de façon indépendante des caspases mais dépendante de l'activation de la MAPKinase p38, permettant ainsi son interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 dont l'inhibition conduit à l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques, Mcl-1 notamment, sont souvent surexprimées dans les tumeurs. Mcl-1 est une protéine à courte demi-vie, rapidement dégradée par le protéasome. Cette dégradation dépend de son ubiquitination réalisée par des E3 ligases (E3). Quelques E3 et une déubiquitinase (DUB), hydrolysant les chaînes d'ubiquitine, régulant l'expression de Mcl-1 ont été décrites. Cependant, ces protéines sont soit très peu exprimées, soit leur inhibition n'a pas d'impact sur l'expression de Mcl-1 dans notre modèle. Nous avons donc entrepris de caractériser de nouvelles E3 et DUB régulant l'ubiquitination de Mcl-1. Après une immunoprécipitation de Mcl-1 dans nos cellules, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, nous avons identifié la DUB USP14. Lorsque son expression est diminuée, l'expression et la stabilité de Mcl-1 diminuent de façon sélective. Nos résultats pourraient contribuer à une approche à double-tranchant dans le traitement du cancer, en retirant les freins à l'apoptose via une diminution de l'expression de Mcl-1 d'une part et en l'activant via PUMA de l'autre.

Characterization of new regulatory pathways for Mcl-1 and PUMA expression and activity

Keywords : Apoptosis, Bcl-2 family, Cancer, Burkitt's lymphoma

Cancer is a major public health issue, killing millions of people worldwide each year. The inhibition of apoptosis, a programmed cell death, in its onset and development has been well documented, making it one of the hallmarks of cancer. The intrinsic (mitochondrial) pathway of apoptosis is regulated by the Bcl-2 (B cell lymphoma-2) family. Up until now, PUMA, a pro-apoptotic protein, was thought to be mainly expressed at the mitochondria, based on experiments where it had been overexpressed. We showed that endogenous PUMA is mainly expressed in the cytosol of activated or resting B cells. However, upon apoptotic stress, PUMA was able to translocate from the cytosol to the mitochondria, in a caspase-independent but p38-dependent manner, allowing PUMA to bind and inhibit the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1, and thereby leading to cell death. The anti-apoptotic proteins, especially Mcl-1, are often overexpressed in tumors. Mcl-1 is a protein with a short half-life, degraded rapidly by the proteasome. This degradation is ubiquitin-dependent, requiring E3 ligases (E3). A handful of E3s and one deubiquitinase (DUB), that hydrolyses ubiquitin chains, have been reported to regulate Mcl-1 expression. However, they were either very poorly expressed or their inhibition had no impact on Mcl-1 expression in our model. We thus undertook to characterize new E3s and DUBs mediating Mcl-1 ubiquitylation. After an immunoprecipitation of Mcl-1 in our cells, followed by a mass spectrometry analysis, we identified the DUB USP14. When knocked down, Mcl-1 expression was selectively decreased and its stability enhanced when USP14 was overexpressed. Our results could help build "double-edge" therapies, removing the breaks on apoptosis on one hand via Mcl-1 downregulation while activating it on the other via PUMA translocation.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION (0)

I. LA MORT CELLULAIRE, JOUER A QUI PERD GAGNE……...1

A - L'apoptose, le suicide altruiste……4

1/ Historique…….4

2/ Les conséquences de l'apoptose, une entreprise de démolition……6

a) Caractéristiques morphologiques de la cellule apoptotique…….6

b) Conséquences membranaires de l'apoptose…….6

c) *Altérations nucléaires……9*

d) Impact de l'apoptose au niveau mitochondrial……...10

e) Impact au niveau cytoplasmique……...10

B - Les types de mort cellulaire non apoptotique, les différents visages de la mort ……..11

1/ La nécrose……11

2/ L'oncose……...12

3/ L'autophagie……13

4/ La catastrophe mitotique……15

C - Altérations de l'apoptose et pathologies associées, qui s'y frotte, s'y pique...16

1/ Excès d'apoptose, trop d'une bonne chose est mauvais……...16

2/ Défaut d'apoptose, quand la survie (cellulaire) peut engendrer la mort (de l'individu)……17

II. LES REGULATEURS DE L'APOPTOSE, L'HISTOIRE D'UN ASSASSINAT.18

A - Les caspases, ciseaux moléculaires……19

1/ Les caspases initiatrices, les mandataires……21

2/ Les caspases effectrices, les assassins……..22

3/ Les substrats des caspases, les victimes……...22

4/ Les inhibiteurs des caspases, le kevlar cellulaire……23

B - Les voies d'activation des caspases, 2 voies pour 1 issue…….25

1/ La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, un signal vertical……...25

2/ La voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale, la libération des criminels ……27

3/ Le couplage entre les deux voies, l'occasion fait le larron…….29
III. LA FAMILLE BCL-2, GARANTE DE L'INTEGRITE DE LA MEMBRANE EXTERNE MITOCHONDRIALE……...31
A - Les protéines anti-apoptotiques, gardiennes du temple……..32
1/ Bcl-2, mère fondatrice des Etats-Unis de la mitochondrie……...32
2/ Mcl-1, noria jusqu'à la mort……34
B - Les protéines pro-apoptotiques, des aiguilles dans un ballon de baudruche..38
1/ Les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH Bax et Bak, deux êtres vous manquent et tout est dépeuplé…….38
2/ Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique ou *BH3-only*, quand plus égal moins……41
C - Les différents modèles d'activation proposés, tous les chemins mènent à Rome……44
1/ Le modèle d'activation directe, le jeu des chaises musicales……..44
2/ Le modèle d'activation indirecte ou de déplacement, ouvrir la boîte de Pandore...46
3/ Le modèle d'activation unifié, 2 modes pour 1 mort……...47
D – La famille Bcl-2, l'ennemi public numéro 1…….48
1/ Les homologues de la famille Bcl-2 chez les virus, souvent imité et toujours égalé …….49
2/ Les amplifications et délétions des membres de la famille Bcl-2 dans les cancers, préserver les protecteurs et neutraliser les tueurs……51
3/ Puma et pathologies, un prédateur omniprésent……..56
IV. UBIQUITINATION, LE DEBUT DE LA FIN……60
A - Le mécanisme, l'histoire d'une livraison…….……..63
1/ L'enzyme d'activation E1, l'entrepôt……..64
2/ L'enzyme de conjugaison E2, le livreur……..64
3/ Les ligases, le GPS……..66
B - Les différentes familles de ligases d'ubiquitine (E3), une active, l'autre réactive……67
1/ La famille des ligases à domaine HECT, les maçons…….….68
2/ La famille des ligases à domaine RING, les architectes……...…..69
C - La déubiquitination, l'antagoniste……..70
1/ Les différentes familles de DUB, faire la même chose de manière différente…….71

a) Les DUBs à cystéine……71

b) Les métalloprotéases……...72

2/ Leur rôle, défaire pour reconstruire……..74

D - La régulation de l'apoptose par le processus d'ubiquitination, ajuster le thermostat……...76

1/ Régulation de l'expression de Mcl-1 par les E3, les fossoyeurs……..77

a) E3s impliquées dans l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 via son ubiquititnation de type K48 (Figure 36), le baiser d'adieu……...78

b) E3 impliquée dans l'ubiquitination et la stabilisation de Mcl-1 via son ubiquititnation de type K63, un ticket gagnant……83

2/ Régulation de l'expression de Mcl-1 par les DUB, USP9x la secouriste……85

RESULTATS (86)

ARTICLE 1 : Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma cells.

ARTICLE 2 : Deubiquitinase USP14 promotes Mcl-1 stabilization and cell survival in HeLa cells

DISCUSSION ET PERSPECTIVES (129)

ANNEXES (157)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (199)

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Les fonctions de la MCP…….2
Figure 2 : Schéma illustrant les caractéristiques de l'apoptose…….5
Figure 3 : Les conséquences morphologiques de l'apoptose……7
Figure 4 : Les différentes étapes impliquées dans l'élimination efficace des cellules apoptotiques……..8
Figure 5 : Illustration de la condensation de la structure de la chromatine (B) et de la fragmentation du noyau (C) au cours de l'apoptose…….9
Figure 6 : Aspects morphologiques de la nécrose……..12
Figure 7 : Aspects morphologiques de l'oncose, comparés à l'apoptose……...13
Figure 8 : Déroulement du processus autophagique……...14
Figure 9 : Pathologies associées à une induction ou à une inhibition de l'apoptose…….16
Figure 10 : Conservation des voies apoptotiques au cours de l'apoptose……...19
Figure 11 : Structure et classification des caspases……20
Figure 12 : Mécanisme d'activation des caspases……..21
Figure 13 : Les caspases coordonnent la démolition des structures et des organites clés…..23
Figure 14 : Les IAPs chez les mammifères……24
Figure 15 : Activation des caspases-8 et -10 par les récepteurs de mort……26
Figure 16 : L'apoptosome : une roue de la mort……28
Figure 17 : Diaphonie entre les voies de signalisation de l'apoptose……30
Figure 18 : Structure des membres de la famille Bcl-2……...34
Figure 19 : Régulation de la fonction et de l'expression de Mcl-1……36
Figure 20 : Structure de la protéine Bcl-XL……38
Figure 21 : Les différents modèles permettant la libération du cytochrome c……40
Figure 22 : Les BH3-onlys sont activés par une grande variété de stress cellulaires…….42
Figure 23 : Sélectivité des BH3-onlys vis à vis des anti-apoptotiques**……..**46
Figure 24 : Les différents modèles d'activation des pro-apoptotiques effecteurs…….48
Figure 25 : Protéines virales de la famille Bcl-2……50
Figure 26 : Les différentes topologies de l'ubiquitination…….61
Figure 27 : Les différents types d'ubiquitination et leur conséquence sur le destin du substrat …….62
Figure 28 : Les enzymes et réactions du système ubiquitine/protéasome…….63
Figure 29 : Structure de la protéine de conjugaison E2…….65
Figure 30 : Mécanisme de fonctionnement des E3 à domaine HECT……68
Figure 31 : Séquence primaire du domaine RING……..69
Figure 32 : Mécanisme de fonctionnement des E3 à domaine RING……70
Figure 33 : Classification des DUBs……...73
Figure 34 : Localisation subcellulaire des DUBs……74
Figure 35 : Les fonctions cellulaires des DUBs……..75
Figure 36 : Régulation de l'état d'ubiquitination de Mcl-1……83
Figure 37 : Implication de l'axe Tax-TRAF6 dans l'ubiquitination de Mcl-1……...84
Figure 38 : PUMA interagit avec une protéine d'une vingtaine de kDa au niveau du cytosol ……134
Figure 39 : Localisation subcellulaire de PUMA dans différents types cellulaires…….135
Figure 40 : La protéine PUMAα se comporte comme PUMAβ lorsqu'elle est surexprimée ……..……...……146

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Profil d'interaction au sein de la famille Bcl-2……45
Tableau 2 : Affinité des protéines anti-apoptotiques pour les motifs BH3 des pro-apoptotiques……51
Tableau 3 : Gènes amplifiés dans les cancers humains……..53
Tableau 4 : Gènes délétés dans les cancers humains……..55
Tableau 5 : Pathologies humaines auxquelles PUMA est associé ou dans lesquelles PUMA constitue une cible thérapeutique pertinente……59

INTRODUCTION

I. LA MORT CELLULAIRE, JOUER A QUI PERD GAGNE

Comme tout ce qui vit, les cellules meurent. Dans les tissus adultes, la mort et la prolifération cellulaires s'équilibrent pour assurer l'homéostasie tissulaire et maintenir une taille constante des organes (Molecular Biology of the Cell, 4th edition 2002, Alberts B et al.). Sans l'apoptose, un type de mort cellulaire programmée, 2 tonnes de moelle osseuse et de ganglions lymphatiques (environ 26 fois le poids d'un homme adulte moyen), ainsi que 16 km d'intestin (plus de 63 fois la longueur du Parc des Princes), s'accumuleraient potentiellement au sein du corps d'une personne âgée de 80 ans (Melino, 2001). L'apoptose est un phénomène « silencieux », aboutissant au démantèlement puis à l'élimination par endocytose de la cellule « dangereuse » (infectée, endommagée ou auto-réactive) ou devenue obsolète (P. M. Henson & Hume, 2006; J. Savill, Fadok, Henson, & Haslett, 1993), par les macrophages (Aderem A, 1999) ou les cellules avoisinantes, comme les fibroblastes et les cellules épithéliales (Monks, Smith-Steinhart, Kruk, Fadok, & Henson, 2008). L'intégrité de la membrane plasmique est maintenue tout au long de ce processus qui se déroule donc sans la libération du contenu intracellulaire dans l'environnement, stimulant l'inflammation, l'opposant ainsi à la nécrose considérée comme une mort cellulaire accidentelle (MCA) (Kanduc et al., 2002; Krysko, Vanden Berghe, D'Herde, & Vandenabeele, 2008). Ce processus universel, génétiquement programmé et très conservé au sein du règne animal, du ver *Caenorhabtidis Elegans* à l'Homme (Hengartner & Horvitz, 1994; Jabbour et al., 2006; Vaux, Weissman, & Kim, 1992), constitue la part de mort nécessaire à la survie de l'individu. Chaque seconde, environ 100 000 cellules sont produites par mitose et l'apoptose engendre la « mort naturelle » d'un nombre similaire de cellules chez l'Homme soit un nombre colossal de plus de 8 milliards de cellules par jour, garantissant ainsi l'homéostasie cellulaire (Vaux & Korsmeyer, 1999). Les kératinocytes, les hématocytes et les entérocytes constituent le corps de ces cellules continuellement renouvelées.

Outre son rôle de garant de l'homéostasie cellulaire, l'apoptose joue un rôle majeur dans de nombreux phénomènes fondamentaux rythmant la vie de l'organisme (Figure 1). Ainsi, l'apoptose intervient dans la morphogénèse de l'organisme. La sculpture des doigts et des orteils par l'intermédiaire de l'élimination des cellules interdigitées dont le défaut conduit à la syndactylie, l'élimination de la nageoire caudale du têtard au cours de la métamorphose ou encore la formation de l'orifice vaginal chez la souris (Lindsten et al., 2000) en sont des illustrations évidentes. De plus, la mise en place et le maintien du réseau neuronal dépendent

également de l'apoptose (Sanchez & Yuan, 2001). En effet, les nouveaux-nés naissent avec un excès important de neurones. Seuls les neurones impliqués dans des circuits synaptiques sont sensibles aux neurotrophines, des facteurs de croissance permettant de soutenir leur survie. Les neurones incapables d'établir des connexions, devenus *de facto* inutiles, sont éliminés par apoptose. Ce mécanisme permet d'expliquer l'atrophie spinale infantile, une maladie qui finit par causer la mort des nourrissons qui en sont atteints. Chez le fœtus atteint d'atrophie spinale, l'apoptose, au lieu de se restreindre aux motoneurones (neurones assurant la connexion entre le cerveau et les muscles) en surnombre, touche également les neurones connectés et fonctionnels.

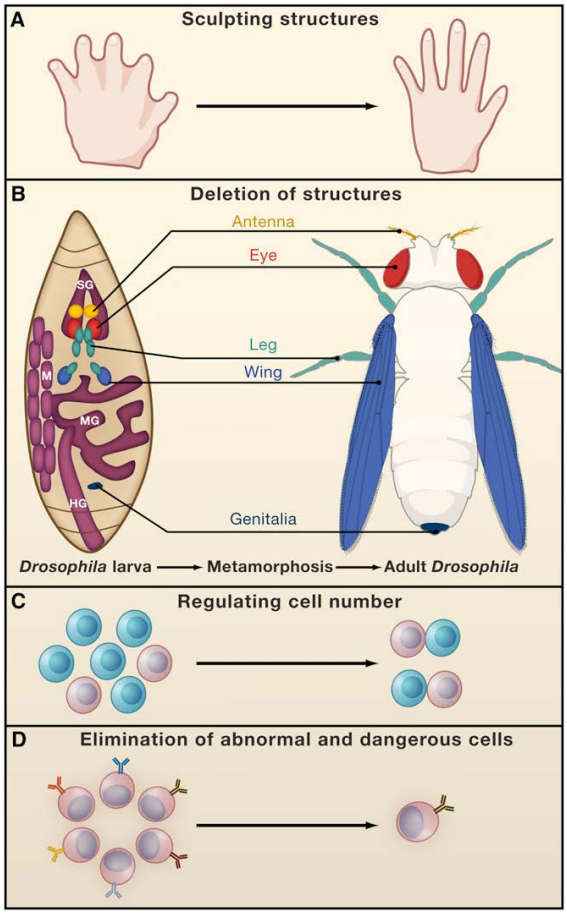


Figure 1 - Les fonctions de la MCP
(A) La MCP régule la « sculpture » correcte de la main en éliminant la palmure interdigitale. (B) Durant la morphogénèse de *Drosophila,* presque toutes les structures larvaires sont détruites, comme les glandes salivaires (SG), les muscles (M), l'intestin moyen (MG) et l'intestin postérieur (en violet), alors que des nouvelles structures issues de cellules indifférenciées des disques imaginaux se forment (les autres couleurs). (C et D) La MCP contrôle également le nombre de cellules, par exemple en éliminant les cellules qui ne parviennent pas à s'associer à d'autres (C) et élimine les cellules dangereuses et anormales comme les lymphocytes auto-réactifs (D).
Tiré de (Fuchs & Steller, 2011)

L'apoptose joue aussi un rôle dans la genèse et le développement du système immunitaire. 98% des lymphocytes T meurent par négligence (perte de stimulation trophique) ou sont activement éliminés lors de l'éducation thymique au cours des sélections positive puis négative. Enfin, les animaux adultes doivent être capables d'éliminer les cellules ectopiques. Lorsque la peau est entaillée, les cellules de l'épiderme peuvent être déplacées dans l'hypoderme et le tissu sous-cutané, où elles pourraient être dangereuse si elles survivaient et proliféraient. L'existence de signaux de survie spécifiques aux tissus, permet de résoudre ce problème en assurant la mort de ces cellules « indésirables ».

Ainsi, l'apoptose permet de contrôler un nombre important de phénomènes vitaux et d'expliquer certaines situations pathologiques. Une compréhension approfondie des mécanismes qui la sous-tendent constitue donc potentiellement une des clés fondamentales permettant la mise au point de nouvelles thérapies efficaces ayant pour but de restaurer la fonction apoptotique dans les cas où elle est déficiente (cancer, par exemple) ou au contraire de juguler son activation (maladies neurodégénératives notamment).

A - L'apoptose, le suicide altruiste

Bien que la mort cellulaire programmée ait pu évoluer pour des raisons morphogénétiques et développementales, elle constitue également un mécanisme important de défense. Ce point est illustré par exemple par la réponse hypersensible des plantes, dans lesquelles la détection d'une seule bactérie par une cellule n'induit pas seulement la mort de cette dernière mais alerte les cellules avoisinantes, qui s'autodétruisent à leur tour (Lam, Kato, & Lawton, 2001; Morel & Dangl, 1997; Pontier, Balague, & Roby, 1998). Cette forme de mort cellulaire altruiste contribue à protéger l'hôte. Le décryptage de l'apoptose chez l'animal, apparenté à cette mort cellulaire « protectrice » a mis du temps à s'effectuer, laissant des zones d'ombre qui persistent encore aujourd'hui.

1/ Historique

Alors que la mort des cellules durant le développement normal a été rapporté pour la première fois par le naturaliste et médecin suisse Vogt en 1842, rapidement après l'établissement de la théorie cellulaire par Schleiden et Schwann entre 1838 et 1842, cela a été oublié, pour être redécouvert plusieurs fois jusqu'à la revue de Glucksmann en 1951 (Glucksmann, 1951). L'analyse de la mort cellulaire se cantonnait dans un premier temps à son étude morphologique (Clarke & Clarke, 1996). En effet, entre la fin des années 1800 et les années 1960, des figures illustrant les caractéristiques de la mort cellulaire comme le rétrécissement des cellules, la condensation de la chromatine, le démantèlement de la cellule et son endocytose ont été publiées. La proposition du terme « apoptose », provenant du grec ancien et faisant référence à la chute des feuilles des arbres en automne, n'a été faite qu'en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972), qui ont décrit les caractéristiques phénotypiques des cellules mourant par l'action de toxines ou d'hormones (Figure 2). L'identification de la mort cellulaire au sein de C. Elegans, caractérisé par la mort de 131 cellules somatiques sur 1090 au cours du développement (Ellis & Horvitz, 1986) en 1976 (Sulston, 1976) et la génération des premiers mutants ced (cell death abnormal) sept ans plus tard en 1983 (Hedgecock, Sulston, & Thomson, 1983) a constitué les prémices de la compréhension de la mort cellulaire au niveau génétique. Le « Big Bang » de l'apoptose s'est produit plus tard, à partir de l'identification des processus biochimiques et génétiques qui la gouverne, en commençant par la découverte du premier acteur du système, Bcl-2, en 1984

(Tsujimoto, Finger, Yunis, Nowell, & Croce, 1984) suivie de la démonstration de sa fonction anti-apoptique en 1988 (Vaux, Cory, & Adams, 1988) et de la découverte de Fas (Yonehara, Ishii, & Yonehara, 1989), 14 ans après celle du TNF (Carswell et al., 1975).

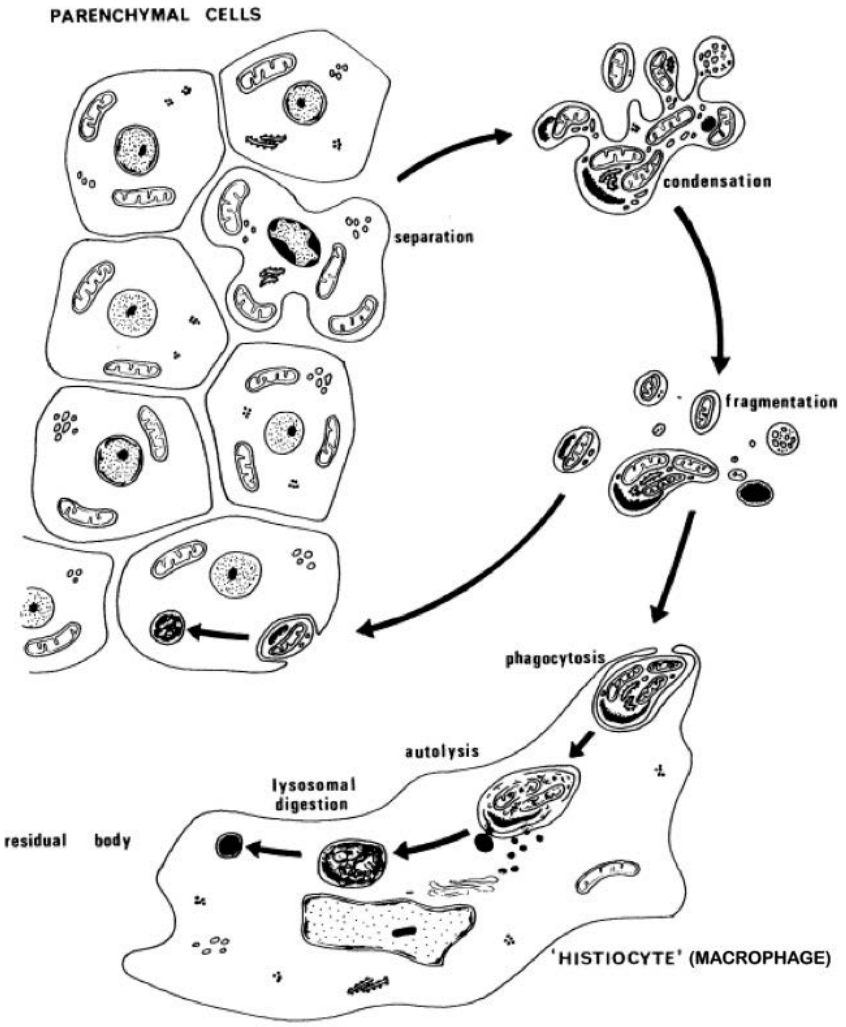


Figure 2 - Schéma illustrant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose
Tiré de (Kerr et al., 1972)

L'étude de l'apoptose a permis de mettre en lumière son caractère tragique, se déroulant en 3 actes: l'initiation, la décision et l'exécution. Le premier acte, la phase d'initiation du signal apoptotique consiste en l'intégration d'un stress (génotoxique, réticulaire, …) mais ne se manifeste par aucune modification morphologique de la cellule. Le deuxième acte, la décision, correspond au point de non retour à partir duquel la cellule va mourir de manière inéluctable. La fin de l'acte dépend du contexte cellulaire et aboutit à l'ouverture du dernier acte, l'exécution du signal apoptotique. Durant cet acte se déroule la phase finale d'induction

de l'apoptose à travers l'activation de nombreuses protéines au sein de la cellule, conduisant à l'apparition de différents changements morphologiques et biochimiques.

2/ Les conséquences de l'apoptose, une entreprise de démolition

L'apoptose, contrairement à la nécrose, est un processus actif. Cela a notamment été suggéré par des travaux montrant que la mort cellulaire chez le ver C. Elegans était causée par un processus qui lui était spécifique et qui n'avait aucune autre fonction que l'élimination des cellules « indésirables » (Horvitz & Sternberg, 1982). Des conclusions similaires peuvent être tirées de travaux réalisés dans des systèmes vertébrés, comme ceux de Tata, qui ont montrés que la mort cellulaire observée pendant la métamorphose du têtard pouvait être inhibé par la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, indiquant ainsi que son exécution requérait les protéines de la cellule censée mourir (Tata, 1966). Des changements morphologiques caractéristiques touchant la membrane plasmique, le cytosol, la mitochondrie et le noyau apparaissent lors de l'exécution de l'apoptose, contribuant au démantèlement des structures et de la fonction cellulaires.

a) Caractéristiques morphologiques de la cellule apoptotique

Une fois que le processus apoptotique est déclenché, une condensation du cytoplasme et une contraction de la cellule se produisent suite à la libération d'eau dans le milieu environnant (Wyllie, 1980). De plus, un « bourgeonnement » au niveau de la surface de la membrane cellulaire (ou «blebbing ») est observable (Brown, Warner, Ales-Martinez, Scott, & Phipps, 1992). Suite à ce « bourgeonnement », si la cellule n'est pas immédiatement phagocytée (J. S. Savill et al., 1989), des corps apoptotiques (« apoptotic bodies ») se forment. Ceux-ci correspondent à une fragmentation de la cellule en vésicules dont la membrane est intacte et qui empaquettent les organites cellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, fragments nucléaires,…) (Dive et al., 1992) (Figure 3).

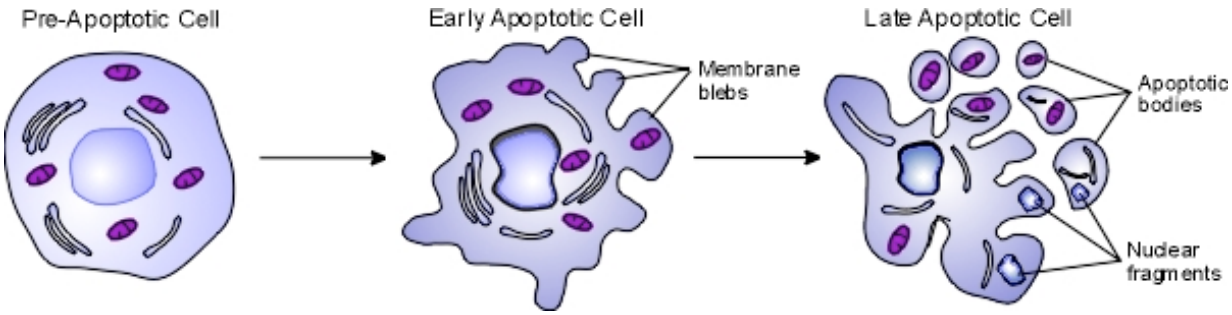


Figure 3 - Les conséquences morphologiques de l'apoptose
Récupérée à l'adresse http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html

Ce « bourgeonnement cellulaire » qui consiste en l'apparition de multiples protubérances à la surface cellulaire, porte au niveau de la membrane plasmique des altérations consécutives à l'induction de l'apoptose et facilitant l'élimination de la cellule condamnée.

b) Conséquences membranaires de l'apoptose

Une fois que le programme apoptotique est arrivé à son terme, la cellule doit être éliminée. Pour cela, de façon concomitante avec l'eau, de l'ATP et de l'UTP notamment, sont libérés par la cellule apoptotique. Ces molécules constituent un signal « trouve-moi » (« find me ») qui attire les macrophages (Elliott et al., 2009; Gregory, 2009). Ensuite, la phagocytose de la cellule apoptotique est initiée par la reconnaissance d'un signal « mange-moi » (« eat me »), correspondant à la présence de résidus phosphatidyl-sérine (PS) sur la face externe de la membrane plasmique de cette dernière (Fadok, Savill, et al., 1992; Fadok, Voelker, et al., 1992), via des récepteurs spécifiques exprimés par les macrophages (Fadok et al., 2000) (Figure 4).

La membrane plasmique, constituée d'une bicouche lipidique contenant des protéines réparties de façon asymétriques sur ses deux faces, est en effet altérée au cours de l'apoptose. Ainsi, les résidus PS, des phospholipides anioniques, exprimés au niveau de la face interne de la membrane plasmique des cellules viables, sont externalisés suite à l'inhibition de l'activité des translocases et des scramblases responsables du maintien de l'asymétrie membranaire au cours de l'apoptose (Schlegel, Callahan, Krahling, Pradhan, & Williamson, 1996).

Dans des conditions normales, l'élimination de la cellule apoptotique exposant des signaux « mange-moi » par phagocytose est rapide et efficace. En effet, même dans les tissus avec un renouvellement cellulaire élevé, très peu de cellules apoptotiques sont observables. Cependant, si les cellules apoptotiques ne sont pas prises en charge et digérées par les

phagocytes, elles peuvent entrer dans ce que l'on appelle la nécrose secondaire (Kerr, Winterford, & Harmon, 1994; Kerr et al., 1972) et libérer leur contenu cellulaire dans l'environnement, entraînant une réponse inflammatoire. Ce phénomène est d'ailleurs lié au développement de certaines maladies auto-immunes (Nagata, Hanayama, & Kawane, 2010; J. Savill & Fadok, 2000).

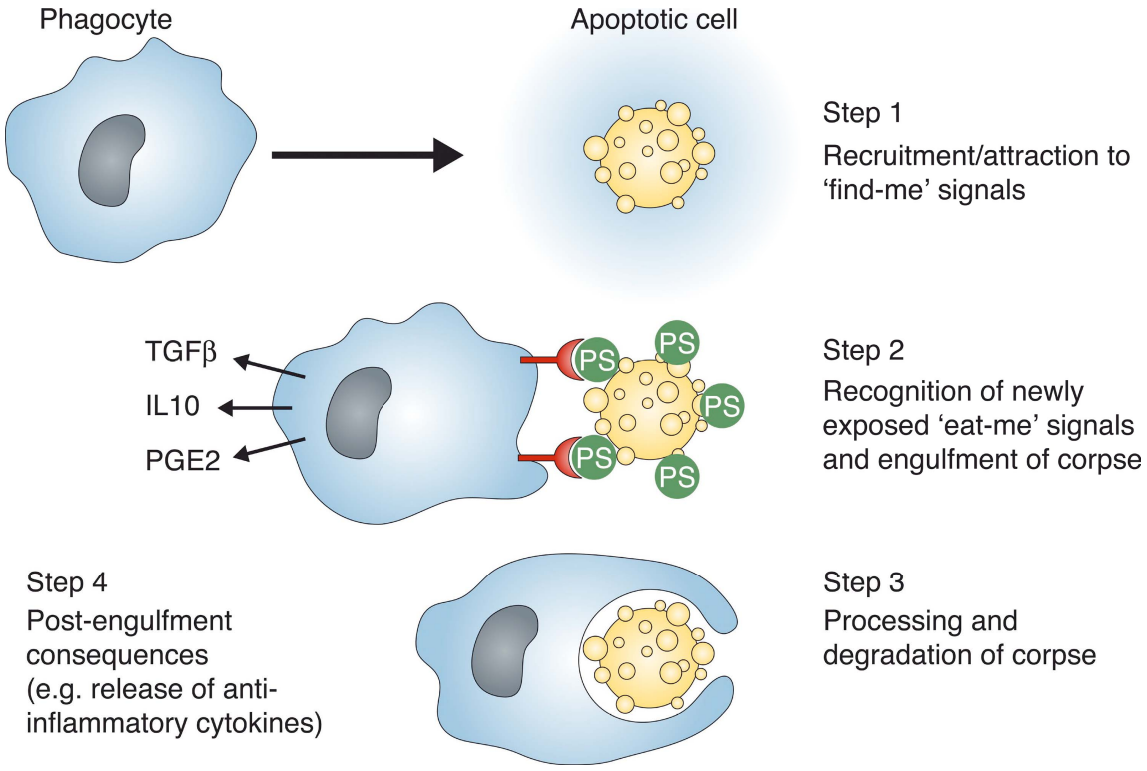


Figure 4 - Les différentes étapes impliquées dans l'élimination efficace des cellules apoptotiques
Les signaux « trouve-moi » (« find-me signals »), comme des niveaux faibles de nucléotides ATP et UTP, libérés par les cellules apoptotiques, contribuent à attirer les phagocytes. Les phagocytes utilisent ensuite des récepteurs à leur surface, capables de reconnaître les signaux « mange-moi » (« eat-me signals ») matérialisés par l'externalisation de la phosphatidyl-sérine (PS). La fixation du récepteur à la PS, stimule la libération de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β, l'IL-10 et la prostaglandine E2 (PGE2). De plus, la signalisation intracellulaire dans le phagocyte, induite par cette interaction, entraîne des réarrangements du cytosquelette et une internalisation de la cellule apoptotique. Une série d'étapes, non détaillée ici, constitue le processus de phagocytose menant à la digestion de la cellule apoptotique.
D'après (Ravichandran, 2010)

Avant d'être éliminée, la cellule apoptotique subit une destruction des structures et fonctions cellulaires, affectant notamment le noyau.

c) Altérations nucléaires

L'apoptose mène à de multiples modifications caractéristiques au niveau nucléaire (Martelli et al., 2001; Nagata, 2000). On observe ainsi une condensation de la chromatine, impliquant les protéines AIF et Acinus (Sahara et al., 1999; Susin et al., 1999). Le noyau se condense progressivement puis se fragmente (caryorrhexie) (Figure 5). Le désassemblage de la lamina nucléaire, contribuant à établir la structure de l'enveloppe nucléaire, est aussi une caractéristique essentielle de la « désintégration nucléaire » (Lazebnik, Cole, Cooke, Nelson, & Earnshaw, 1993). Ce processus dépend de la dégradation des lamines nucléaires A et B, formant la lamina, par des protéases à cystéine, les caspases, activées au cours de l'apoptose (Hoshi et al., 1996; Orth, Chinnaiyan, Garg, Froelich, & Dixit, 1996).

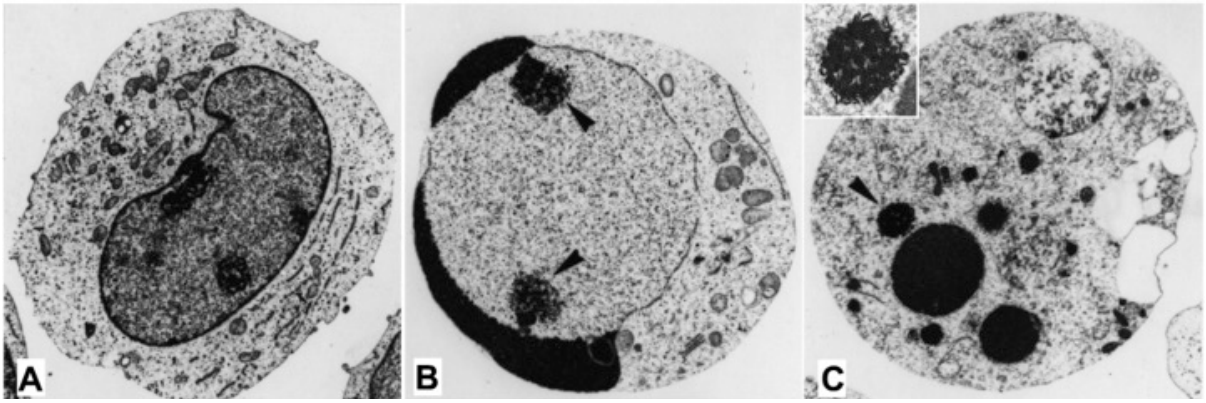


Figure 5 - Illustration de la condensation de la chromatine (B) et de la framentation du noyau (C) au cours de l'apoptose
D'après (Ziegler & Groscurth, 2004)

Les protéines impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine (Nicholson & Thornberry, 1997) ou les interactions entre la chromatine et la matrice nucléaire, comme NuMa (NUclear Mitosis Associated protein) (Casiano, Martin, Green, & Tan, 1996) sont aussi clivées. De manière importante, l'ADN est dégradé par des « DNAses » qui le fragmente en multiple de 180-200 paires de bases (Wyllie, 1980). Les enzymes responsables de cette fragmentation pendant l'apoptose sont principalement DFF40 (DNA Fragmentation Factor 40) (X. Liu et al., 1998) et CAD (Caspase Activated DNAse) (Enari et al., 1998; Sakahira, Enari, & Nagata, 1998). Ces protéines sont présentes dans les cellules viables sous forme d'hétérodimères inactifs avec leurs inhibiteurs respectifs, DFF45 (X. Liu, Zou, Slaughter, & Wang, 1997) et ICAD (Inhibitor of CAD) (Sakahira et al., 1998), clivés au cours de l'apoptose.

Durant l'apoptose, l'une des cibles altérées est donc ce qui s'apparente au cerveau de la cellule, son noyau. Cependant, la cellule est aussi touchée en plein cœur, au niveau de la mitochondrie, son « usine énergétique ».

d) Impact de l'apoptose au niveau mitochondrial

La mitochondrie est un organite cytosolique délimité par une membrane interne et une membrane externe bornant un espace inter-membranaire et renfermant une matrice. Elle constitue le cœur énergétique de la cellule en assurant la synthèse d'ATP à travers la chaîne respiratoire qui génère un gradient de protons à partir du glucose. Ce gradient, résultat d'une distribution asymétrique des charges entre la membrane interne et la membrane externe de la mitochondrie, est responsable de la création d'un potentiel mitochondrial transmembranaire. Au cours de l'apoptose, le potentiel mitochondrial chute (Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1995) et des facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c sont libérés (Green, John, nbsp, & Reed, 1998; Hengartner, 2000; Kroemer & Reed, 2000), entraînant l'activation des caspases qui sont les exécuteurs de l'apoptose.
La morphologie de la mitochondrie est aussi altérée. En effet, suite à l'induction de l'apoptose, on peut observer un gonflement et une fragmentation de la mitochondrie (Desagher & Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Kroemer, Zamzami, & Susin, 1997).
Dans le cytosol, la mitochondrie n'est pas le seul élément endommagé au cours de l'apoptose, des protéines clés sont aussi ciblées.

e) Impact au niveau cytoplasmique

Les cellules qui entrent en apoptose activent de nombreuses protéines dans une séquence finement régulée temporellement et spatialement. Des protéines de structure sont clivées lors de l'initiation de la cascade d'évènements apoptotiques, participant ainsi notamment aux changements morphologiques subis par la cellule (voir plus haut). L'une de ces protéines victimes de l'apoptose est l'actine qui est un composant important du cytosquelette (Mashima et al., 1997). D'autres protéines sont aussi clivées durant l'apoptose. Des protéines impliquées dans la maintenance, l'organisation et l'attachement du cytosquelette comme Gas2 (Sgorbissa, Benetti, Marzinotto, Schneider, & Brancolini, 1999) et PAK2 (Chan, Yu, & Yang, 1999; Tang et al., 1998) ou les jonctions cellulaires comme la spectrine (Toporkiewicz

et al., 2013; Williams, Smith, Cianci, Morrow, & Brown, 2003) et la fodrine (Cryns, Bergeron, Zhu, Li, & Yuan, 1996), participant à la perte de contact avec les cellules avoisinantes et facilitant ainsi l'élimination de la cellule apoptotique par les macrophages.
Les différentes modifications morphologiques énumérées précédemment sont caractéristiques de l'apoptose et diffèrent en grande partie des autres types de mort cellulaire.

B - Les types de mort cellulaire non apoptotique, les différents visages de la mort

L'apoptose occupe une place prépondérante non seulement au cours du développement mais aussi tout au long de la vie des organismes multicellulaires. Lorsqu'elle est inhibée dans les cellules de mammifères, ces cellules meurent souvent par d'autres mécanismes (Yuan & Kroemer, 2010). L'apoptose est généralement mise en parallèle avec la nécrose, un autre type de mort cellulaire qui en diffère à de multiples points de vue.

1/ La nécrose

Il y a encore une dizaine d'années, la manière la plus largement acceptée de caractériser la nécrose, était de montrer que la mort cellulaire observée n'était pas apoptotique. En effet, la nécrose se distingue de l'apoptose par différents points. Contrairement à l'apoptose qui fait suite au déclenchement d'un programme de suicide cellulaire, la nécrose est un processus passif, se dispensant de la participation active de la cellule. Elle se caractérise par un gonflement des organelles cellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie) (Leist & Jaattela, 2001; Schweichel & Merker, 1973) et la perte rapide des potentiels membranaires de la cellule. L'incapacité à maintenir ces potentiels électrochimiques conduit à un gonflement du cytoplasme dû à l'entrée massive d'eau et d'électrolytes dans la cellule (Ruf et al., 1999), entraînant une rupture de la membrane plasmique (Figure 6). La libération du contenu cellulaire dans le milieu environnant est typiquement à l'origine de l'induction d'une inflammation locale (Zong & Thompson, 2006). De plus, l'ADN cellulaire est clivé de manière aléatoire par des endonucléases (Bicknell & Cohen, 1995).

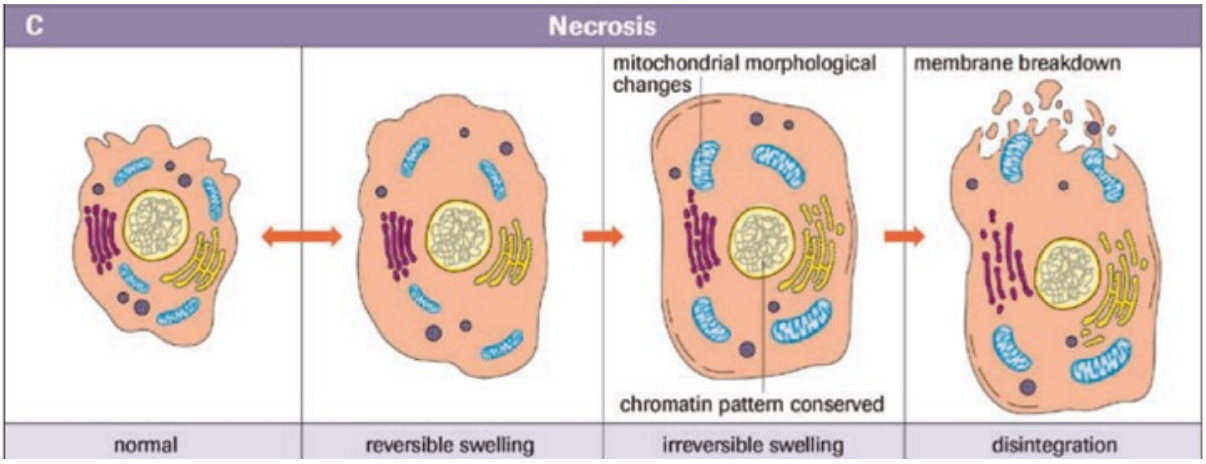


Figure 6 - Aspects morphologiques de la nécrose
Tiré de « Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation », 4e édition, Roche

La nécrose intervient à la suite des traumatismes cellulaires extrêmes comme l'hypoxie ou un choc thermique par exemple. Beaucoup de stimuli induisent l'apoptose à une faible dose et la nécrose à une dose plus élevée (UV par exemple), faisant de la nécrose une mort cellulaire par défaut, mise en œuvre lorsque la machinerie apoptotique est débordée par la sévérité du stress. Enfin, il est à noter que la nécrose n'est pas considérée comme un type de mort cellulaire *bona fide* par certains mais plutôt comme des modifications *post mortem* (Majno & Joris, 1995; Trump, Berezesky, Chang, & Phelps, 1997; Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002). Ainsi, pour eux, la nécrose est un phénomène survenant après la mort cellulaire à proprement parler, notamment à la suite de l'apoptose, si la cellule ou les corps apoptotiques ne sont pas pris en charge et éliminés, ou encore à la suite de l'oncose (Figure 7).

2/ L'oncose

L'oncose, une forme passive ou accidentelle de mort cellulaire, a des caractéristiques très proches de la nécrose. Ce terme, signifiant gonflement en grec, a été utilisé pour la première fois en 1910 par von Recklinghausen et se réfère à la mort cellulaire suite à l'ischémie ou des dommages liés à des agents toxiques comme CCl4 ou HgCl2 (Trump et al., 1997). Elle se caractérise par un gonflement de la cellule et de ses organites (noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique), causé par l'inactivation des pompes ioniques au niveau de la membrane plasmique, et est associée à une vacuolisation du cytoplasme (Majno & Joris, 1995). Cependant, contrairement à la nécrose « implosive », l'intégrité de la membrane plasmique est préservée au cours de l'oncose (Weerasinghe & Buja, 2012).

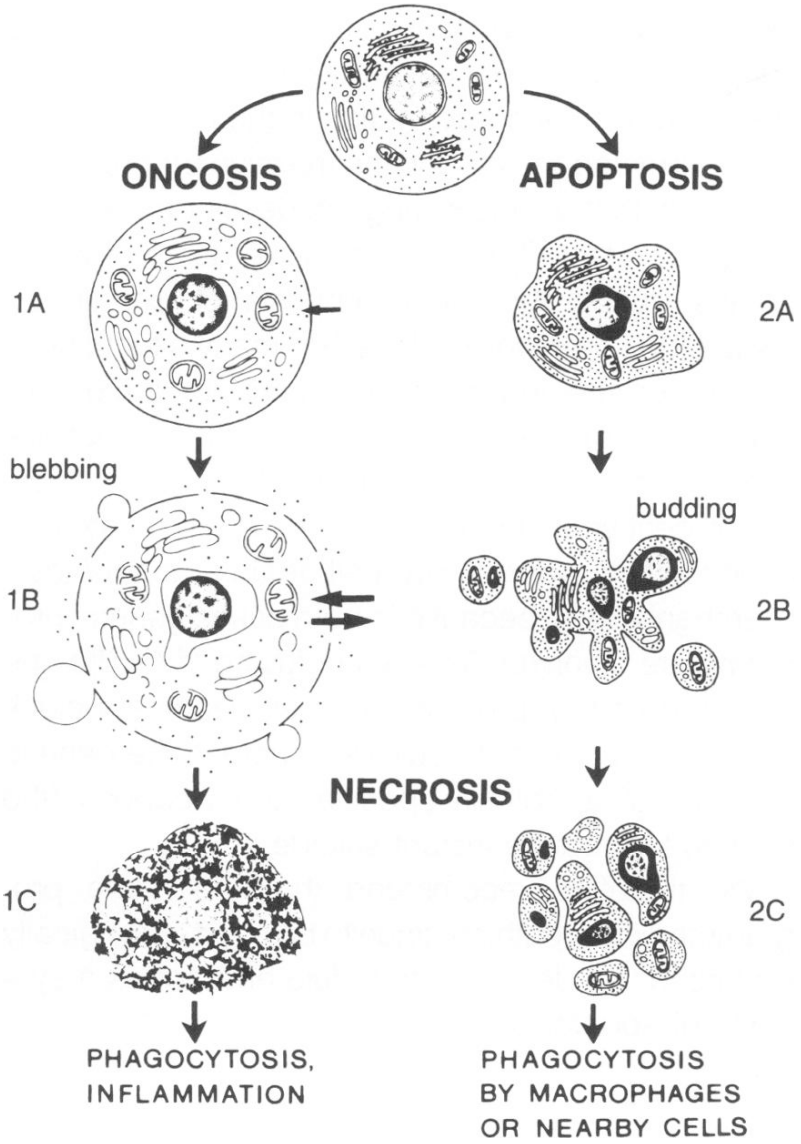


Figure 7 - Aspects morphologiques de l'oncose, comparés à l'apoptose
Tiré de (Majno & Joris, 1995)

L'ischémie induit notamment un déficit dans la production d'ATP au sein de la cellule, contribuant à la mort cellulaire. Une déplétion en facteurs de croissance ou en nutriments peut aussi conduire à ce déficit énergétique, entraînant potentiellement l'activation de l'autophagie qui peut être suivie ou non de l'induction de la mort cellulaire.

3/ L'autophagie

Dans les cellules saines, un équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique, ainsi que la biogénèse et le recyclage des organites s'établit. Les protéines à longue durée de vie et les organites cellulaires sont éliminées par autophagie.

Typiquement, l'autophagie est un processus non spécifique au cours duquel les cellules génèrent de l'énergie et des métabolites par l'intermédiaire de la digestion et du recyclage de leurs propres organelles non essentielles, redondantes ou endommagées, ainsi que leurs macromolécules (Klionsky, 2007; Kroemer & Jaattela, 2005) (Figure 8).

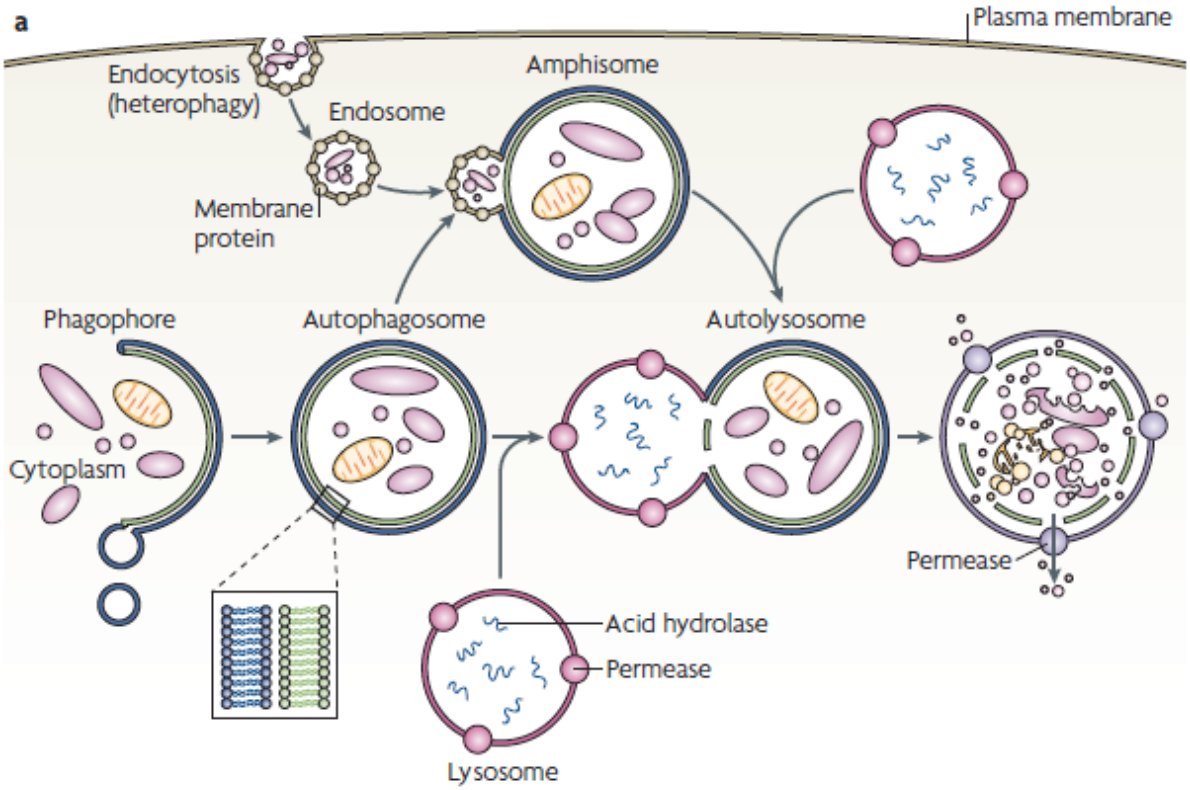


Figure 8 - Déroulement du processus autophagique
Tiré de (Klionsky, 2007)

Elle constitue une réponse adaptative à un stress sub-létal comme la déplétion en facteurs de croissance ou en nutriments, permettant à la cellule de survivre. Cependant, si cette situation perdure pendant une période trop importante, la cellule digère finalement tous les substrats disponibles et meurt, c'est ce que l'on appelle la mort cellulaire associée à l'autophagie (Galluzzi et al., 2007; Kroemer et al., 2009).

Trois formes d'autophagie ont été définies sur la base de la façon dont les lysosomes reçoivent le matériel qui va être dégradé.

Dans la macroautophagie, une double membrane, le phagophore, va se former puis envelopper complètement le « cargo », formant ainsi l'autophagosome. L'autophagosome va ensuite fusionner avec les lysosomes permettant ainsi la dégradation de son contenu au sein de cette nouvelle structure appelée autophagolysosome ou autolysosome.

La microautophagie (W. W. Li, Li, & Bao, 2012; Mijaljica, Prescott, & Devenish, 2014; Shpilka & Elazar, 2011), moins étudiée, consiste en l'invagination de la membrane lysosomale, qui enveloppe le « cargo » avant d'en dégrader le contenu.

Enfin, dans l'autophagie régulée par les protéines chaperonnes, ces dernières livrent directement les substrats aux lysososmes. Cette voie est notamment impliquée dans la dégradation des protéines HIF1α (médiateur de la réponse à l'hypoxie) (Ferreira et al., 2013; Hubbi et al., 2013) et Chk1 suite à un stress génotoxique (C. Park, Suh, & Cuervo, 2015).

Le rôle de l'autophagie dans la mort est soumis à controverse (Levine & Yuan, 2005). En effet, bien qu'une augmentation du nombre d'autophagosomes est observable au cours de la mort cellulaire, il reste à déterminer de façon claire si ces structures facilitent la mort cellulaire ou si elles caractérisent une cellule qui n'arrive plus à compenser le manque de nutriments par le sacrifice de ses composants vitaux. L'autophagie semble cependant être un mécanisme de survie plutôt qu'un acteur contribuant directement à l'induction de la mort cellulaire.

Une fois l'épisode de déplétion en nutriments révolu, si la cellule est parvenue à survivre, elle retrouve progressivement un métabolisme normal et peut de nouveau potentiellement se diviser par mitose. Cependant, un mauvais déroulement de la mitose peut conduire à ce que l'on appelle la catastrophe mitotique.

4/ La catastrophe mitotique

Dans une définition stricte, le terme catastrophe mitotique (CM) est employé uniquement pour une mort cellulaire se produisant au cours de la mitose (Roninson, Broude, & Chang, 2001; Vakifahmetoglu, Olsson, & Zhivotovsky, 2008). De manière plus générale, la catastrophe mitotique fait référence aux cas de mort cellulaire au cours de la mitose ou lors de l'interphase, déclenchés par une mitose aberrante ((Galluzzi et al., 2007), (Okada & Mak, 2004)). Elle est associée à la formation de noyaux multiples et de cellules géantes (Tolmach & Marcus, 1960) dont l'ADN n'est pas fragmentée et qui contiennent des chromosomes non condensés. La CM se distingue ainsi morphologiquement de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie.

D'autres types de mort ont également été rapportés dans la littérature (entose, anoïkis, paraptose, pyroptose, pyronécrose,…), ils sont cependant propres à un type cellulaire

particulier ou dépendent de voies de signalisation très particulières et ne seront pas abordés en détail ici.

Comme vu précédemment (Figure 1), l'apoptose joue un rôle central dans un nombre important de processus physiologiques. Une dérégulation significative de ce programme de mort peut s'avérer désastreux chez l'Homme.

C - Altérations de l'apoptose et pathologies associées, qui s'y frotte, s'y pique

On parle de dérégulation de l'apoptose lorsque celle-ci est stimulée de façon excessive, menant à une mort cellulaire injustifiée ou au contraire, lorsqu'elle est inhibée, permettant la survie de cellules endommagées et dangereuses, porteuses de mutations génétiques ou de caractéristiques normalement délétères. Elle participe ainsi au développement de nombreuses pathologies humaines, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix (Kamal, Faazil, & Malik, 2014; Lopez & Tait, 2015) (Figure 9).

Diseases Associated with the Inhibition of Apoptosis	Diseases Associated with Increased Apoptosis
1. Cancer	1. AIDS
Follicular lymphomas	2. Neurodegenerative disorders
Carcinomas with *p53* mutations	Alzheimer's disease
Hormone-dependent tumors	Parkinson's disease
Breast cancer	Amyotrophic lateral sclerosis
Prostate cancer	Retinitis pigmentosa
Ovarian cancer	Cerebellar degeneration
2. Autoimmune disorders	3. Myelodysplastic syndromes
Systemic lupus erythematosus	Aplastic anemia
Immune-mediated glomerulonephritis	4. Ischemic injury
3. Viral infections	Myocardial infarction
Herpesviruses	Stroke
Poxviruses	Reperfusion injury
Adenoviruses	5. Toxin-induced liver disease
	Alcohol

Figure 9 - Pathologies associées à une induction ou une inhibition de l'apoptose
Tiré de (C. B. Thompson, 1995)

1/ Excès d'apoptose, trop d'une bonne chose est mauvais

De nombreuses pathologies humaines sont liées à un excès d'apoptose. En effet, l'apparition du SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise), fait suite à l'induction de l'apoptose des lymphocytes T CD4+ (Dabrowska, Kim, & Aldovini, 2008; Grivel, Malkevitch, &

Margolis, 2000; Muro-Cacho, Pantaleo, & Fauci, 1995; Rosok et al., 1998), laissant la voie libre au développement de maladies opportunistes (tuberculose par exemple) chez les patients qui en sont atteints. Les protéines Tat et gp120, codées par le VIH (Virus de l'Immunodéficience acquise Humaine) et sécrétée par les cellules infectées, participe à l'induction de l'apoptose des cellules non infectées via la déstabilisation de leur réseau microtubulaire (D. Chen, Wang, Zhou, & Zhou, 2002) et la régulation positive de l'expression du recepteur de mort Fas (Westendorp et al., 1995). Des travaux récents suggèrent cependant que l'apoptose n'est responsable que de 5% de la mort des lymphocytes T alors que la majorité serait due à l'induction de la pyroptose, un autre type de MCP (Doitsh et al., 2014).

L'apoptose est aussi impliquée dans le développement de certaines maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer correspondant à la mort des neurones cholinergiques (Obulesu & Lakshmi, 2014), de Parkinson, touchant les neurones dopaminergiques (plutôt au niveau du stade final de la maladie) (Anglade et al., 1997; Hirsch et al., 1999; Tatton, Chalmers-Redman, Brown, & Tatton, 2003) et de Huntington ciblant les neurones GABAergiques du striatum (Hickey & Chesselet, 2003; Sawa, Tomoda, & Bae, 2003; Teles et al., 2008). Les maladies autoimmunes induisant une production d'anticorps détruisant du tissu sain (Thyroïdite d'Hashimoto par exemple) ou les lésions ischémiques (infarctus du myocarde) font intervenir l'apoptose dans leur évolution. Enfin, des données indiquent que le diabète de type 1 (et de type 2) est aussi une pathologie causée par une apoptose excessives, celle des cellules β des îlots de Langerhans (Nogueira et al., 2013).

2/ Défaut d'apoptose, quand la survie (cellulaire) peut engendrer la mort (de l'individu)

L'homéostasie immunitaire et la maintenance de la tolérance immunitaire, dépendent de l'induction de l'apoptose et de l'élimination rapide des corps apoptotiques dans les organes périphériques primaires et secondaires (Siegel, Chan, Chun, & Lenardo, 2000). Des maladies autoimmunes peuvent donc émerger soit d'un défaut d'élimination de lymphocytes T ou B autoréactifs (Bouillet et al., 1999; Strasser, Whittingham, et al., 1991), engendrant une destruction de tissu sain, soit d'un défaut de clairance des cellules apoptotiques exposant des auto antigènes à leur surface (Lauber, Blumenthal, Waibel, & Wesselborg, 2004). Un défaut d'apoptose participe ainsi au développement du syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité, impliquant notamment des mutations dans Fas/FasL et les caspases -8 et -10 (Puck

& Sneller, 1997; Worth, Thrasher, & Gaspar, 2006) mais aussi de la polyarthrite rhumatoïde (H. Liu, 2003), par exemple.

Certains virus induisent une résistance des cellules qu'ils infectent aux stimuli apoptotiques, via notamment l'expression de protéines dont la structure et la fonction sont très proches de celles impliquées dans la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose (plus de détails dans la suite) (Cuconati & White, 2002).

L'activation d'oncogènes (tels que myc ou ras) ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (p53 ou PTEN), entraînent une sur activation cellulaire ou contribuent à permettre à la cellule de passer outre les points de contrôle du cycle cellulaire, autorisant ainsi une prolifération cellulaire anarchique. Ces altérations s'accompagnent d'un stress important au sein de la cellule cancéreuse qui nécessite en contrepartie une inhibition des voies apoptotiques pour empêcher le déclenchement de la mort cellulaire (Lowe, Cepero, & Evan, 2004). En effet, le fait que la mort cellulaire par apoptose serve de barrière naturelle au développement de cancers est un concept qui a été établi à travers des études fonctionnelles convaincantes durant les vingt dernières années (Adams & Cory, 2007).

Ainsi, l'apoptose est considérée comme l'une des dix caractéristiques principales du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011). Ce programme cellulaire comprend une série d'étapes clés, dont la cascade d'activation de protéases particulières appelées caspases fait partie.

II. LES REGULATEURS DE L'APOPTOSE, L'HISTOIRE D'UN ASSASSINAT

Les premiers composants de la machinerie apoptotique ont été identifiés dans les années 90 par l'équipe de Horvitz, en étudiant les mécanismes de la mort cellulaire programmée au cours du développement du ver *Caenorhabditis elelgans* (Yuan, Shaham, Ledoux, Ellis, & Horvitz, 1993). A l'aide de mutants portant des pertes ou des gains de fonction de gènes spécifiques, ils ont identifié plusieurs gènes appelés ced (cell death abnormal) car altérant le développement de *C. elegans* via une régulation « anormale » de l'apoptose. Depuis la découverte du fait que le gène ced-3 (cell death abnormal-3) est indispensable à la mort cellulaire programmée au cours du développement de ce nématode, un effort important a été consenti pour mieux comprendre les mécanismes moléculaire à l'origine de l'apoptose. L'étude de ces mécanismes s'est étendue à d'autres espèces et a permis de découvrir que les caspases (cystein aspartate protease), apparentées à ced-3, ainsi que la grande majorité de la

machinerie moléculaire responsable de l'apoptose est conservée chez les métazoaires (Figure 10).

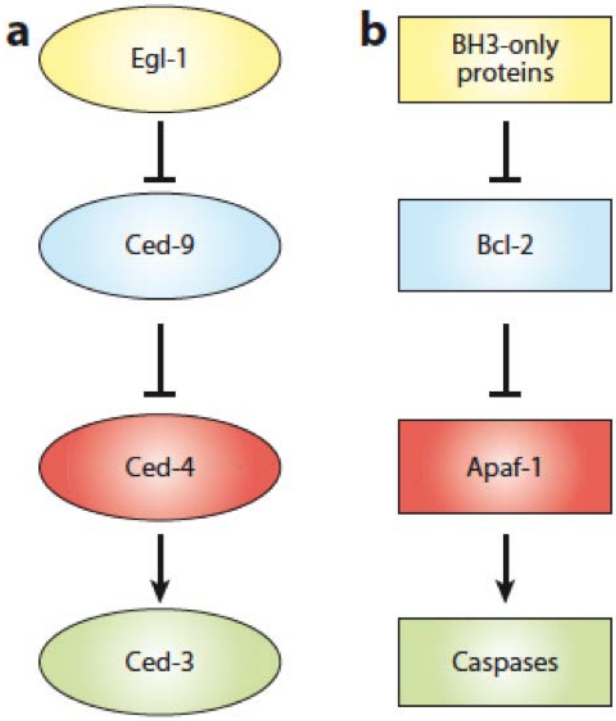


Figure 10 - Conservation des voies apoptotiques au cours de l'évolution
a) *C. elegans*, b) cellule de mammifère
Tiré de (Whelan, Kaplinskiy, & Kitsis, 2010)

A - Les caspases, ciseaux moléculaires

Les caspases, caractérisées chez les mammifères par homologie avec la protéine ced-3 de *C elegans* (Miura, Zhu, Rotello, Hartwieg, & Yuan, 1993), sont des protéases possédant une cystéine au niveau de leur site actif et sont capables de cliver leurs substrats après un résidu aspartate. Quatorze membres de cette famille, ont été décrit chez les mammifères et sont numérotés dans l'ordre de leur découverte (Nicholson & Thornberry, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998) (Figure 11).

Les caspases ont été classées en trois groupes selon leur fonction cellulaire. Ainsi, on distingue les caspases dites « initiatrices », les caspases-2, -8, -9 et -10, responsables de l'initiation du signal apoptotique, des caspases dites « effectrices » , les caspases-3, -6, -7 activées par ces dernières. Les caspases effectrices sont impliquées dans la transduction du signal apoptotique et sont responsables du démantèlement de la cellule et de l'apparition de

modifications morphologiques caractéristiques lors de la phase effectrice de l'apoptose en clivant des protéines cellulaires clés (Wolf & Green, 1999). Le troisième groupe de caspases, composé des caspases-1, -4 et -5 ne sont pas impliquées dans l'apoptose mais jouent un rôle important dans l'induction de la réponse inflammatoire (Fantuzzi & Dinarello, 1999; S. Wang et al., 1998).

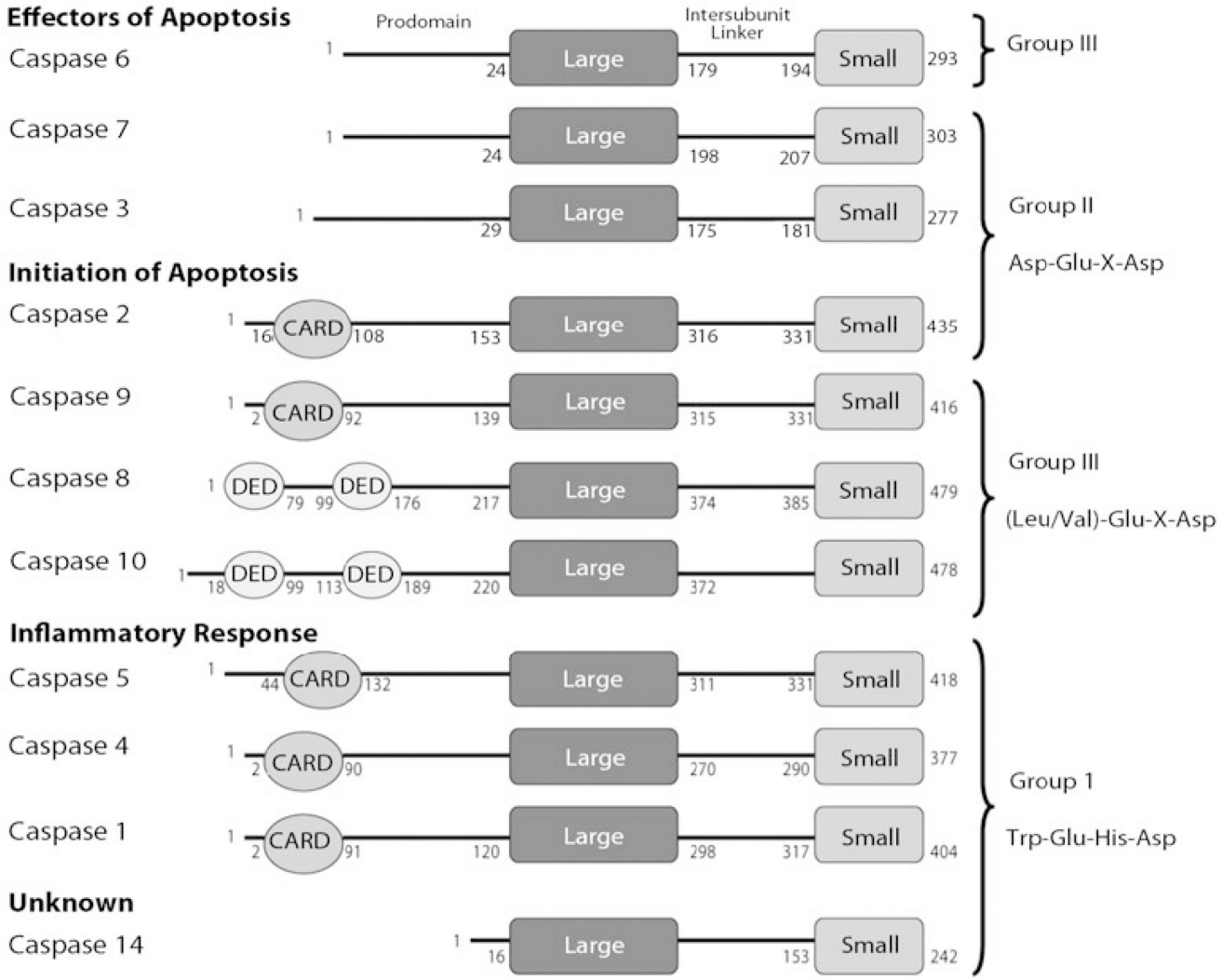


Figure 11 - Structure et classification des caspases
Tiré de (MacKenzie & Clark, 2012)

Les caspases sont toutes synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Leur structure est similaire et très conservée au cours de l'évolution. Elles comprennent un pro-domaine plus ou moins long, contenant des domaines importants pour le recrutement des caspases initiatrices, notamment dans leur partie N-terminale, et une petite sous unité en C-terminal, séparés par une grande sous unité comportant le site catalytique à résidu cystéine dans un motif consensus (QACxG) (Figure 11). Leur activation passe par leur clivage au niveau de deux sites, permettant l'excision du pro-domaine, ainsi que la dissociation des

petites et grandes sous-unités, autorisant l'assemblage d'un complexe formé de deux hétéro-dimères issus de l'activation de deux caspases et comprenant deux petites et deux grandes sous-unités (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994) (Figure 12).

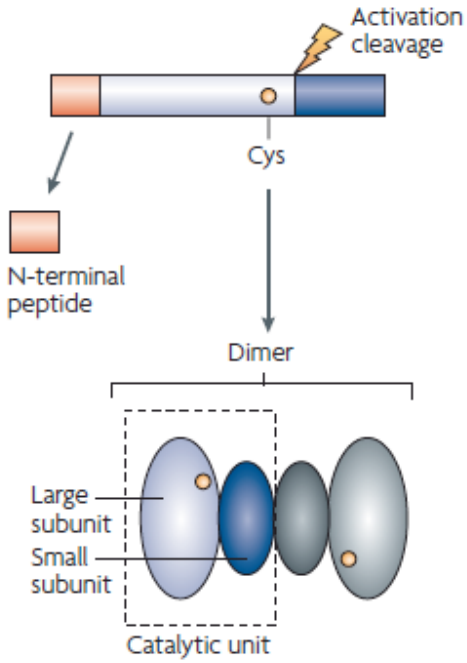


Figure 12 - Mécanisme d'activation des caspases
Tiré de (Riedl & Salvesen, 2007)

Une fois activées, les caspases peuvent, entre autres, activer d'autres caspases et ainsi contribuer à l'amplification du signal apoptotique, soit en en intensifiant l'initiation via le clivage des caspases initiatrices, soit en transduisant le signal à travers l'activation des caspases effectrices .

1/ Les caspases initiatrices, les mandataires

Les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) constituent le premier relai du signal apoptotique. Elles sont caractérisées par un pro-domaine long incluant des motifs spécifiques permettant leur recrutement et leur concentration au niveau de complexes multi-protéiques spécifiques, nécessaire à leur activation. Deux types de domaines existent: le domaine DED (Death Effector Domain), exprimés en tandem par les caspases-8 et -10 et le domaine CARD (CAspase Recrutment Domain) présent au sein des caspases-2 et -9 (voir Figure 11).

Les caspases initiatrices intègre un signal de mort (stress génotoxique par exemple), en le convertissant en une mort effective de la cellule à travers l'activation des caspases effectrices responsables de l'entrée dans la phase d'exécution de l'apoptose.

2/ Les caspases effectrices, les assassins

Les caspases effectrices (3, 6 et 7), contrairement aux caspases initiatrices, possèdent un pro-domaine court et sont dépourvus des motifs DED et CARD (Kumar, 1999). Elles peuvent, une fois activées par les caspases initiatrices, former une boucle d'amplification en activant d'autres caspases initiatrices. Ainsi, la caspase-3 est capable de cliver les caspase-2, -6, -8 et -9 (Slee et al., 1999).
L'activation de ces caspases constitue un point de non retour dans le processus apoptotique, rendant la mort cellulaire inéluctable. Ainsi, les caspases effectrices constituent le bras armé de la cellule, déclenchant le suicide cellulaire via le clivage de ce que l'on pourrait appeler les VIP (Very Important Proteins), régulant des fonctions cellulaires clés.

3/ Les substrats des caspases, les victimes

Les cellules apoptotiques meurent d'une façon stéréotypée, quelque soit le signal initiateur de mort. Le cytoplasme rétrécit, la membrane plasmique bourgeonne et forme des vésicules, et la phosphatidyl-sérine est exposée à la surface cellulaire. Dans le même temps, le volume du noyau diminue, la chromatine se condense et l'ADN se fragmente. L'identification des nombreux substrats des caspases permet d'expliquer comment celles-ci produisent ces changements (Earnshaw, Martins, & Kaufmann, 1999) (Figure 13).
Les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 font probablement partie des premières cibles des caspases au cours de l'apoptose (Mcl-1, Bcl-2, Bid). Ces clivages, participent à l'amplification du signal apoptotique. De plus, ICAD (inhibitor of CAD) est clivé pendant l'apoptose, permettant la libération de CAD (Caspase-Activated DNAse) responsable de la fragmentation de l'ADN.
Les caspases clivent aussi un grand nombre de protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires, comme les protéines participant à la mise en place du cytosquelette (actin, gelsonine, Gas2, …), des protéines de structure nucléaire (Lamines A et B), ainsi que des protéines jouant un rôle dans la réparation de l'ADN (PARP). Des protéines kinases (PKC,

PAK2, …) ainsi que des protéines impliquées dans des voies de transduction du signal (Rel A, PP2A) ou la régulation du cycle cellulaire (p21, rb) sont également clivées.
Au total, plus de 400 substrats ont été rapportés dans la littérature (Luthi & Martin, 2007).

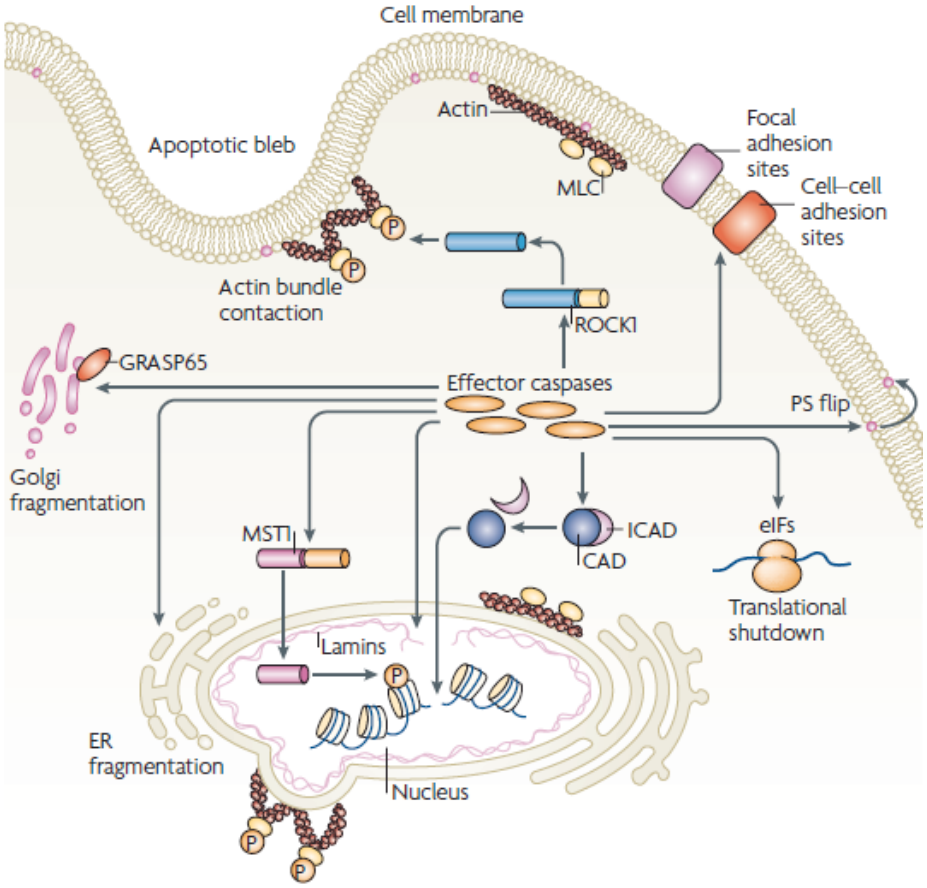


Figure 13 - Les caspases coordonnent la démolition des structures et des organites cellulaires clés
Tiré de (Taylor, Cullen, & Martin, 2008)

Albert Camus a dit qu' « il n'y a qu'un seul problème philosophique vraiment sérieux: c'est le suicide. Juger que la vie vaut ou ne vaut pas la peine d'être vécue ». La décision du suicide cellulaire par apoptose est irrévocable. Une fois ce programme cellulaire enclenché, la mort de la cellule concernée et ses conséquences au niveau tissulaire sont inéluctables. Il existe donc au sein de la cellule, des « garde-fous » qui, en fonction du contexte cellulaire, sont capables d'inhiber l'activation des caspases.

4/ Les inhibiteurs des caspases, le kevlar cellulaire

L'activation et l'activité des caspases peuvent ainsi être régulées par des interactions avec des inhibiteurs de l'apoptose appelés IAP (Inhibitor of apoptosis). Des gènes codants pour

des IAP virales, ainsi que l'inhibiteur de caspases à large spectre p35 (Bump et al., 1995; Xue & Horvitz, 1995), ont à l'origine été clonés à partir de baculovirus, sur la base de leur capacité à inhiber l'apoptose des cellules infectées de lépidoptères (Clem, Fechheimer, & Miller, 1991; Crook, Clem, & Miller, 1993). Bien que les cellules de mammifères ne semblent pas exprimer d'homologues de p35, huit homologues de l'IAP de baculovirus ont été décrits (Figure 14).

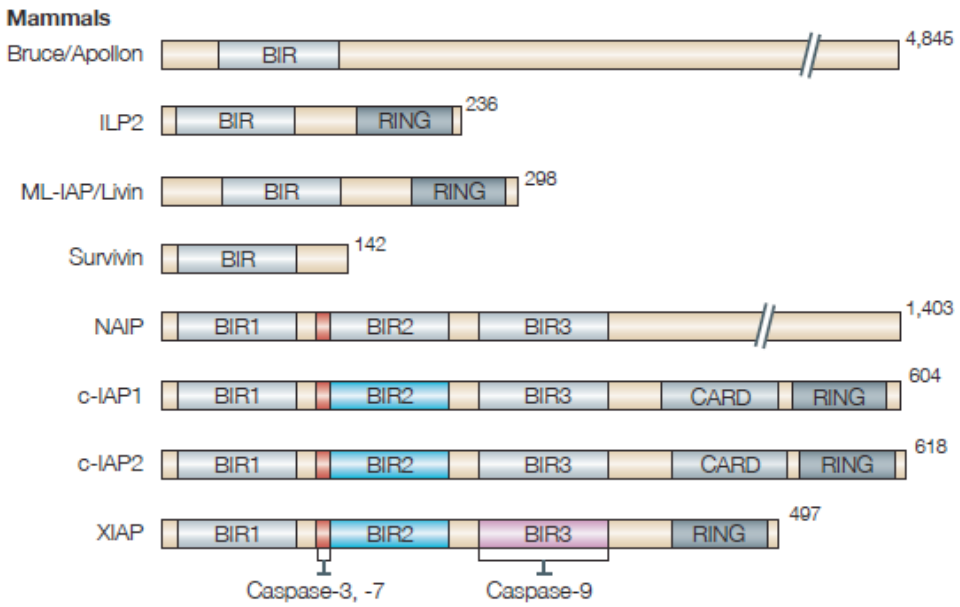


Figure 14 - Les IAP chez les mammifères
Tiré de (Riedl & Shi, 2004)

Cinq de ces polypeptides, cIAP-1 (cellular IAP-1) et -2, XIAP (X-linked IAP), ML(melanoma)-IAP/Livin et ILP2 (IAP-like Protein-2), contiennent en N-terminal entre 1 et 3 motifs BIR (Baculovirus IAP Repeat) (Birnbaum, Clem, & Miller, 1994), domaine partagé par toutes les IAP et un domaine d'interaction protéine-protéine RING (Really Interesting New Gene, domaine liant le zinc) (Lovering et al., 1993). Ce domaine RING, présente une activité de ligation de l'ubiquitine, permettant la dégradation des caspases par le protéasome. Comme leurs homologues viraux, ces protéines peuvent inhiber l'apoptose induite par différents stimuli (Ambrosini, Adida, & Altieri, 1997; Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996). XIAP est capable d'inhiber les caspases-3 et -7 actives (Deveraux et al., 1998). Elle est aussi capable d'interagir avec la procaspase-9 et de prévenir son activation (Deveraux et al., 1998). L'expression des IAP chez les mammifères varie au sein des différents types cellulaires (Ambrosini et al., 1997; Duckett et al., 1996). L'expression de la survivin, par

exemple, est plus élevée dans les tumeurs que dans les cellules normales (Ambrosini et al., 1997). De plus, cIAP1/2 et XIAP, ont été identifiés comme étant des transcrits induits par NFκB, contribuant à la protection des cellules contre le signal apoptotique constitué par le TNFα (Chu et al., 1997; Stehlik et al., 1998; C. Y. Wang, Mayo, Korneluk, Goeddel, & Baldwin, 1998; M. You, Ku, Hrdlickova, & Bose, 1997).

Les caspases initiatrices, comme vu plus haut, forment deux groupes distincts. Un premier groupe composé des caspases -8 et -10 et un deuxième incluant les caspases-2 et -9. Ce qui distingue ces deux groupes est la nature des motifs présents au niveau de leur pro-domaine en N-terminal, deux motifs DED pour l'un et un motif CARD pour l'autre, respectivement. Cette dichotomie au niveau des motifs exprimés, permet le recrutement de ces caspases au sein de complexes d'activation différents, impliqués dans deux voies majeures conduisant à l'apoptose.

B - Les voies d'activation des caspases, 2 voies pour 1 issue

Deux voies principales d'activation des caspases sont décrites dans la littérature: la voie apoptotique extrinsèque ou voie des récepteurs de mort d'une part, et la voie apoptotique intrinsèque ou voie apoptotique mitochondriale d'autre part.

1/ La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, un signal vertical

L'une des voies qui mènent à l'activation des caspases est amorcée par la fixation de ligands spécifiques à leur récepteur de mort, présents à la surface cellulaire. Les récepteurs de mort font partie de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) qui compte une trentaine de membres (Ashkenazi, 2002). Le nom TNF souligne la connexion historique entre la superfamille du TNF et la thérapie du cancer. En effet, le TNF a été découvert comme étant un facteur présent dans le sérum qui était capable de tuer les cellules tumorales chez la souris (Carswell et al., 1975). La famille des récepteurs de mort du TNF, dont les membres sont des protéines transmembranaires, comprend notamment les protéines Fas (aussi appelée CD95 ou APO-1), TRAIL(TNF Related Apoptosis Inducing Ligand)R1 (ou DR4, APO-2), TRAILR2 (DR5) ou encore DR(Death Receptor)3 (APO-3) et TNFR1 (DR1) (Lavrik, Golks, & Krammer, 2005).

La fixation de FasL(Ligand) à son récepteur Fas, induit une transduction du signal apoptotique qui aboutit à l'activation des caspases puis à la mort cellulaire. Le chemin qui mène à cette activation comporte 3 étapes. Premièrement, la liaison de FasL à Fas, induit un changement de conformation du récepteur au niveau de sa partie cytoplasmique qui aboutit à la trimérisation de Fas et au rapprochement de leur domaine DD (Death Domain). Deuxièmement, cette trimérisation du recepteur, qui contribue à l'activer, permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with DD) via l'interaction de leur domaine DD respectif (Debatin & Krammer, 2004). Troisièmement, les caspases-8 et -10 sont à leur tour recrutées au niveau du récepteur par l'intermédiaire de leur interaction avec le domaine DED de FADD. Le complexe multi-protéique ainsi composé du récepteur Fas, des adaptateurs FADD et des caspases initiatrices 8 et 10 est appelé le DISC (Death Inducing Signaling Complex). C'est au sein de ce DISC que les caspase-8 et -10, concentrées localement, vont s'activer puis être libérée dans le cytoplasme où elles vont entraîner l'activation des caspases effectrices, notamment la caspase-3, responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Juo, Kuo, Yuan, & Blenis, 1998; Varfolomeev et al., 1998) (Figure 15).

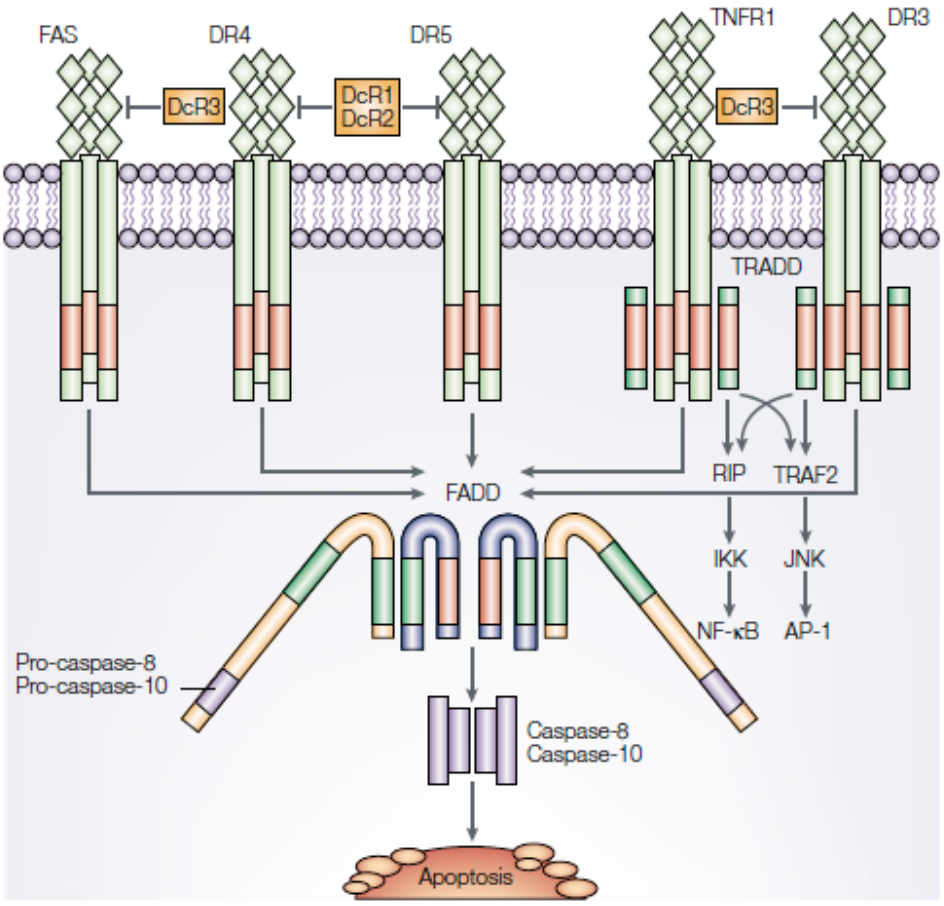


Figure 15 – Activation des caspase-8 et -10 par les récepteurs de mort
Tiré de (Ashkenazi, 2002)

Les récepteurs TNFR1 et DR3 font intervenir un deuxième adaptateur, TRADD (TNFR1-associated DD protein) qui est recruté au niveau du récepteur avant FADD et les caspases initiatrices (Philchenkov, 2004; Scaffidi et al., 1998; Wolf & Green, 1999) en fonction du contexte cellulaire (Micheau & Tschopp, 2003) (Figure 15).

Il est à noter que l'activation de la caspase-8 au niveau des récepteurs de mort peut être inhibée par la protéine cFLIP, qui est un homologue de la caspase-8 dépourvu d'activité catalytique, via une compétition entre la caspase-8 et FLIP vis-à-vis de l'interaction avec le récepteur activé (Krueger, Schmitz, Baumann, Krammer, & Kirchhoff, 2001).

La voie apoptotique extrinsèque se déroule sans l'intervention des organites cellulaires contrairement à la deuxième voie principale d'activation des caspases, la voie apoptotique intrinsèque, qui passe par la libération de facteurs apoptogènes par la mitochondrie.

2/ La voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale, la libération des criminels

La voie apoptotique mitochondriale diffère de la voie des récepteurs de mort. En effet, dans le cas de la voie apoptotique intrinsèque, le signal apoptotique amorçant le programme de mort ne vient pas de l'extérieur (lymphocyte T cytotoxique, par exemple) mais prend sa source au sein même de la cellule. Elle constitue ainsi typiquement une réponse à un stress non résolu. La voie apoptotique mitochondriale est activée par des rayonnements ionisants, une privation en facteurs de croissance, les drogues utilisées en chimiothérapie ou les infections virales par exemple (Boatright & Salvesen, 2003).

La voie apoptotique intrinsèque se rapproche cependant de la voie apoptotique extrinsèque dans son activation. En effet, l'activation de cette voie se fait aussi en 3 trois étapes. La première étape est la libération rapide et complète dans le cytoplasme du cytochrome c initialement présent au niveau de l'espace intermembraire de la mitochondrie (Kluck, 1997; Martinou, Desagher, & Antonsson, 2000; X. Wang, 2001; J. Yang et al., 1997), où il participe au transport d'électrons (Nicholls, 1974). La deuxième étape consiste en l'activation de la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) par le cytochrome c dans le cytosol (H. E. Kim, Du, Fang, & Wang, 2005; Zou, Henzel, Liu, Lutschg, & Wang, 1997). Cette activation s'accompagne d'un changement de conformation de APAF-1 lui permettant de s'oligomériser et de rendre accessible son domaine CARD (Acehan et al., 2002). Dans un troisième temps, la caspase-9 est recrutée par l'intermédiaire de son domaine CARD et

s'active au sein de ce complexe ternaire appelé apoptosome, avant de cliver les caspases effectrices (Riedl & Salvesen, 2007) (Figure 16).

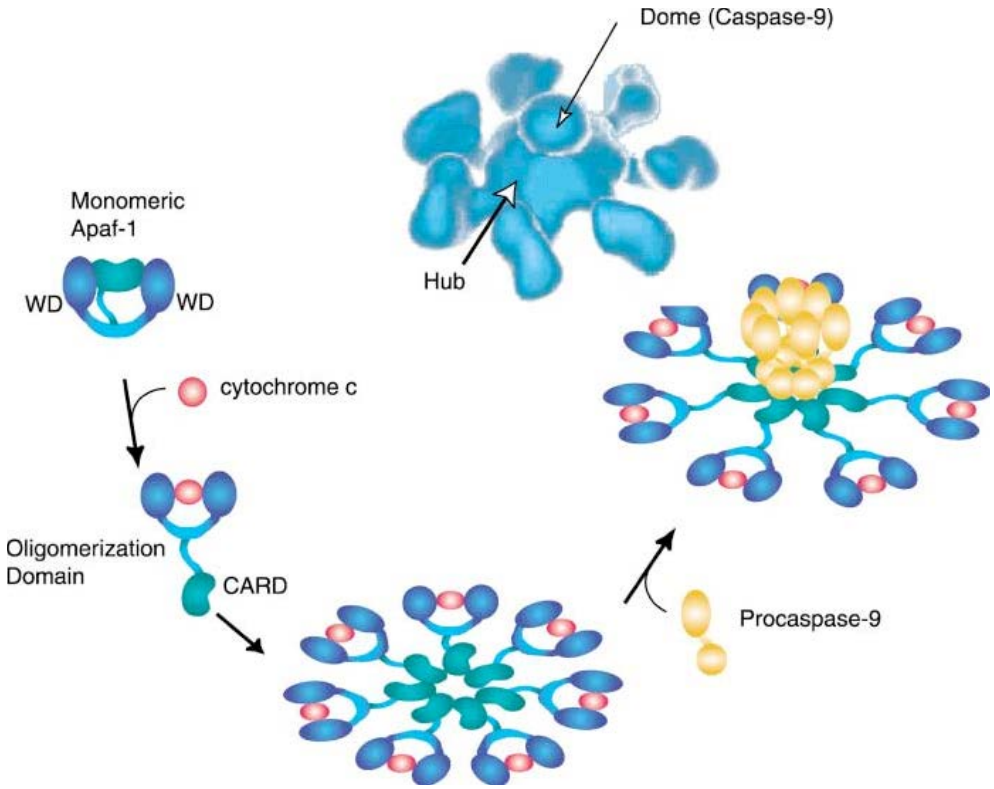


Figure 16 - L'apoptosome: une roue de la mort
Tiré de (D. R. Green & Evan, 2002)

Bien qu'il ait d'abord été démontré que l'activation de la caspase-9 était dépendante de son clivage (P. Li et al., 1997), il semble que celle-ci puisse être active au sein de l'apoptosome et induire l'apoptose sans être clivée (Stennicke et al., 1999).

La libération du cytochrome c, scellant le sort de la cellule, s'accompagne de celle d'autres protéines apoptogènes qui participent à d'autres niveaux à l'induction de l'apoptose. En effet, les protéines Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases) (C. Du, Fang, Li, Li, & Wang, 2000; Verhagen et al., 2000), Omi/HtrA2 (High Temperature Requirement A2) (Hegde et al., 2002; Y. Suzuki et al., 2001), AIF (Apoptosis-Inducing Factor) (Susin et al., 1999) et endonucléase G (L. Y. Li, Luo, & Wang, 2001) sont libérées de façon concomitante avec le cytochrome c. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont capables d'inhiber les IAP, et notamment XIAP, en se fixant à elles via une séquence AVP(I/S) au niveau de leur partie N-terminale. AIF, une fois libérée dans le cytosol, transloque au niveau du noyau où elle induit la condensation de la chromatine et la digestion de l'ADN en fragments de 50 kpb. Comme AIF, l'endonucléase G transloque au niveau du noyau où elle

contribue à fragmenter l'ADN. Ces protéines assistent le cytochrome c et les caspases dans l'induction de l'apoptose, si bien qu'il a été montré que dans certains cas, même en inhibant de façon efficace l'activation des caspases, on peut observer une mort des cellules avec un phénotype apoptotique (McCarthy, Whyte, Gilbert, & Evan, 1997; Xiang, Chao, & Korsmeyer, 1996).

Enfin, certaines protéines sont capables d'inhiber l'induction de l'apoptose en empêchant la formation de l'apoptosome. C'est le cas de la protéine HSP70 (Heat Shock Protein 70), qui inhibe la formation de l'apoptosome en s'associant à la protéine Apaf-1 au niveau de son domaine CARD. Cette interaction empêche l'oligomérisation de Apaf-1 et le recrutement de la caspase-9 (Arya, Mallik, & Lakhotia, 2007; Saleh, Srinivasula, Balkir, Robbins, & Alnemri, 2000).

Bien que toutes deux aboutissent à l'activation de la caspase-3 effectrice, les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque sont donc régulées de façon très différente. Cependant, elles n'opèrent pas de manière mutuellement exclusive. Ainsi, l'activation de la voie apoptique extrinsèque peut conduire à celle de la voie apoptotique intrinsèque.

3/ Le couplage entre les deux voies, l'occasion fait le larron

Dans la voie apoptotique extrinsèque, la caspase-8, une fois activée, peut entraîner l'apoptose en activant à son tour la caspase-3. Cependant, l'activation de la caspase-8 peut aussi conduire au clivage et à l'activation de la protéine pro-apoptotique cytoplasmique Bid, générant un fragment C-terminal capable de transloquer au niveau de la mitochondrie et d'induire la voie apoptotique intrinsèque (H. Li, Zhu, Xu, & Yuan, 1998; Luo, Budihardjo, Zou, Slaughter, & Wang, 1998) (Figure 17). Ceci constitue une amplification du signal apoptotique et permet d'éteindre la fonction mitochondriale.

Les cellules, exprimant le récepteur de mort Fas, forment 2 groupes distincts. Certaines cellules, comme les lymphocytes, sont dites de type I alors que d'autres, comme les hépatocytes par exemple, sont dites de type II. Bien que les cellules de types I et II soient aussi sensibles l'une que l'autre à l'activation du récepteur Fas, les voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire sont différentes. En effet, cette classification est basée sur la nécessité ou non d'une boucle d'amplification mitochondriale de l'apoptose. Dans les cellules de type I, la caspase-8 est activée au sein du complexe DISC puis active directement

les caspases-3 et -7 pour induire les altérations caractéristiques de l'apoptose. Dans ces cellules, l'apoptose ne peut pas être inhibée par la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, régulant négativement la voie apoptotique intrinsèque (Strasser, Harris, Huang, Krammer, & Cory, 1995).

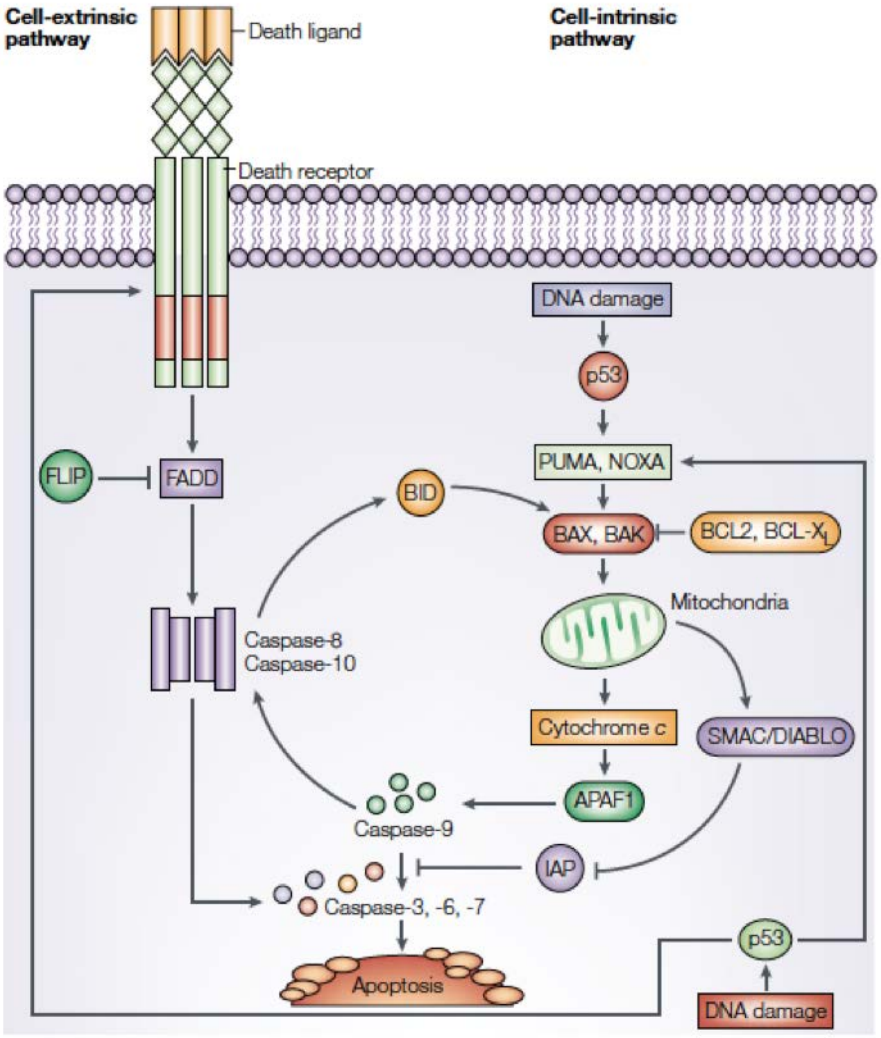


Figure 17 - Diaphonie entre les voies de signalisation apoptotiques
Tiré de (Ashkenazi, 2002)

Dans les cellules de type II, l'activation des caspases effectrices par la caspase-8 se fait de manière indirecte, par une amplification mitochondriale du signal apoptotique. Ainsi, dans ces cellules, il est nécessaire que la caspase-8 clive et active la protéine Bid pour entraîner l'apoptose via la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 (Yin et al., 1999). L'apoptose induite par Fas peut ainsi dans ce cas être inhibée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Scaffidi et al., 1998). Récemment, il a été montré que la

régulation de l'expression de XIAP joue un rôle important dans la détermination d'une réponse de type I ou II par la cellule (Jost et al., 2009; Kaufmann, Strasser, & Jost, 2012).
De manière assez surprenante, il a aussi été montré que dans certains cas, un signal intrinsèque pouvait nécessiter l'activation de la voie apoptotique extrinsèque pour conduire à la mort de la cellule (Burns, Bernhard, & El-Deiry, 2001; Finnberg et al., 2005; Henry, Andrysik, Paris, Galbraith, & Espinosa, 2012; Kuribayashi, Finnberg, Jeffers, Zambetti, & El-Deiry, 2011). Ainsi, les travaux de l'équipe d'Espinosa suggèrent que l'induction de l'apoptose au lieu d'un arrêt du cycle cellulaire suite à l'activation de p53 dépend de l'activation de la voie de signalisation impliquant le récepteur DR4 et le clivage de Bid par la caspase-8.

La protéine Bid dont le clivage est déterminant dans la transduction du signal apoptotique initié par Fas dans les cellules de type II, fait partie d'une famille directement responsable de la régulation de la voie apoptotique mitochondriale, la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2).

III. LA FAMILLE BCL-2, GARANTE DE L'INTEGRITE DE LA MEMBRANE EXTERNE MITOCHONDRIALE

Un des moments clés dans l'engagement de la voie apoptotique mitochondriale correspond à la libération du cytochrome c ainsi que d'autres facteurs apoptogènes tels que les inhibiteurs d'IAP, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 dans le cytosol, permettant l'assemblage du complexe au sein duquel la caspase-9 va être activée, l'apoptosome. La libération du cytochrome c fait suite à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie qui est sous le contrôle d'une famille de protéines particulière, garante de l'intégrité de la membrane mitochondriale, la famille Bcl-2 (M. X. Li & Dewson, 2015; Martinou & Youle, 2011; Scorrano & Korsmeyer, 2003).
Cette famille, qui comprend presque 20 membres chez les mammifères, est composée de deux grands groupes de protéines dont les fonctions sont opposées (Youle & Strasser, 2008). En effet, dans les cellules vivantes, les protéines pro-apoptotiques, concourant à l'induction de la mort cellulaire, sont tenues en échec via des interactions protéine-protéine par les protéines anti-apoptotiques de la famille, garantissant ainsi la fonction mitochondriale.

A - Les protéines anti-apoptotiques, gardiennes du temple

Quelques années après la description des caractéristiques morphologiques de l'apoptose par Kerr et al dans un article devenu un classique (Kerr et al., 1972), une protéine qui s'avèrera être une protéine anti-apoptotique est découverte en 1984, la protéine Bcl-2. Elle donnera naissance à une famille de protéines qui porte son nom et qui est impliquée dans le contrôle de la libération du cytochrome c.

1/ Bcl-2, mère fondatrice des Etats-Unis de la mitochondrie

L'implication de la mitochondrie dans l'apoptose a été suggérée pour la première fois par des travaux montrant une activation de caspases contenues dans des extraits d'oocytes de Xenopus incubés avec des mitochondries purifiées (Newmeyer, Farschon, & Reed, 1994). Cette activité pouvait être bloquée par l'addition de Bcl-2, suggérant que cette dernière était capable de prévenir l'engagement de l'apoptose mitochondriale et se situait donc en amont de la mitochondrie chez les vertébrés.

Bcl-2 est donc une protéine ayant une fonction anti-apoptotique et dont l'homologue chez C. elegans est la protéine ced-9 (Hengartner & Horvitz, 1994). Le gène Bcl-2 a été découvert dans des lymphomes folliculaires B humains par l'équipe de CM Croce en 1984 (Tsujimoto et al., 1984). L'année suivante, la même équipe a montré qu'une translocation t(14 ; 18) met le gène Bcl-2 sous le contrôle du promoteur et de l'« enhancer » du gène codant les chaînes lourdes des immunoglobulines sur le chromosome 14 (Tsujimoto, Gorham, Cossman, Jaffe, & Croce, 1985; Tsujimoto, Jaffe, et al., 1985). De cette translocation résulte une surexpression de la protéine Bcl-2 qui est à l'origine du développement du lymphome B (Tsujimoto, Cossman, Jaffe, & Croce, 1985). Plus tard, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 prévient l'induction de l'apoptose dans les cellules hématopoïétiques (Vaux et al., 1988) et entraîne l'accumulation des lymphocytes chez la souris (McDonnell et al., 1989; Strasser, Harris, & Cory, 1991; Strasser, Whittingham, et al., 1991), identifiant ainsi le premier gène de mammifère impliqué dans le contrôle de la MCP et l'oncogénèse B. Ainsi, Bcl-2 est capable de bloquer la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Antonsson et al., 1997), mais elle a aussi été décrite comme étant capable de bloquer l'induction de l'apoptose en aval de la mitochondrie (J. Yang et al., 1997). En effet, Bcl-2 peut se lier à

Apaf-1 (Zou et al., 1997) et bloquer la cascade d'activation des caspases en empêchant la formation de l'apoptosome (Cosulich, Savory, & Clarke, 1999).

Le rôle de Bcl-2 ne se cantonne pas seulement à l'inhibition de l'apoptose. En effet, il a été montré que la protéine Bcl-2 était impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, indépendamment de sa fonction anti-apoptotique. Il a tout d'abord été montré que la surexpression de Bcl-2 était corrélée à une augmentation du nombre de cellules en phase G0 ou arrêtées en phase G1 suite à une privation en facteurs de croissance (Marvel, Perkins, Lopez Rivas, & Collins, 1994; Vaux et al., 1988). Plus tard, d'autres études portant sur des lymphocytes B et T ont établi que Bcl-2 avait une fonction anti-prolifération (Mazel, Burtrum, & Petrie, 1996; O'Reilly, Harris, & Strasser, 1997). Un domaine de Bcl-2 est d'ailleurs dédié à cette fonction. Ainsi, la délétion d'une partie de ce domaine riche en sérines et thréonines, correspondant à la boucle située entre les domaines BH3 et BH4, préserve la fonction anti-apoptotique de la protéine Bcl-2 mais abolit complètement sa fonction dans le cycle cellulaire (Uhlmann et al., 1996). Ces résultats montrent que les fonctions anti-apoptotique et anti-prolifération de Bcl-2 sont découplées. La fonction anti-prolifération de Bcl-2 est contrôlée par sa phosphorylation au niveau de plusieurs de ses sérines et thréonines voire tyrosines (X. Deng, Gao, & May, 2003; Janumyan et al., 2008; Linette, Li, Roth, & Korsmeyer, 1996). De plus, Bcl-2 pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de la mitose en formant un complexe avec les protéines CDC2 et PP1 (Barboule, Truchet, & Valette, 2005).

Après Bcl-2, d'autres membres de la famille ont été identifiés. Ils partagent tous entre 1 et 4 motifs conservés d'une longueur de 10 à 20 acides aminés, appelés BH (Bcl-2 Homology) et numérotés dans l'ordre de leur découverte (Figure 18).

Le domaine BH3 est partagé par tous les membres de la famille et est nécessaire à leur interaction, régulant la décision cellulaire d'entrer ou non en apoptose (Zha et al., 1997) (voir plus loin).

Le domaine BH4, bien que non impliqué directement dans les interactions au sein de la famille, semble être important pour la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-XL (B cell lymphoma X Long) (Boise et al., 1993), un autre membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Ainsi, la délétion de ce domaine rend ces protéines inactives tout en préservant leurs interactions avec les membres pro-apoptotiques (D. C. Huang, Adams, & Cory, 1998). Ce qui a l'apparence d'un paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction d'une protéine pro-apoptotique avec une protéine anti-apoptotique, s'accompagne de changements de

conformation au sein des deux protéines (Hinds et al., 2007; X. Liu, Beugelsdijk, & Chen, 2015). Il a ainsi été montré que la fixation de PUMA, une protéine pro-apoptotique, à Bcl-XL, entraînait un dépliement partiel de ce dernier, permettant de lever l'inhibition porté par celui-ci sur p53, en rompant leur interaction faisant intervenir le domaine N-terminal de p53 (Xu, Tai, Ye, Kang, & Yoon, 2006) et les hélices α1 (BH4) et α2 (BH3) de Bcl-XL, libérant ainsi ce dernier et contribuant à l'induction de l'apoptose (Follis et al., 2013). On peut donc supposé que dans le cas de l'induction de l'apoptose via un stress génotoxique comme l'irradiation, la fixation de PUMA à Bcl-XL, dépourvu de son domaine BH4, ne permet pas ce changement de conformation optimal au niveau de Bcl-XL et empêche la libération de p53 et ses conséquences potentiellement mortelles pour la cellule.

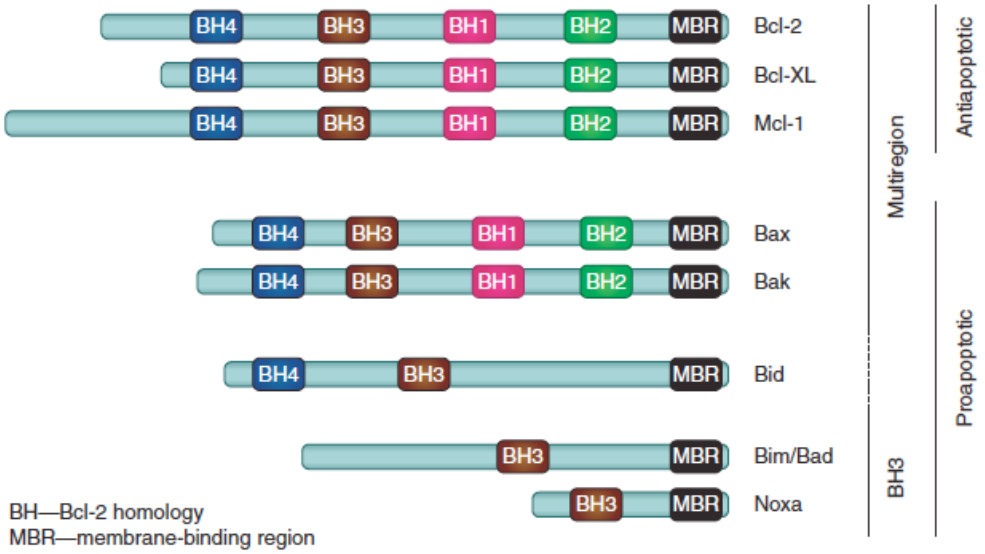


Figure 18 - Structure des membres de la famille Bcl-2
Tiré de (Shamas-Din, Kale, Leber, & Andrews, 2013)

Ce domaine BH4 est présent dans toutes les protéines anti-apoptotiques, dont les principales, Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1). Parmi ces protéines, Mcl-1 à des caractéristiques particulières.

2/ Mcl-1, noria jusqu'à la mort

Mcl-1 ou Bcl-2L3 (Bcl-2 Like 3) illustre le fait que la contribution d'une protéine au destin cellulaire n'est pas immuable mais peut être modifiée par différents mécanismes. La partie N-terminale de Mcl-1 est unique au sein de la famille Bcl-2. Elle est riche en résidus et motifs

impliqués dans la régulation de son activité et son expression, et portant des sites d'ubiquitination (voir dernière partie de l'introduction), de clivage et de phosphorylation.

Cette protéine est essentielle au développement embryonnaire précoce et à la survie de plusieurs types de cellules chez l'adulte (Perciavalle & Opferman, 2013). L'analyse de différents KO conditionnels de Mcl-1 chez la souris a permis de montrer que plusieurs types cellulaires dépendent de Mcl-1 pour leur survie, dont les cellules du système hématopoïétique (Moulding et al., 2000), les neurones (Arbour et al., 2008; Malone et al., 2012), les hépatocytes (Vick et al., 2009) et les cardiomyocytes (X. Wang et al., 2013). Mcl-1 est ainsi indispensable au développement et au maintient des lymphocytes B et T (Opferman et al., 2003). De plus, Mcl-1 est également impliquée dans la différenciation des cellules lymphoïdes. En effet, elle est exprimée faiblement dans les lymphocytes B naïfs et les lymphocytes B mémoires mais fortement dans les cellules B maturant leur affinité au sein du centre germinatif (Krajewski et al., 1995). Enfin, en plus de sa fonction anti-apoptotique, Mcl-1, tout comme Bcl-2, semble jouer un rôle dans la progression du cycle cellulaire via des interactions avec les protéines Chk1 (Chekpoint protein 1), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1). En effet, Mcl-1sn, une forme tronquée de Mcl-1, dépourvue de son domaine transmembranaire et localisée au niveau du noyau, est associée à la phophorylation de Chk1 lors d'un stress génotoxique activant la voie de réparation par ATR (AT mutated and Rad3 related) (Jamil, Mojtabavi, Hojabrpour, Cheah, & Duronio, 2008). La fixation de PCNA et cdk1 par Mcl-1sn contribue à inhiber leur fonction en les séquestrant, suspendant ainsi la progression dans le cycle (Fujise, Zhang, Liu, & Yeh, 2000; Jamil et al., 2005).

Dans des conditions basales, Mcl-1 est exprimée au niveau de plusieurs membranes cellulaire, dont celle de la mitochondire (Akgul, Moulding, White, & Edwards, 2000; T. Yang, Kozopas, & Craig, 1995) et l'enveloppe nucléaire (Leuenroth, Grutkoski, Ayala, & Simms, 2000) notamment. De plus, une forme tronquée de Mcl-1 est importée au niveau de la matrice de la mitochondrie, où elle participe à la maintenance de sa morphologie normale et à la production d'énergie (Perciavalle et al., 2012).

Mcl-1 a initialement été identifié comme un gène exprimé de façon précoce durant la différentiation induite par la PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) dans une lignée cellulaire issue d'une leucémie myéloïde, ML-1 (Kozopas, Yang, Buchan, Zhou, & Craig, 1993). Son expression peut aussi être stimulée par de nombreux facteurs de croissance et cytokines, comme l'IL-3 (InterLeukin-3), l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, le GM-CSF (Granulocyte-

Macrophage Colony Stimulating Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), … (Altmeyer et al., 1997; Chao et al., 1998; H. M. Huang, Huang, & Yen, 2000; Jourdan, De Vos, Mechti, & Klein, 2000; Leu, Chang, & Hu, 2000; Opferman et al., 2003; T. Yang, Buchan, Townsend, & Craig, 1996). Toutes ces cytokines régulent positivement l'expression de Mcl-1 au niveau transcriptionnel. Cependant, d'autres cytokines, telles que l'IL-15, stimulent une augmentation de l'expression de Mcl-1 de manière indépendante de sa transciption (Shenoy, Kirschnek, & Hacker, 2014). En effet, le niveau d'expression de Mcl-1 peut aussi être contrôlé au niveau post-traductionnel.

Mcl-1 diffère des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par sa taille (environ 1,5 fois plus longue que les autres) et la présence d'une large région N-terminale non homologue qui comporte des motifs régulateurs contrôlant sa fonction.

Mcl-1 est une protéine labile dont la demi-vie est courte, entre 30 min et plusieurs heures selon le type cellulaire (H. Liu, Peng, Cheng, Yuan, & Yang-Yen, 2005; Nijhawan et al., 2003; T. Yang et al., 1995). La régulation de l'expression et de la fonction de Mcl-1 réside en partie dans l'état de phosphorylation de sa région N-terminale. En effet, cette région contient des sites de phosphorylation présents dans des motifs PEST riches en proline, glutamate, sérine et thréonine qui sont caractéristiques des protéines à courte demi-vie. En fonction du ou des résidus phosphorylé(s), l'effet sur la fonction ou l'expression de Mcl-1 diffère. Certaines phosphorylations vont contribuer à stabiliser la protéine, d'autres à la déstabiliser ou à moduler son affinité avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Figure 19).

Le taux de renouvellement important de Mcl-1 associé aux différents niveaux existant dans sa régulation, permet de régler très finement la réponse à un stress. En cas d'activation, une augmentation significative de l'expression de Mcl-1 sera observée alors qu'en cas de signal apoptotique, comme une privation en facteur de croissance, son expression diminuera de façon importante, conduisant à la mort cellulaire. Il est à noter qu'un phénomène d'amplification du signal apoptotique existe. Il passe, comme pour Bcl-2 et Bcl-XL (Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998), par le clivage et l'inactivation de la protéine Mcl-1 par la caspase-3 activée (Clohessy, Zhuang, & Brady, 2004; Weng, Li, Xu, Shi, & Tang, 2005), suivant les aspartates 127 et 157 du domaine PEST chez l'homme, mettant ainsi un terme à l'activité anti-apoptotique de cette protéine et à sa noria au niveau de la mitochondrie (Herrant et al., 2004).

Le fragment C-ter obtenu suite au clivage de Mcl-1 au niveau de l'aspartate 127 a une fonction pro-apoptotique. Les caspases constituent donc une épée à double tranchant privant

les cellules d'une protéine importante pour leur survie et dans le même temps, générant un « tueur » efficace (Michels, Johnson, & Packham, 2005; Weng et al., 2005).

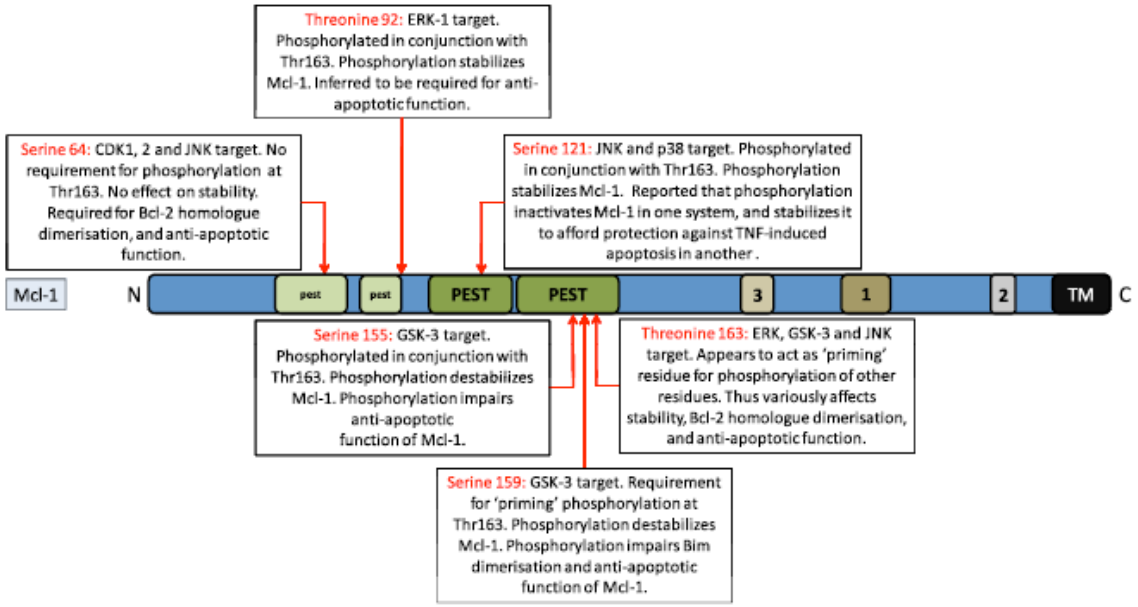


Figure 19 - Régulation de la fonction et de l'expression de Mcl-1
Tiré de Thomas LW, Lam C, Edwards SW, FEBS Letters 2010

Le groupe des anti-apoptotiques, outre les protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-XL, comprend aussi les protéines Bcl-w (Gibson et al., 1996) et Bfl-1/A1 (Lin, Orlofsky, Berger, & Prystowsky, 1993). Les études génétiques chez la souris suggèrent que la survie de chaque type cellulaire dépend de leur protection par au moins un homologue de Bcl-2 (Ranger, Malynn, & Korsmeyer, 2001). Ainsi, par exemple, Bcl-2 est essentiel pour la survie des cellules souches rénales et mélanocytaires ainsi que la survie des cellules lymphoïdes matures (Kamada et al., 1995; Nakayama et al., 1994; Nakayama et al., 1993; Veis, Sorenson, Shutter, & Korsmeyer, 1993) et Mcl-1 pour l'implantation du zygote (Rinkenberger, Horning, Klocke, Roth, & Korsmeyer, 2000). Ces protéines ne partagent pas seulement les domaines BH(1-4) mais également une structure globulaire creusée d'un sillon hydrophobe formé par les domaines BH1-3 (Figure 20).

C'est par l'intermédiaire de ce sillon que le protéines anti-apoptotiques peuvent interagir et inhiber la fonction des protéines pro-apoptotiques (le phénotype des souris déficiente pour ces protéines est parfaitement résumé par Sochalska M et al (Sochalska, Tuzlak, Egle, & Villunger, 2015). Ainsi, une surexpression de ces protéines protège les cellules en culture contre de nombreux stimuli apoptotiques (Danial & Korsmeyer, 2004; Strasser, O'Connor, & Dixit, 2000; X. Wang, 2001) et une interaction directe entre Mcl-1 et Bak, une protéine pro-

apoptotique à multi-domaines BH à été mise en évidence (Willis et al., 2005; Zhai, Jin, Huang, Satterthwait, & Reed, 2008).

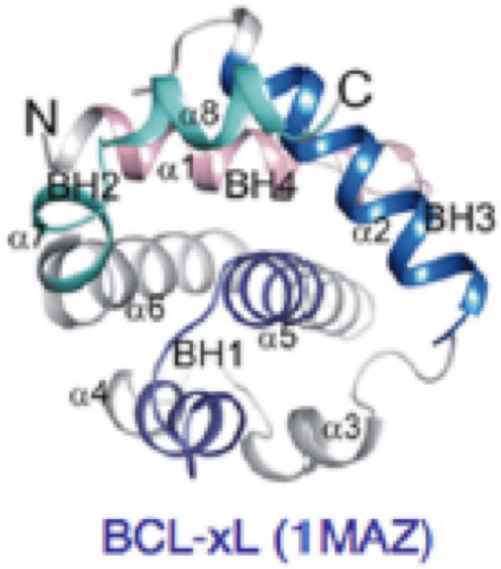


Figure 20 - Structure de la protéine Bcl-XL
Tiré de Chipuk JE et al, Mol Cell 2010

B - Les protéines pro-apoptotiques, des aiguilles dans un ballon de baudruche

Le rôle principal des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est de maintenir l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie. Pour mener à bien cette tâche, elles doivent être en mesure d'inhiber les protéines pro-apoptotiques, contribuant à perforer cette membrane et permettant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Oltvai, Milliman, & Korsmeyer, 1993). Les protéines pro-apoptotiques sont subdivisées en 2 groupes, les pro-apoptotiques effecteurs à multi-domaines BH Bax et Bak, directement responsables de la formation des pores dans la membrane (Goping et al., 1998; Gross, Jockel, Wei, & Korsmeyer, 1998) et les pro-apoptotiques BH3-only qui assurent leur activation suite à un signal de mort (Shamas-Din, Brahmbhatt, Leber, & Andrews, 2011).

1/ Les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH Bax et Bak, deux êtres vous manquent et tout est dépeuplé

Le sous-groupe des protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH contient principalement les protéines Bax (Oltvai, Milliman, & Korsmeyer, 1993), Bak (Chittenden et al., 1995) et

Bok (S. Y. Hsu, Kaipia, McGee, Lomeli, & Hsueh, 1997). Ces protéines sont très similaires à Bcl-2 en terme de séquence et de structure, leurs 3 motifs conservés, BH1-3 forment aussi un sillon hydrophobe (Moldoveanu et al., 2006; M. Suzuki, Youle, & Tjandra, 2000). Elles jouent un rôle critique dans l'induction de l'apoptose (Jurgensmeier et al., 1998). Alors que l'inactivation de Bax ou Bak a peu de conséquences chez la souris, vraisemblablement à cause d'une redondance fonctionnelle, l'élimination de ces 2 gènes altère de façon dramatique l'induction de l'apoptose dans de nombreux tissus, donnant généralement lieu à une mort périnatale (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). L'abolition de l'expression des 2 protéines Bax et Bak, comme l'abolition de Bim (Bouillet et al., 1999; Bouillet et al., 2002), perturbe aussi la sélection thymique et l'homéostasie du système lymphoïde (Rathmell, Lindsten, Zong, Cinalli, & Thompson, 2002).

En réponse à un signal cytotoxique, Bax, sous forme monomérique dans le cytosol, et Bak, mitochondrial, sont capables de s'oligomériser et de former des pores dans la membrane mitochondriale, via un changement de conformation (Antonsson, Montessuit, Sanchez, & Martinou, 2001; Griffiths et al., 2001; Griffiths et al., 1999; Y. T. Hsu & Youle, 1998; Nechushtan, Smith, Lamensdorf, Yoon, & Youle, 2001). Le domaine BH3 est nécessaire et suffisant pour l'activité de Bax (Simonen, Keller, & Heim, 1997; K. Wang, Gross, Waksman, & Korsmeyer, 1998). Comme pour Bax, le domaine BH3 de Bak intervient dans sa liaison avec Bcl-xL et Mcl-1 (Sattler et al., 1997). Cependant, il a été montré que les BH3-only peuvent se fixer au niveau d'un site situé à l'opposé du sillon hydrophobe de Bax et ainsi induire son activation (Gavathiotis et al., 2008), suggérant que la poche hydrophobe n'est pas la seule région régulatrice de la fonction pro-apoptotique de Bax. De plus, les fonctions de Bax et Bak pourraient ne pas être totalement équivalente (Cartron et al., 2003; Kepp, Rajalingam, Kimmig, & Rudel, 2007; Rotolo et al., 2008). Kepp O et al, ont ainsi montré que les 2 protéines Bax et Bak étaient nécessaires pour induire une apoptose optimale suite à des dommages à l'ADN engendrés par le cisplatine.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la libération du cytochrome c induite par Bax et Bak (Figure 21).

Il a d'abord été proposé que Bax prendrait part à l'assemblage d'un complexe protéique appelé PTP (Permeability Transition Pore), créant une ouverture à travers les deux membranes mitochondriales, causant elle-même la rupture de la membrane externe à cause du gonflement de la matrice mitochondriale (Schwarz, Andrade-Navarro, & Gross, 2007). L'ouverture du pore serait alors gouvernée par la fixation de Bax activé à VDAC1 (Voltage-

Dependent Anion Channel1) (Shimizu, Narita, & Tsujimoto, 1999). Cependant, les 3 membres du PTP, VDAC1, ANT (Adenin Nucleotide Translocase) et cyclophiline D (Brenner & Grimm, 2006), ne sont pas indispensables à la perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par Bax, reléguant la formation de ce complexe à un rôle accessoire (Baines, Kaiser, Sheiko, Craigen, & Molkentin, 2007; Tsujimoto & Shimizu, 2007). Une autre option, est que Bax et Bak forment de façon directe des pores dans la membrane externe de la mitochondrie (Dewson & Kluck, 2009). De plus, des études électro-physiologiques utilisant la technique du patch-clamp, ont identifié un pore appelé MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) contenant un homo-oligomère de Bax ou Bak (Dejean et al., 2005; Pavlov et al., 2001). Enfin, la libération du cytochrome c pourrait se faire via la formation de pores protéolipidiques (Garcia-Saez, Chiantia, Salgado, & Schwille, 2007).

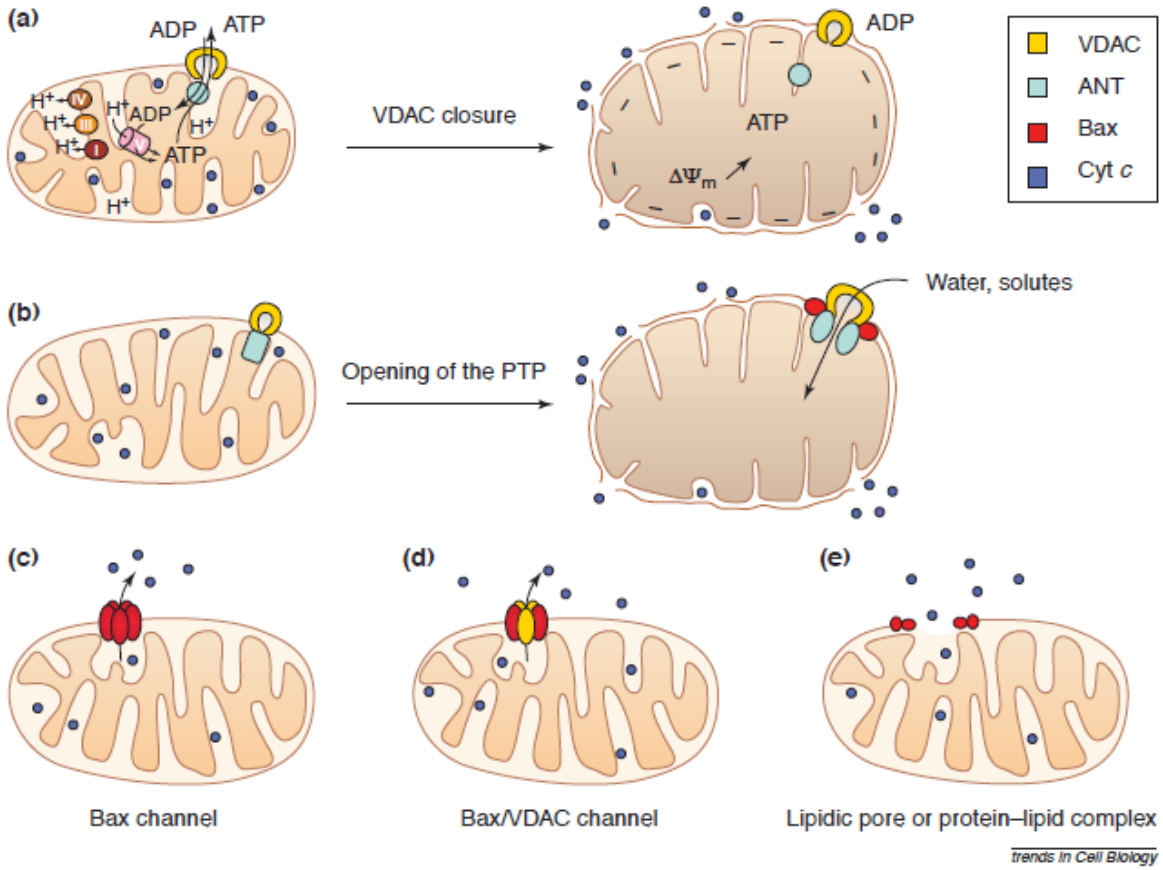


Figure 21 - Les différents modèles permettant la libération du cytochrome c
Tiré de (Desagher & Martinou, 2000)

Une dernière hypothèse a été proposée par l'équipe de Youle RJ (Frank et al., 2001). Dans les cellules, des événements de fusion et de fission participent à la régulation de la morphologie et de la division mitochondriale. Au cours de la mort cellulaire programmée, l'observation

d'une désintégration des mitochondries en multiples organelles ponctiformes (Desagher & Martinou, 2000) a conduit l'équipe de Youle RJ à étudier le rôle de la protéine Drp-1 (Dynamin-related protein-1), une protéine qui participe à la fission de la membrane mitochondriale externe (Labrousse, Zappaterra, Rube, & van der Bliek, 1999), dans l'apoptose. Elle a montré que l'inhibition de Drp-1 inhibe la formation d'organelles ponctiformes, la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire et la libération du cytochrome c, bloquant ainsi l'apoptose. La fission mitochondriale semble donc être un acteur important dans la libération du cytochrome c et l'induction de l'apoptose.
Pour conclure, la libération du cytochrome c par Bax et Bak fait vraisemblablement intervenir l'un ou une combinaison des ces modèles, selon le type cellulaire étudié et l'inducteur de mort utilisé.

La fonction des pro-apoptotiques à multi-domaines Bax et Bak est régulée par les protéines anti-apoptotiques qui sont capables d'inhiber leur oligomérisation en les séquestrant (Fletcher et al., 2008). Cependant, cette inhibition peut être levée par les pro-apoptotiques BH3-only qui sont des senseurs de stress et qui comme leur nom l'indique, ne portent que le domaine BH3.

2/ Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique ou *BH3-only*, quand plus égal moins

Suite à un stress, les protéines de la famille Bcl-2 se rassemble au niveau des membranes intracellulaire et jugent du sort de la cellule, mort ou survie, en fonction du contexte cellulaire global.
Les BH3-only, qui forment le dernier sous-groupe de la famille Bcl-2, jouent un rôle primordial dans cette décision. Ils sont une dizaine chez l'Homme, dont Bim (O'Connor et al., 1998), Bid (K. Wang, Yin, Chao, Milliman, & Korsmeyer, 1996), PUMA (Nakano & Vousden, 2001), Noxa (Oda, 2000), Bmf (Puthalakath et al., 2001) et Bad (E. Yang et al., 1995), et ont des séquences très éloignées entre eux et avec Bcl-2, à l'exception de leur domaine BH3, nécessaire à leur activité pro-apoptotique (Adams & Cory, 1998).
Ces protéines BH3-only, très variées (D. C. Huang & Strasser, 2000; Puthalakath & Strasser, 2002), sont incapables d'induire la mort cellulaire en l'absence des pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak (Cheng et al., 2001; Zong, Lindsten, Ross, MacGregor, & Thompson,

2001). Elles agissent en amont de leur activation, se comportant comme des senseurs des dommages intracellulaires. En effet, les protéines BH3-only, dont l'expression varie en fonction du type cellulaire, semblent surveiller l'apparition de stress ou de dommages dans des compartiments subcellulaires particuliers et répondre à un lot de signaux cytotoxiques spécifiques (Figure 22). Ainsi, Bim est nécessaire pour la délétion des clones auto-réactifs *in vivo* (Bouillet et al., 2002; Hildeman et al., 2002) et l'apoptose des lymphocytes T *in vitro* suite à une privation en cytokine ou à un traitement au Taxol (paclitaxel) mais moins clairement suite à une irradiation γ (Bouillet et al., 1999). Bad est requis pour la mort cellulaire induite par une privation en glucose (Danial et al., 2003). Bmf pourrait être nécessaire à l'anoïkis, l'apoptose des cellules épithéliales après leur décollement de la matrice extracellulaire (Puthalakath et al., 2001) et pourrait ainsi contribuer à limiter les métastases. Aussi en lien avec le développement tumoral, Noxa et PUMA sont tous les 2 induits par le suppresseur de tumeur p53 (Nakano & Vousden, 2001). Il a été montré que ces protéines jouent un rôle critique dans l'induction de l'apoptose suite à un stress génotoxique et en outre, la mort induite par plusieurs drogues pour PUMA (Villunger et al., 2003).

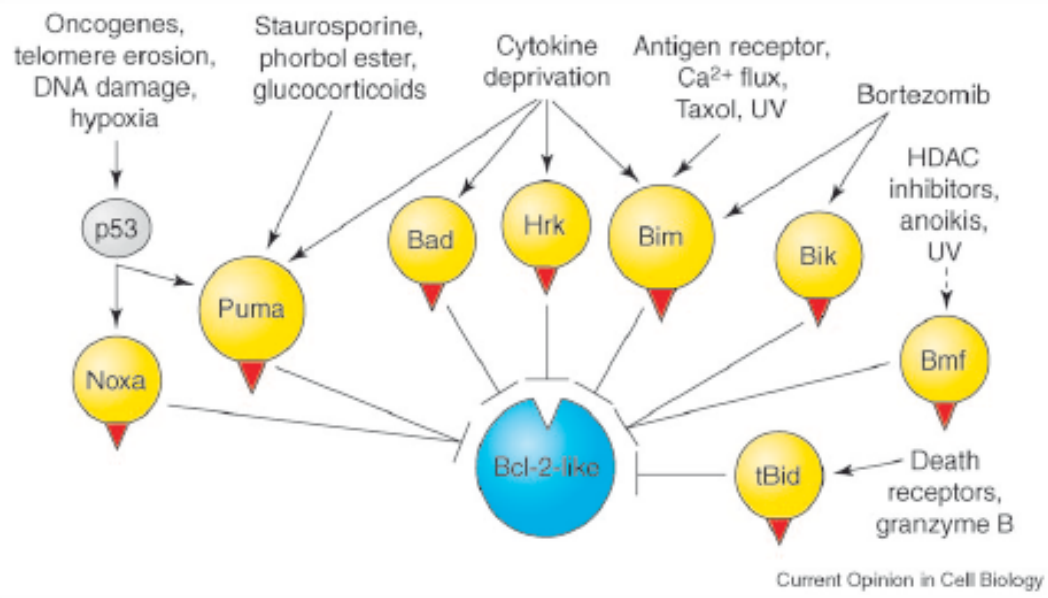


Figure 22 - Les BH3-only sont activés par une grande variété de stress cellulaires
Tiré de (Willis & Adams, 2005)

Il existe 2 grands modèles de régulation des BH3-only. Soit elles sont exprimées faiblement par la cellule et sont induites suite à un stress, dépendant ainsi de facteurs de transcription spécifiques, comme PUMA et Noxa par exemple, soit elles sont synthétisées constitutivement et sont maintenues dans un état inactif jusqu'à la survenue d'un signal apoptotique. Par exemple, Bad est séquestrée dans le cytosol par la protéine chaperonne 14-3-3 suite à sa

phosphorylation par des kinases telles que Akt/PKB et la PKA (Protéine Kinase A) (Danial, 2008). Son activation nécessite ainsi sa déphosphorylation par la calcineurine par exemple (H. G. Wang et al., 1999). Au contraire, l'activation de Bik/Nbk demande sa phosphorylation par la caséine kinase II (Verma, Zhao, & Chinnadurai, 2001). La protéine Bid est clivée par les caspases et régulée par sa phosphorylation (Desagher et al., 2001) pour exposer son domaine BH3 initialement enfoui (H. Li et al., 1998; Luo et al., 1998) et induire la libération du cytochrome c mitochondrial. Sa fonction pro-apoptotique peut être inhibée par les protéines Mcl-1 et A1, notamment (Clohessy, Zhuang, de Boer, Gil-Gomez, & Brady, 2006; Werner, de Vries, Tait, Bontjer, & Borst, 2002).

L'expression de Bim est régulée à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau post-traductionnel. Ainsi, dans les cellules hématopoïétiques privées de cytokines, l'augmentation de l'expression de Bim est entraînée par le facteur de transcription FKHR-L1 (Dijkers, Medema, Lammers, Koenderman, & Coffer, 2000; Shinjyo et al., 2001), qui est inactif en condition « normale » à cause de sa phosphorylation par Akt/PKB (Dijkers et al., 2002). D'autres facteurs de transcription ont été impliqués dans la stimulation de l'expression de Bim comme FoxO3a (Essafi et al., 2005) et CHOP (Ghosh, Klocke, Ballestas, & Roth, 2012). Dans les cellules neuronales, l'induction de Bim, suivant une privation en neurotrophines, requière l'activation de JNK (Whitfield, Neame, Paquet, Bernard, & Ham, 2001). Au niveau post-traductionnel, des travaux de notre équipe ainsi que ceux de l'équipe d'Auberger ont montré que Bim peut être éliminé suite à sa phosphorylation par Erk1/2 qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Luciano et al., 2003; Mouhamad et al., 2004).

Pour la plupart des protéines BH3-only, leur fixation optimale à leurs partenaires anti-apoptotiques ne nécessite pas seulement leur domaine BH3 mais aussi leur adressage à la mitochondrie, dépendant de leur domaine C-terminal hydrophobe (revoir structure, Figure 18). En assurant la co-localisation des deux groupes antagonistes anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce domaine C-terminal contribue à leur interaction. Pour Bim par exemple, ce domaine est indispensable à son adressage mitochondrial, tout comme à son activité pro-apoptotique (Yamaguchi & Wang, 2002). De plus, des travaux récents ont montré que les BH3-only Bim, tBid, PUMA, Noxa, Bmf et Bad, pouvaient être ancrés à la membrane (Wilfling et al., 2012). Des modifications post-traductionnelles peuvent aussi intervenir dans l'adressage des BH3-only à la membrane mitochondriale. Ainsi, la translocation mitochondriale de Bid est facilitée après son clivage par une myristoylation en N-terminal de

p15 (tBid) (Zha, 2000) et son interaction avec la cardiolipine présente au niveau de la membrane mitochondriale (Lutter et al., 2000).
Bid à un caractère particulier parmi les protéines BH3-only. En effet, bien que Bid soit capable de se fixer aux anti-apoptotiques et aux pro-apoptotiques effecteurs *in vitro*, des études génétiques suggèrent que les pro-apoptotiques effecteurs sont les cibles pertinentes au niveau fonctionnel (K. Wang et al., 1996). Il a ainsi été montré que l'incubation de tBid avec des mitochondries isolées permettait l'oligomérisation de Bak et une libération rapide du cytochrome c. Cependant, pas d'interaction entre Bid et Bak n'était détectable après l'utilisation d'un agent réticulant, menant à l'hypothèse que Bid active Bax et Bak par un mécanisme de « hit-and-run », c'est à dire une interaction transitoire entraînant leur activation puis leur oligomérisation (Wei et al., 2000).

C - Les différents modèles d'activation proposés, tous les chemins mènent à Rome

La composition de la famille Bcl-2 est donc plutôt simple. Il y a d'un côté les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, …) et de l'autre, les protéines pro-apoptotiques (Bim, Bid, PUMA, Bax, Bak, …). Dans la cellule vivante, les anti-apoptotiques sont capables de tenir en échec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cependant, suite à un signal apoptotique, un déséquilibre apparaît, typiquement sous la forme d'une augmentation de l'expression des membres pro-apoptotiques, principalement les BH3-only et/ou la diminution de l'expression ou l'inactivation des membres anti-apoptotiques. Ce déséquilibre conduit à l'activation des pro-apoptotiques à multi-domaines BH Bax et Bak, qui s'homo-oligomérisent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et forment ainsi des pores responsables de la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'induction de l'apoptose.
Comprendre comment cette activation de Bax et Bak est réalisée est un peu plus compliqué. En effet, plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte du mécanisme permettant l'ultime étape que constitue leur activation. Ce qui distingue ces modèles est 1), l'état d'activation des protéines Bax et Bak à l'état basal et 2), les protéines inhibées préférentiellement par les anti-apoptotiques.

<u>1/ Le modèle d'activation directe, le jeu des chaises musicales</u>

La caractéristique principale de ce modèle est qu'à l'état basal, les protéines effectrices Bax

et Bak sont inactives. Une interaction avec des protéines BH3-only est nécessaire pour permettre leur activation. Les protéines BH3-only sont classées en 2 groupes, les « activateurs » et les « sensibilisateurs » ou « dé-répresseurs » sur la base de leurs affinités pour les autres membres de la famille Bcl-2 (L. Chen et al., 2005; Letai et al., 2002) (Tableau 1).

	Antiapoptotic protein binds to		
		BH3 proteins	
Antiapoptotic protein	Bax/ Bak/Bid	Activator	Sensitizer
Bcl-2	Bax, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad
Bcl-XL	Bax, Bak, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad, Bik, Hrk
Bcl-w	Bax, Bak, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad, Bik, Hrk
Mcl-1	Bak, Bid	Bim, Puma	Noxa, Hrk
A1	Bak, Bid	Bim, Puma	Noxa, Bik, Hrk

Letai et al. (2002); Chen et al. (2005).

Tableau 1 - Profil d'interaction au sein de la famille Bcl-2
Tiré de (Shamas-Din et al., 2013)

Ainsi, les protéines tBid, Bim et PUMA, sont considérées comme des « activateurs » et sont capables d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH, Bax et Bak pour les activer (Dai et al., 2011; H. Kim et al., 2006), alors que les autres BH3-only, Bad, Noxa, Bik, etc, capables d'interagir avec les anti-apoptotiques mais incapables de lier Bax et Bak, sont considérées comme des « sensibilisateurs ». Dans ce modèle, les anti-apoptotiques inhibent les BH3-only activateurs en les séquestrant. A la suite d'un signal apoptotique, les BH3-only « sensibilisateurs », activés, vont interagir avec les anti-apoptotiques et rompre le complexe préexistant avec les « activateurs », libérant ainsi ces derniers. Les « activateurs » vont ensuite interagir avec les pro-apoptotiques effecteurs et induire leur activation, conduisant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Certo et al., 2006; Kuwana et al., 2005) (Figure 24, a). Ainsi, en l'absence de ces BH3-only activateurs, les protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak ne peuvent pas être activée (D. Ren et al., 2010).

Il est à noter que des études récentes tendent à élargir le groupe des « activateurs » à d'autres BH3-only, tels que Noxa et Bmf, par exemple (H. C. Chen et al., 2015; H. Du et al., 2011; Hockings et al., 2015). Du et al ont ainsi montré que ces BH3-only sont capables d'induire l'apoptose (bien que de manière moins importante) en l'absence des protéines Bim et Bid, et suggèrent que dans certains contextes, l'activation des effecteurs peut être acquise via des protéines autres que Bim et Bid.

Les protéines BH3-only peuvent aussi être discriminées uniquement sur la base de leur affinité avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 mais pas par leur fonction, comme dans le modèle d'activation indirecte.

2/ Le modèle d'activation indirecte ou de déplacement, ouvrir la boîte de Pandore

Dans ce modèle, les protéines BH3-only n'interagissent pas directement avec Bax et Bak pour induire leur activation. En effet, Bax et Bak sont constitutivement actifs et doivent donc être inhibés par les protéines anti-apoptotiques pour que la cellule survive.
Pour induire l'apoptose, les BH3-only doivent déplacer les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak des anti-apoptotiques pour permettre leur oligomérisation et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Comme certains BH3-only interagissent sélectivement avec un nombre limité d'anti-apoptotiques, contrairement à Bim, Bid et PUMA (Certo et al., 2006; L. Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005) (Figure 23), une combinaison de BH3-only peut être nécessaire pour induire l'apoptose dans des cellules qui expriment de multiples anti-apoptotiques (L. Chen et al., 2005; Willis et al., 2007) (Figure 24, b). Ce modèle est notamment étayé par l'existence d'hétéro-dimères formés par Mcl-1 et Bak et Bcl-XL et Bak au niveau de la mitochondrie dans les cellules vivantes (Willis et al., 2005) et le fait que la surexpression de la protéine BH3-only Noxa rompt le complexe Mcl-1/Bak, formant ainsi un nouveau complexe Mcl-1/Noxa et libérant Bak pour induire l'apoptose.

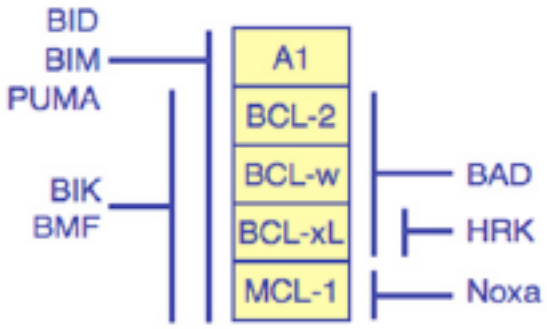


Figure 23 - Sélectivité des BH3-only vis-à-vis des anti-apoptotiques
Tiré de (Chipuk, Moldoveanu, Llambi, Parsons, & Green, 2010)

Le consensus actuel est que les deux modèles d'activation précedents, direct et indirect, s'appliquent dans de nombreuses circonstances.

3/ Le modèle d'activation unifié, 2 modes pour 1 mort

Dans le modèle unifié (Llambi et al., 2011) (Figure 24, c), les protéines anti-apoptotiques séquestrent à la fois les BH3-only activateurs, « mode 1 » et les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak, « mode 2 ». Bien que dans les cellules, ces 2 modes d'inhibition cohabitent, dans ce modèle, l'inhibition de l'apoptose par le « mode 1 » est moins efficace et plus facile à défaire par les « sensibilisateurs » pour induire l'activation de Bax et Bak ainsi que l'apoptose, que l'inhibition par le « mode 2 ».

L'effet de Bim dont les spécificités de fixation ont été altérées, sur le renouvellement cellulaire *in vivo* est en adéquation avec ce modèle (Merino et al., 2009). Ainsi, Merino et al ont remplacé le domaine BH3 de Bim par celui de BH3-only considérés comme des « sensibilisateurs », celui de Bad et de Noxa par exemple, chez la souris. L'analyse de ces souris a montré que l'activité pro-apoptotique de Bim n'est pas uniquement basée sur sa capacité à interagir avec ses partenaires anti-apoptotique ou uniquement sa fixation à Bax, mais que l'initiation de l'apoptose requérait ces deux caractéristiques.

Une dimension membranaire dans l'activation de Bax et Bak commence à émerger. En effet, dans un modèle très proche du modèle d'activation unifié, le modèle « ancrés ensemble » (Leber, Lin, & Andrews, 2010), étayée par une analyse élégante des interactions entre tBid, Bax et Bcl-XL sur une membrane synthétique ((Lovell et al., 2008), voir aussi (Billen, Kokoski, Lovell, Leber, & Andrews, 2008)), souligne le fait que les interactions au sein de la famille Bcl-2 sont grandement influencées par la membrane dans laquelle ces molécules sont ancrées, la membrane est ainsi considérée comme le « lieu d'action » (Shamas-Din et al., 2013). En effet, la perméabilisation de la membrane mitochondriale n'est pas réalisée tant que Bax et Bak n'ont pas atteint leur conformation finale au sein de la membrane externe mitochondriale (H. Kim et al., 2009). De plus, les interactions avec les membranes entraînent différents changements de conformation des protéines de la famille Bcl-2, gouvernant leur affinité pour leurs partenaires (Garcia-Saez, Ries, Orzaez, Perez-Paya, & Schwille, 2009; Leber et al., 2010).

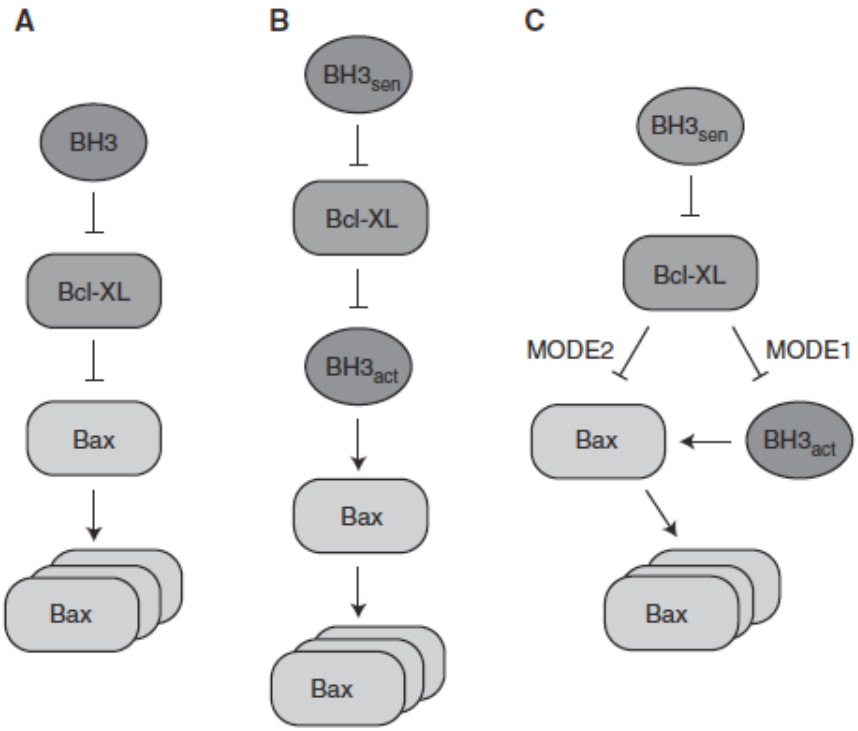


Figure 24 - Les différents modèles d'activation des pro-apoptotiques effecteurs
Tiré de Bender T and Martinou JC, Cold Spring Prospect Biol 2013

Alors que les caspases effectrices activées suite à la libération du cytochrome c à travers les pores formés par Bax et Bak tuent la cellule par apoptose, l'inhibition de ces protéases ne protège la cellule que de façon transitoire. Une fois que la mitochondrie est perméabilisée, le compte-à-rebours menant à la mort cellulaire débute, quelque soit l'état d'activation des caspases, soit à cause des médiateurs toxiques libérés par la mitochondrie, soit par la perte des fonctions essentielles de celle-ci (Chipuk & Green, 2005).

D – La famille Bcl-2, l'ennemi public numéro 1

Comme vu précédemment (dans la partie I.C), des altérations dans la régulation de l'apoptose sont impliquées dans une multitudes de pathologies humaines (Fadeel, Orrenius, & Zhivotovsky, 1999). Le rôle central joué par la famille Bcl-2 dans le contrôle de la voie apoptotique mitochondriale, fait ainsi des membres de cette famille des leviers importants, activés ou inhibés selon les maladies concernées. Ainsi, la protéine anti-apoptotique Mcl-1 est surexprimée dans de nombreux cancers hématologiques (Aichberger et al., 2005; Breitenbuecher et al., 2009; Le Gouill, Podar, Harousseau, & Anderson, 2004) et tumeurs solides (Fleischer et al., 2006; E. S. Henson, Hu, & Gibson, 2006), incluant la leucémie

myéloïde chronique et le carcinome hépatocellulaire. Mcl-1 a aussi été impliqué dans la chimiorésistance de certaines tumeurs (Song, Coppola, Livingston, Cress, & Haura, 2005; Thallinger et al., 2004). Ces données font de Mcl-1, et également d'autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, une cible thérapeutique potentielle et attractive. Ainsi, une famille de molécules appelées BH3 *mimetics*, mimant le domaine BH3 des BH3-only a été développée pour les inhiber et leur efficacité anti-tumorale est actuellement à l'étude (Besbes, Mirshahi, Pocard, & Billard, 2015). La fonction anti-apoptotique de ces protéines n'est pas seulement exploitée par les cellules cancéreuses mais aussi par certains virus qui expriment des protéines qui leur sont homologues ou qui stimulent (ou stabilise) leur expression.

1/ Les homologues de la famille Bcl-2 chez les virus, souvent imité et toujours égalé

Une fois infectée par un virus, la cellule voit sa machinerie cellulaire détournée au profit du virus et notamment au profit de la synthèse des protéines virales. Pour pouvoir ensuite infecter d'autres cellules, le virus a besoin de maintenir en vie la cellule infectée suffisamment longtemps pour répliquer son génome et former de nouvelles particules virales. Ainsi, des mécanismes d'échappement au système immunitaire et/ou au programme apoptotique ont été mis en place, conduisant parfois au développement de cancers (Carrillo-Infante, Abbadessa, Bagella, & Giordano, 2007).

Le mimétisme moléculaire via l'expression d'homologues structurels et fonctionnels de Bcl-2 est une stratégie de survie importante des virus (Cuconati & White, 2002). La pertinence de la subversion de l'apoptose chez l'hôte a été démontrée par la construction de mutant de délétion de plusieurs virus (Brune, Nevels, & Shenk, 2003; Fleming et al., 2013; Jurak, Schumacher, Simic, Voigt, & Brune, 2008). Les adénovirus (Pilder, Logan, & Shenk, 1984), le virus Epstein-Barr (EBV) (Altmann & Hammerschmidt, 2005), l'herpes virus gamma (Gangappa, van Dyk, Jewett, Speck, & Virgin, 2002), le virus du myxome (Macen et al., 1996) et le virus de la vaccine induisent l'apoptose de la cellule hôte pendant l'infection en absence de protéines Bcl-2 virales fonctionnelles. En conservant des caractéristiques de structure clés mais pas nécessairement de séquence, les homologues viraux de Bcl-2 (vBcl-2) peuvent inhiber à la fois les BH3-only et les pro-apoptotiques effecteurs. Plusieurs d'entre eux ont été identifiés: vBcl-2 dans l'adénovirus (White et al., 1992), KS-Bcl-2 chez l'herpes virus associé au sarcome de Kaposi (Q. Huang, Petros, Virgin, Fesik, & Olejniczak, 2002),

BHRF1 chez le virus Epstein-Barr (Q. Huang, Petros, Virgin, Fesik, & Olejniczak, 2003), par exemple (Figure 25).

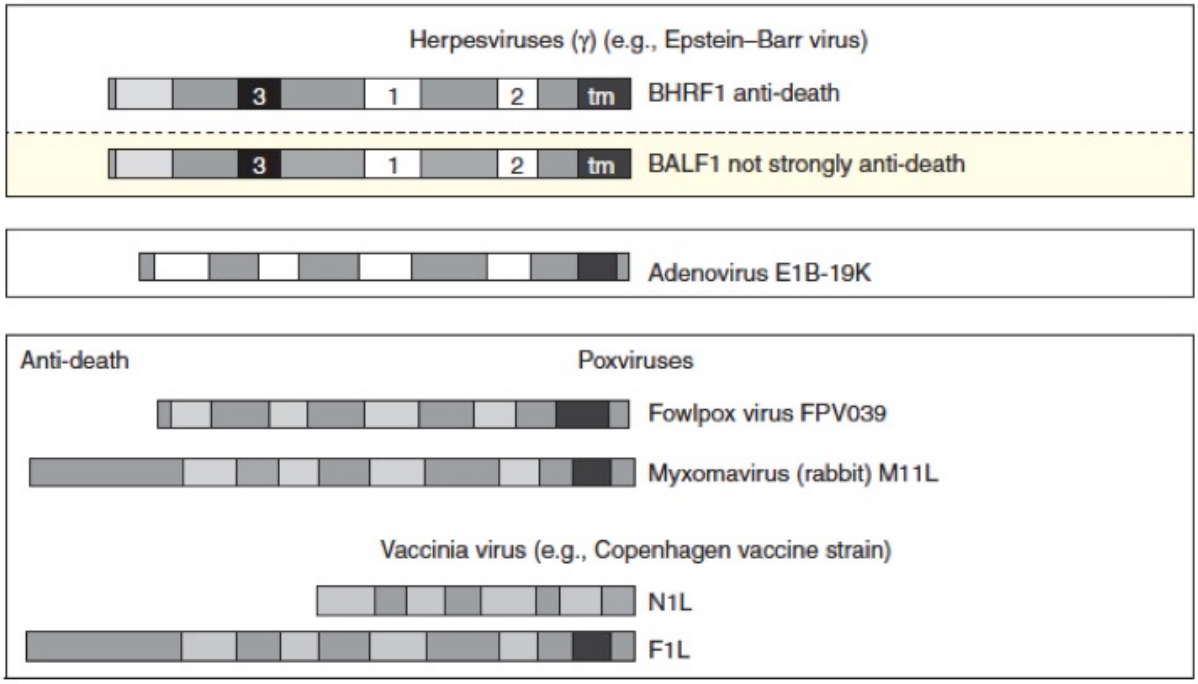


Figure 25 - Protéines virales de la famille Bcl-2
D'après (Hardwick & Soane, 2013)

Récemment, des protéines vBcl-2 qui adoptent un repliement similaire aux anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sans partager d'identité de séquence ont été identifiés dans les poxvirus. C'est le cas de M11L (Douglas, Corbett, Berger, McFadden, & Handel, 2007; Kvansakul et al., 2007) chez le virus du myxome et les protéines F1L (Kvansakul et al., 2008) et N1L (Aoyagi et al., 2007; Cooray et al., 2007) chez le virus de la vaccine.

Des études biochimiques ont révélé des variations importantes dans le profil d'interaction des protéines vBcl-2 par rapport à la nature de leurs ligands et leurs affinités. La protéine F1L est capable de fixer Bim, Bak et Bax uniquement, avec une affinité modérée (Kvansakul et al., 2008). Au contraire, SPPV14 interagit avec plusieurs BH3-only, notamment Bim, Bid, Bmf, Hrk et PUMA ainsi que Bak et Bax (Okamoto et al., 2012) avec une affinité supérieure (Tableau 2).

La phase ouverte de lecture des gènes vBcl-2 n'est pas épissée et est généralement localisée dans des régions variables de leur génome respectif, suggérant qu'ils ont été récupérés chez leur cellule hôte pour établir avec succès une relation hôte-virus stable (Hardwick & Soane, 2013).

Pro-death	Pro-survival										
	SPPV14	M11L	F1L	BHRF1[a]	KsBcl-2[b]	N1L[b*]	Bcl-2	Bcl-w	Bcl-x_L	Mcl-1	A1[a]
Bad	>2000	>1000	NB	>2000	>1000	>1000	16	30	5.3	>100000	15000
Bid	341±16	100	NB	109	112	152	6800	40	82	2100	1
Bik	>2000	>1000	NB	>2000	>1000	n/a	850	12	43	1700	58
Bim	26±4	5	250	18	29	72	2.6	4.3	4.6	2.4	1
Bmf	67±6	100	NB	>2000	>1000	n/a	3	9.8	9.7	1100	180
Hrk	63±6	>1000	NB	>1000	>1000	n/a	320	49	3.7	370	46
Noxa	>2000	>1000	NB	>2000	>1000	n/a	>100000	>100000	>100000	24	20
Puma	65±1	>1000	NB	70	69	n/a	3.3	5.1	6.3	5	1
Bak	46±3	50	4300	150	<50	71	>1000	500	50	10	3
Bax	32±5	75	1850	1400	980	n/a	100	58	130	12	n/a

Tableau 2 - Affinité des protéines anti-apoptotiques pour les motifs BH3 des pro-apoptotiques
Tiré de Kvansakul M and Hinds MG, Cell Death Dis 2013

Les virus ne sont pas les seuls à s'attaquer à la machinerie apoptotique, l'expression de certains membres de la famille Bcl-2 est ainsi altérée dans certains cancers.

2/ Les amplifications et délétions des membres de la famille Bcl-2 dans les cancers, préserver les protecteurs et neutraliser les tueurs

Beroukhim et al. ont étudié les modifications du nombre de copies de gènes dans les cellules somatiques au sein de cancers humains d'histologie variée, en s'intéressant aux gènes amplifiés et délétés avec une fréquence significative.

Dans les gènes amplifiés, on retrouve des oncogènes bien décrits dans la littérature tels que myc ou encore Kras ainsi que l'inhibiteur du suppresseur de tumeur p53, MDM2 mais aussi, de façon notable, deux des cinq protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-XL/Bcl2L1 (Beroukhim et al., 2010; Zack et al., 2013) (Tableau 3, surlignés). De façon intéressante, les auteurs ont montré que l'amplification de ces deux anti-apoptotiques était corrélée à celle de myc dont l'apoptose induite via Bim et PUMA suite à sa suractivation ((Egle, Harris, Bouillet, & Cory, 2004) et (Garrison et al., 2008; Michalak et al., 2009)) peut être jugulée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 comme cela a été rapporté auparavant (Fanidi, Harrington, & Evan, 1992) mais également Mcl-1 et Bcl-XL (Beroukhim et al., 2010). Cela suggère une potentielle « addiction » des cancers portant une amplification de myc vis à vis des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, faisant ainsi de Mcl-1 et Bcl-XL des cibles thérapeutiques pertinentes.

Des modifications du nombre de copies de gènes touchent aussi certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, tout comme les suppresseurs de tumeur, PTEN (inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/AKT) et APC (régulateur négatif du cycle cellulaire), le *BH3-only* PUMA ainsi que la protéine pro-apoptotique à multi-domaine BH,

Bok, sont délétés de façon significatives au sein des tumeurs (Tableau 4). Ceci est en accord avec plusieurs publications montrant une délétion fréquente de la région comprenant le locus PUMA sur le chromosome 19 dans un nombre important de néoplasmes incluant les lymphomes B et les lignées cellulaires issues de cancer neuronal, colorectal et ovarien (Yu & Zhang, 2008; Yu, Zhang, Hwang, Kinzler, & Vogelstein, 2001). Cependant, l'abolition de l'expression de PUMA chez la souris, n'entraîne pas de phénotype particulier. En effet, les souris PUMA KO ont une apparence et une masse corporelle normales ainsi que les organes internes majeurs d'apparence normale (Jeffers et al., 2003). Toutefois, il est à noter que des études réalisées chez des souris Eμ-myc ont montré que la perte de PUMA accélère de manière dramatique l'initiation de tumeurs (Garrison et al., 2008). De plus, le même groupe a rapporté que le défaut d'expression de PUMA précipite aussi la formation de tumeurs dans des fibroblastes embryonnaires de souris transformées avec E1A (Hemann et al., 2004). Enfin, la perte simultanée de PUMA et Bim induit la formation de tumeurs de façon spontanée (Erlacher et al., 2006).

Comme pour Bax ou Bak, ces résultats contrastés suggèrent que la seule perte de fonction de PUMA n'induit pas le développement de cancers ou de défauts majeurs dans l'induction de l'apoptose, indiquant une potentielle compensation par d'autres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, notamment NOXA dont l'expression est aussi sous le contrôle de p53 par exemple.

La protéine pro-apoptotique Bok, qui partage une très forte homologie avec Bax et Bak, et dont l'expression était considérée comme étant limitée aux tissus reproducteurs, est très mal caractérisée au niveau fonctionnel. Les souris $Bok^{-/-}$ ou double mutants $Bax^{-/-}Bok^{-/-}$ et $Bak^{-/-}Bok^{-/-}$ n'ont pas de phénotype particulier ni de défauts dans la réponse à des stress classiques (Ke et al., 2013; Ke et al., 2012). Cependant, des travaux récents suggèrent que l'expression de Bok serait plus large que le système reproducteur (Ke et al., 2012) et qu'elle serait impliquée dans la réponse apoptotique faisant suite à un stress réticulaire (Carpio et al., 2015), ce qui corrèle avec sa localisation au niveau du réticulum endoplasmique.

Dans ce contexte, la délétion fréquente de PUMA et Bok au niveau somatique dans les cancers ne garantit donc pas de rôle prépondérant de leur absence dans la cancérogénèse bien qu'elle puisse y participer.

A) Amplification

Rank	Chromosome and band	Peak region	GISTIC q value*	# genes	Known target	GRAIL top target	GRAIL p-value for region
1	8q24.21	chr8:128774432-128849112	2,72E-120	1	*MYC*	*MYC*	3,33E-05
2	11q13.2	chr11:69098089-69278404	3,16E-108	3	*CCND1*	*ORAOV1*	9,99E-05
3	17q12	chr17:35067383-35272328	2,68E-92	6	*ERBB2*	*ERBB2, C17orf37*	3,20E-05
4	12q14.1	chr12:56419524-56488685	1,42E-72	7	*CDK4*	*TSPAN31*	6,30E-07
5	14q13.3	chr14:35708407-36097605	6,11E-51	3	*NKX2-1*	*NKX2-1*	3,16E-01
6	12q15	chr12:67440273-67566002	7,77E-49	1	*MDM2*	*MDM2*	3,33E-05
7	7p11.2	chr7:54899301-55275419	2,41E-48	1	*EGFR*	*EGFR*	1,88E-04
8	1q21.2	chr1:148661965-149063439	1,44E-39	9	*MCL1‡*	*MCL1*	8,58E-03
9	8p12	chr8:38252951-38460772	1,56E-35	3	*FGFR1*	*FGFR1*	1,28E-02
10	12p12.1	chr12:25189655-25352305	3,52E-30	2	*KRAS*	*KRAS*	3,36E-02
11	19q12	chr19:34975531-35098303	2,66E-28	1	*CCNE1*	*CCNE1*	4,28E-03
12	22q11.21	chr22:19172385-19746441	3,71E-26	11	*CRKL*	*CRKL*	1,68E-01
13	12q15	chr12:68249634-68327233	2,70E-24	2		*LRRC10*	1,00E+00
14	12q14.3	chr12:64461446-64607139	3,53E-22	1	*HMGA2*	*HMGA2*	1,68E-02
15	Xq28	chrX:152729030-154913754	1,86E-17	53		*SPRY3*	2,18E-01
16	5p15.33	chr5:1212750-1378766	2,57E-16	3	*TERT*	*TERT*	2,34E-06
17	3q26.2	chr3:170024984-173604597	9,60E-15	22	*PRKCI*	*PRKCI*	8,56E-02
18	15q26.3	chr15:96891354-97698742	2,13E-14	4	*IGF1R*	*IGF1R*	1,28E-02
19	20q13.2	chr20:51603033-51989829	9,68E-14	1		*ZNF217*	1,52E-09
20	8p11.21	chr8:42006632-42404492	5,76E-12	6		*PLAT*	1,01E-01
21	1p34.2	chr1:39907605-40263248	6,29E-12	7	*MYCL1*	*MYCL1*	3,00E-02
22	17q21.33	chr17:44673157-45060263	2,26E-11	4		*NGFR, PHB*	6,32E-01
23	2p24.3	chr2:15977811-16073001	8,64E-11	1	*MYCN*	*MYCN*	1,88E-04
24	7q21.3	chr7:89924533-98997268	3,03E-10	62	*CDK6*	*CDK6*	5,72E-02
25	13q34	chr13:108477140-110084607	1,07E-09	4		*IRS2*	6,32E-01
26	11q14.1	chr11:76699529-78005085	2,03E-08	14		*GAB2*	1,33E-02
27	20q13.33	chr20:61329497-62435964	3,90E-08	38		*BIRC7*	1,50E-01
28	17q23.1	chr17:55144989-55540417	1,85E-07	5		*RPS6KB1*	1,69E-01
29	1p12	chr1:119996566-120303234	2,56E-07	5		*REG4*	8,40E-02
30	8q21.13	chr8:81242335-81979194	2,94E-07	3		*ZNF704, ZBTB10*	1,00E+00
31	6p21.1	chr6:43556800-44361368	4,45E-07	18		*VEGFA*	3,01E-03
32	5p11	chr5:45312870-49697231	8,18E-07	0			
33	20q11.21	chr20:29526118-29834552	2,93E-06	5	*BCL2L1‡*	*BCL2L1, ID1*	9,40E-04
34	6q23.3	chr6:135561194-135665525	3,12E-06	1	*MYB***	*hsa-mir-548a-2*	
35	1q44	chr1:241364021-247249719	3,95E-06	71		*AKT3*	1,00E+00
36	5q35.3	chr5:174477192-180857866	5,91E-06	92		*FLT4*	4,74E-04
37	7q31.2	chr7:115981465-116676953	6,32E-06	3	*MET*	*MET*	9,99E-05
38	18q11.2	chr18:17749667-22797232	1,67E-05	21		*CABLES1*	1,64E-05
39	17q25.1	chr17:70767943-71305641	3,58E-05	13		*GRB2, ITGB4*	7,31E-01
40	1p32.1	chr1:58658784-60221344	6,05E-05	7	*JUN*	*JUN*	1,18E-01
41	17q11.2	chr17:24112056-24310787	1,10E-04	5		*DHRS13, FLOT2, ERAL1, PHF12*	1,00E+00
42	17p11.2	chr17:18837023-19933105	1,40E-04	12		*MAPK7*	5,14E-02
43	8q24.11	chr8:116186189-120600761	1,52E-04	13		*NOV*	4,00E-04
44	12q15	chr12:66458200-66543552	1,94E-04	0			
45	19q13.2	chr19:43177306-45393020	2,17E-04	60		*LGALS7, DYRK1B*	5,43E-02
46	11q22.2	chr11:101433436-102134907	3,02E-04	8	*BIRC2, YAP1*	*BIRC2*	7,62E-03
47	4q12	chr4:54471680-55980061	4,25E-04	7	*PDGFRA, KIT*	*KDR, KIT*	2,57E-02
48	12p11.21	chr12:30999223-32594050	5,08E-04	9		*DDX11, FAM60A*	1,00E+00
49	3q28	chr3:178149984-199501827	5,36E-04	143	*PIK3CA*	*PIK3CA*	1,06E-04
50	1p36.33	chr1:1-5160566	6,73E-04	77		*TP73*	3,84E-04
51	17q24.2	chr17:62318152-63890591	1,86E-03	12		*BPTF*	1,00E+00
52	1q23.3	chr1:158317017-159953843	1,95E-03	52		*PEA15*	2,05E-01
53	1q24.3	chr1:169549478-170484405	2,08E-03	6		*BAT2D1, MYOC*	7,90E-01

Tableau 3 - Gènes amplifiés dans les cancers humains (1)
Tiré de (Beroukhim et al., 2010)

A) Amplification (follow-up)

Rank	Chromosome and band	Peak region	GISTIC q value*	# genes	Known target	GRAIL top target	GRAIL p-value for region
54	8q22.3	chr8:101163387-103693879	2,15E-03	14		*RRM2B*	5,99E-02
55	13q31.3	chr13:89500014-93206506	2,15E-03	3		*GPC5*	5,62E-02
56	12q21.1	chr12:70849987-70966467	2,56E-03	0			
57	12p13.33	chr12:1-1311104	2,63E-03	10		*WNK1*	3,85E-02
58	12q21.2	chr12:76852527-77064746	3,63E-03	0			
59	1q32.1	chr1:201678483-203358272	3,69E-03	21	*MDM4*	*MDM4*	6,99E-04
60	19q13.42	chr19:59066340-59471027	4,00E-03	19		*PRKCG, TSEN34*	1,00E+00
61	12q12	chr12:38788913-42596599	4,53E-03	12		*ADAMTS20*	2,02E-01
62	12q23.1	chr12:95089777-95350380	7,23E-03	2		*ELK3*	3,16E-01
63	12q21.32	chr12:85072329-85674601	9,36E-03	0			
64	10q22.3	chr10:74560456-82020637	1,16E-02	46		*SFTPA1B*	3,81E-02
65	3p11.1	chr3:86250885-95164178	1,56E-02	8		*POU1F1*	7,62E-03
66	17q11.1	chr17:22479313-22877776	2,07E-02	1		*WSB1*	3,60E-01
67	8q24.3	chr8:140458177-146274826	2,25E-02	97		*PTP4A3, MAFA, PARP10*	8,58E-02
68	Xq12	chrX:66436234-67090514	3,34E-02	1	*AR*	*AR*	5,62E-02
69	6q12	chr6:63255006-65243766	5,00E-02	3		*PTP4A1*	2,86E-03
70	14q11.2	chr14:1-23145193	5,39E-02	95		*BCL2L2*	3,90E-01
71	9q34.3	chr9:137859478-140273252	7,63E-02	76		*NRARP, MRPL41, TRAF2, LHX3*	1,00E+00
72	6p24.1	chr6:1-23628840	8,61E-02	95		*E2F3*	6,71E-05
73	13q12.2	chr13:1-40829685	1,20E-01	110		*FOXO1*	3,53E-03
74	12q21.1	chr12:72596017-73080626	1,23E-01	0			
75	14q32.33	chr14:106074644-106368585	1,41E-01	0			
76	11p13	chr11:32027116-37799354	1,57E-01	35		*WT1*	1,46E-01

Tableau 3 - Gènes amplifiés dans les cancers humains (2)
Tiré de (Beroukhim et al., 2010)

B) Deletion

Rank	Chromosome and band	Peak region	GISTIC q value*	# genes	Known target	GRAIL top target	GRAIL p-value for region
1	9p21.3	chr9:21489625-22474701	0,00E+00	5	*CDKN2A/B*	*CDKN2A*	5,16E-04
2	3p14.2	chr3:58626894-61524607	2.4E-314	2	*FHIT*§	*FHIT*	5,26E-03
3	16q23.1	chr16:76685816-78205652	1,40E-176	2	*WWOX§*	*WWOX*	1,99E-02
4	9p24.1	chr9:7161607-12713130	1,01E-83	3	*PTPRD§*	*PTPRD*	2,83E-01
5	20p12.1	chr20:14210829-15988895	9,69E-74	2	*MACROD2§*	*FLRT3*	1,89E-01
6	6q26	chr6:161612277-163134099	8,13E-65	1	*PARK2§*	*PARK2*	4,52E-01
7	13q14.2	chr13:46362859-48209064	3,90E-63	8	*RB1*	*RB1*	2,65E-01
8	2q22.1	chr2:138479322-143365272	1,10E-60	3	*LRP1B§*	*LRP1B*	9,93E-02
9	4q35.2	chr4:186684565-191273063	1,44E-58	15		*FRG2, TUBB4Q*	1,39E-01
10	5q11.2	chr5:57754754-59053198	1,52E-55	5	*PDE4D§*	*PLK2, PDE4D*	1,00E+00
11	16p13.3	chr16:5062786-7709383	4,98E-49	2	*A2BP1§*	*A2BP1*	1,00E+00
12	7q34	chr7:141592807-142264966	7,40E-43	3	*TRB@*^	*PRSS1*	1,00E+00
13	2q37.3	chr2:241477619-242951149	7,03E-37	19		*TMEM16G, ING5*	1,00E+00
14	19p13.3	chr19:1-526082	1,13E-36	10		*GZMM, THEG, PPAP2C, C19orf20*	1,00E+00
15	10q23.31	chr10:89467202-90419015	1,14E-30	4	*PTEN*	*PTEN*	1,32E-01
16	8p23.2	chr8:2053441-6259545	4,10E-28	1	*CSMD1§*	*CSMD1*	9,96E-03
17	1p36.31	chr1:3756302-6867390	2,84E-26	23		*DFFB, ZBTB48, AJAP1*	1,00E+00
18	4q22.1	chr4:91089383-93486891	6,48E-24	2		*MGC48628*	9,31E-01
19	18q23	chr18:75796373-76117153	5,63E-22	4		*PARD6G*	3,78E-01
20	6p25.3	chr6:1543157-2570302	7,64E-19	2		*FOXC1*	9,04E-01
21	19q13.43	chr19:63402921-63811651	7,13E-18	17		*ZNF324*	1,00E+00
22	Xp21.2	chrX:31041721-34564697	1,22E-16	2	*DMD§*	*DMD*	7,24E-01
23	11q25	chr11:130280899-134452384	2,73E-16	12	*OPCML§, HNT§*	*HNT*	6,77E-03
24	13q12.11	chr13:1-23902184	1,26E-15	29		*LATS2*	9,27E-01
25	22q13.33	chr22:45488286-49691432	8,80E-15	38		*TUBGCP6*	3,39E-01
26	15q11.2	chr15:1-24740084	2,98E-14	20		*A26B1*	5,96E-01
27	22q11.22	chr22:20517661-21169423	3,14E-14	3		*VPREB1*	1,00E+00
28	10q26.3	chr10:129812260-135374737	8,43E-13	35		*MGMT, SYCE1*	7,89E-02
29	12p13.2	chr12:11410696-12118386	1,88E-12	2	*ETV6§*	*ETV6*	1,89E-01
30	8p23.3	chr8:1-392555	5,99E-11	2		*ZNF596*	4,52E-01
31	1p36.11	chr1:26377344-27532551	3,96E-10	24		*SFN*	6,05E-02
32	11p15.5	chr11:1-1391954	1,58E-09	49		*RASSF7*	4,68E-01
33	17q11.2	chr17:26185485-27216066	2,34E-09	10	*NF1*	*NF1*	2,98E-01
34	11q23.1	chr11:107086196-116175885	3,47E-09	61	*ATM*	*CADM1*	3,14E-02
35	9p24.3	chr9:1-708871	1,13E-08	5		*FOXD4*	1,00E+00
36	10q11.23	chr10:52313829-53768264	6,38E-08	4	*PRKG1§*	*DKK1, PRKG1*	1,00E+00
37	15q15.1	chr15:35140533-43473382	9,41E-08	109		*TUBGCP4*	2,68E-01
38	1p13.2	chr1:110339388-119426489	1,09E-07	81		*MAGI3*	7,67E-01
39	Xp22.33	chrX:1-3243111	4,29E-07	21		*SHOX*	1,00E+00
40	3p26.3	chr3:1-2121282	1,10E-06	2		*CHL1*	1,23E-03
41	9p13.2	chr9:36365710-37139941	1,15E-06	2	*PAX5*	*MELK*	6,62E-02
42	17p13.1	chr17:7471230-7717938	2,19E-06	10	*TP53*	*ATP1B2*	2,98E-01
43	12q24.33	chr12:131913408-132349534	2,38E-06	7		*CHFR*	1,84E-02
44	7q36.3	chr7:156893473-158821424	2,48E-06	7	*PTPRN2§*	*NCAPG2*	4,72E-01
45	6q16.1	chr6:76630464-105342994	5,35E-06	76		*FUT9, C6orf165, C6orf162, GJA10*	1,00E+00
46	5q21.1	chr5:85837489-133480433	7,00E-06	142	*APC*	*APC*	3,52E-01
47	8p11.22	chr8:39008109-41238710	9,16E-06	7		*C8orf4, ZMAT4*	6,61E-01
48	19q13.32	chr19:52031294-53331283	1,18E-05	25		*BBC3*	1,00E+00
49	10p15.3	chr10:1-1042949	1,32E-05	4		*TUBB8*	9,08E-01
50	1p31.1	chr1:71284749-74440273	3,97E-05	4	*NEGR1§*	*NEGR1*	1,23E-03
51	13q31.3	chr13:92308911-94031607	6,23E-05	2	*GPC6§*	*GPC6, DCT*	9,04E-01
52	16q11.2	chr16:31854743-53525739	7,66E-05	37		*RBL2*	3,39E-01

Tableau 4 – Gènes délétés dans les cancers humains (1)
Tiré de (Beroukhim et al., 2010)

B) Deletion (follow-up)

Rank	Chromosome and band	Peak region	GISTIC q value*	# genes	Known target	GRAIL top target	GRAIL p-value for region
53	20p13	chr20:1-325978	7,66E-05	10		*SOX12*	9,44E-01
54	5q35.3	chr5:177541057-180857866	1,72E-04	43		*SCGB3A1*	4,08E-01
55	1q43	chr1:223876038-247249719	3,66E-04	173	*RYR2§*	*FH, ZNF678*	1,00E+00
56	16p13.3	chr16:1-359092	1,17E-03	16		*HBZ*	1,00E+00
57	17q21.2	chr17:37319013-37988602	1,65E-03	22		*CNP*	5,52E-02
58	2p25.3	chr2:1-15244284	1,75E-03	51		*MYT1L*	1,26E-01
59	3q13.31	chr3:116900556-120107320	1,89E-03	1		*LSAMP*	9,96E-03
60	7q21.11	chr7:65877239-79629882	6,41E-03	73	*MAGI2§*	*CLDN4*	6,67E-01
61	7q35	chr7:144118814-148066271	1,17E-02	3	*CNTNAP2§*	*CNTNAP2*	2,99E-02
62	14q32.12	chr14:80741860-106368585	1,44E-02	154		*PRIMA1*	3,76E-01
63	16q24.3	chr16:88436931-88827254	1,48E-02	9		*C16orf3*	1,00E+00
64	3q26.31	chr3:175446835-178263192	2,66E-02	1	*NAALADL2§*	*NAALADL2*	4,52E-01
65	17q25.3	chr17:78087533-78774742	2,66E-02	8		*ZNF750*	7,55E-01
66	19p12	chr19:21788507-34401877	2,66E-02	12		*ZNF492, ZNF99*	3,31E-01
67	12q23.1	chr12:97551177-99047626	3,24E-02	3	*ANKS1B§*	*ANKS1B*	6,81E-01
68	4p16.3	chr4:1-435793	3,88E-02	4		*ZNF141*	2,83E-01
69	18p11.32	chr18:1-587750	4,50E-02	4		*COLEC12*	1,00E+00
70	2q33.2	chr2:204533830-206266883	5,16E-02	1	*PARD3B§*	*PARD3B*	2,27E-01
71	8p21.2	chr8:22125332-30139123	5,55E-02	63		*DPYSL2, STMN4*	6,18E-01
72	8q11.22	chr8:42971602-72924037	6,81E-02	86	*SNTG1§*	*FLJ23356, ST18, RB1CC1*	1,00E+00
73	16q23.3	chr16:80759878-82408573	8,79E-02	2	*CDH13§*	*CDH13*	1,89E-01
74	11q14.1	chr11:82612034-85091467	9,16E-02	6	*DLG2§*	*CCDC89, CCDC90B, TMEM126A*	1,00E+00
75	14q23.3	chr14:65275722-67085224	1,22E-01	7		*GPHN, MPP5*	6,61E-01
76	7p22.2	chr7:3046420-4279470	1,25E-01	1	*SDK1§*	*SDK1*	6,15E-04
77	13q34	chr13:111767404-114142980	1,30E-01	25		*TUBGCP3*	2,19E-01
78	17p12	chr17:10675416-12635879	1,34E-01	5	*MAP2K4*	*MAP2K4, ZNF18*	9,08E-01
79	21q22.2	chr21:38584860-42033506	1,86E-01	19	*DSCAM§, TMPRSS2/ERG§*	*DSCAM*	4,73E-02
80	18q21.2	chr18:46172638-49935241	2,04E-01	7	*SMAD4, DCC§*	*DCC*	2,32E-01
81	6q22.1	chr6:101000242-121511318	2,30E-01	87		*GTF3C6, TUBE1, ROS1*	1,00E+00
82	14q11.2	chr14:1-29140968	2,46E-01	140		*ZNF219, NDRG2*	1,00E+00

Tableau 4 - Gènes délétés dans les cancers humains (2)
Tiré de (Beroukhim et al., 2010)

3/ Puma et pathologies, un prédateur omniprésent

PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) est une protéine pro-apoptotique BH3-only à fort potentiel apoptotique. Ce fort potentiel apoptotique réside dans le fait qu'elle est capable d'interagir avec l'ensemble du répertoire anti-apoptotique de la famille Bcl-2 au

niveau de la mitochondrie (revoir tableau 2). Elle est d'ailleurs décrite comme étant localisée au niveau de cet organelle (Nakano & Vousden, 2001; Yee & Vousden, 2008), bien que pouvant être séquestrée au niveau du cytosol par les récepteurs EGFR activés (Zhu, Cao, Ali-Osman, Keir, & Lo, 2010), et contribue à l'activation des effecteurs Bax et Bak via une dé-répression ou sensibilisation en inhibant les anti-apoptotiques (Chipuk et al., 2008; Jabbour et al., 2009). De façon intéressante, des travaux suggèrent que PUMA peut aussi activer Bax et Bak de façon directe par l'intermédiaire d'une interaction transitoire qui mène à leur homo-oligomérisation (Cartron et al., 2004; Gallenne et al., 2009; Kuwana et al., 2005).

Peu de temps après sa découverte initiale, PUMA a été identifié comme étant une cible transcriptionnelle de p53 à l'aide de l'analyse globale du profil d'expression des gènes dans une lignée cellulaire où l'activité de p53 est inductible, SAOS-2-p53 (Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001). PUMA a aussi été identifié comme un partenaire de Bcl-2 par un crible double hybride, et est par ailleurs aussi connue sous le nom de BBC3 (Bcl-2-Binding Component 3). L'activité pro-apoptotique de PUMA est ainsi déterminée par le seuil établi par les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Callus et al., 2008).

Une fois activée transcriptionnellement, le gène PUMA produit notamment 2 transcrits, PUMAα et PUMAβ, qui contiennent tous les 2 un domaine BH3, permettant leur interaction avec les membres de la famille Bcl-2. Comme la plupart des protéines BH3-only, le niveau d'expression de PUMA est normalement très faible mais peut être stimulé en réponse à différents stress cellulaires. Un des régulateurs transcriptionnels de PUMA le mieux caractérisé est p53. Lors d'un événement de dommage à l'ADN, p53 est activé par les voies de signalisation ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM-Rad3-related protein) et agit ensuite comme un facteur de transcription qui se fixe directement sur le promoteur de PUMA pour induire sa transcription. Une abolition complète de l'expression de PUMA est souvent associée à la mutation ou la délétion de p53. La perte de p53, considéré comme un suppresseur de tumeur, est observée dans environ la moitié des cancers humains. Le résultat est la rupture totale de l'induction de PUMA liée à p53, et par conséquent, la résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par les UV, les irradiations γ, les dommages à l'ADN et un nombre important d'agents chimiothérapeutiques (Pietsch, Sykes, McMahon, & Murphy, 2008). Durant la lymphomagénèse, l'inactivation de PUMA générée par des mécanismes épigénétiques, correspondant à sa méthylation, a été détectée (Garrison et al., 2008). De plus, des travaux réalisés par notre équipe suggèrent que PUMA est impliqué dans la régulation de la survie des cellules B mémoire (Clybouw et al., 2011).

La transcription de PUMA peut aussi être régulée négativement via la voie de signalisation p53. En effet, en réponse à un dommage à l'ADN et en fonction du contexte cellulaire, p53 peut activer le répresseur transcriptionnel Slug, capable d'inhiber l'induction de la transcription de PUMA, agissant ainsi comme une boucle de rétrocontrôle négatif (Wu et al., 2005). PUMA peut aussi être activé indépendamment de p53, notamment via son homologue p73, qui est capable de se fixer au niveau du promoteur de PUMA au niveau des éléments de réponse de p53 (Melino et al., 2004). En outre, en réponse à des stress comme une privation en cytokines ou en facteurs de croissance, ou encore un stress réticulaire, l'expression de PUMA est stimulée par différents facteurs de transcription, notamment FoxO3a, CHOP et E2F1 (Futami, Miyagishi, & Taira, 2005; J. Li, Lee, & Lee, 2006; H. You et al., 2006). De plus, PUMA est ciblé et induit par de nombreux inhibiteurs de kinase. Ainsi, une stimulation de PUMA est observée dans les cellules de mélanome traitées avec un inhibiteur de MEK, U0126, ou encore dans des cellules du cancer du colon traitées avec l'inhibiteur pan-kinase, la staurosporine (Y. F. Wang et al., 2007). Ce large panel de stimuli susceptibles d'activer PUMA, fait que cette protéine a été décrite comme étant impliquée ou comme étant une cible thérapeutique pertinente dans de nombreuses pathologies humaines en dehors du cancer (Tableau 5).

Ainsi, PUMA semble jouer un rôle plus ou moins important dans les maladies neurodégénératives comme Alzheimer et la maladie de Parkinson, le diabète ou encore certaines maladies cardiovasculaires. Ces maladies sont pour la plupart caractérisées soit par l'activation du facteur de transcription p53, soit par la génération d'un stress du réticulum endoplasmique, tous 2 menant à une activation de la protéine PUMA.

Des travaux publiés il y a 5 ans ont mis en évidence la régulation de PUMA par des microARNs. En effet, il semblerait que certains de ces petits ARN non codants (environ 22 nucléotides), en plus de réguler négativement p27 et p57, touchent aussi le pool d'ARNm de PUMA disponibles à la traduction dans le glioblastome (plusieurs lignées cellulaires) (C. Z. Zhang et al., 2010), le cancer du poumon et le cancer du sein, qui sont des formes communes de cancers épithéliaux humains (C. Zhang et al., 2010). Les microARN miR-221/222 interagissent directement avec des sites potentiels de la région 3'UTR de l'ARNm de PUMA, engendrant une inhibition de sa traduction et donc une répression de son activité pro-apoptotique, corrélée à une survie cellulaire accrue et la progression tumorale. L'extinction de miR-221 /222 entraîne une restauration de la fonction pro-apoptotique de PUMA et une induction de la mort cellulaire, mettant un frein à la croissance tumorale. De plus, il a aussi

été montré que les miR-221/222 sont des régulateurs importants de la mort cellulaire des hépatocytes dans l'insuffisance hépatique aigüe. La surexpression de ces molécules conduit à l'inhibition de l'apoptose au niveau du foie chez la souris par l'intermédiaire de la régulation négative de PUMA.

Enfin, récemment, des mécanismes de régulation post-traductionnels ont aussi été identifiés pour PUMA. Il a été montré que son expression pouvait être régulée négativement via sa phosphorylation au niveau de plusieurs sites, notamment la ser10, induisant sa dégradation par le protéasome (Fricker, O'Prey, Tolkovsky, & Ryan, 2010).

Pathologie	Référence(s)
Cancer	
Cancer du sein	Kutuk O and Letai A, Cell Death Differ 2010; Wang R et al, Breast Cancer Treat 2009
	Zheng X et al, Mol Cancer Ther 2013; Ray RM et al, Apoptosis 2011
Cancer colorectal	Iyer NG et al, Proc Natl Acad Sci USA 2004; Kim MR, Dig Dis Sci 2007
	Sun J et al; PlosOne 2012
Cancer de l'œsophage	Wang H et al, Cancer Biol Ther 2006
Carcinome gastrique	Yoo NJ et al, Digestive and liver Disease 2007
Cancer de la tête et du cou	Sun Q et al, Mol Cancer Ther 2007
Cancer du poumon	Wu DW et al, Oncogene 2014; Yu J et al, Clin Cancer Res 2006
Mélanome	Karst AM, Cancer Res 2006
Cancer du pancréas	Sarkar S, Am J Cancer Res 2013
Cancer de la prostate	Dey P et al, Oncogene 2014
Cancer des ovaires	Zhao Z et al, Biochem J 2012
Maladies neurodégénératives	
Maladie d'Alzheimer	Akhter R, Sanphui P and Biswas SC, J Biol Chem 2014
	Biswa SC et al, Neurochemical Research 2005, Nair VD, Apoptosis 2006
Maladie de Parkinson	Perier C et al, Proc Natl Acad Sci 2007, Sanz E et al, Journal of Neurochemistry 2008
	Karunakaran S et al, The Journal of Neuroscience 2008
Sclérose latérale amyotrophique	Kieran D et al, PNAS 2007
Ataxie spinocérébelleuse	Chou AH et al, Neurochemistry International 2011, Wang HL et al, Experimental Neurology 2010
	Gurzov EN et al, J Biol Chem 2010, Barthson et al, J Biol Chem 2011
Diabète	Lim GE et al, Diabetologia 2013, Thomas HE and Kay TW, Diabetes Metab Res Rev 2011
	Omori K et al, Diabetologia 2011
Infection	
Chlamydia	Fischer SF et al, J Exp Med 2004
SIDA	Castedo M et al, Biochemical and Biophysical Research Communications 2005
	Nickson P, Toth A, Erhardt P, Cardiovascular Research 2007, Mandl A et al, Circulation 2011
Maladies cardiovasculaires	Mekahli D et al, Cold Spring Harb Perspect Biol 2011
	Toth A et al, Cardiovasc Hematol Sisord Drug Targets 2007

Tableau 5 - Pathologies humaines auxquelles PUMA est associé ou dans lesquelles PUMA constitue une cible thérapeutique pertinente

La régulation de l'activité anti- ou pro-apoptotique des membres de la famille Bcl-2 peut ainsi également passer par le contrôle de leur expression via leur dégradation comme suggéré dans le cas de PUMA mais aussi de Mcl-1 (plus de détails plus loin) et plus largement dans le processus apoptotique (Vucic et al., 2011).

IV. UBIQUITINATION, LE DEBUT DE LA FIN

La demi-vie des protéines, qui s'étend de quelques minutes comme dans le cas du suppresseur de tumeur p53 (Maltzman & Czyzyk, 1984), à plusieurs jours comme pour l'actine et la myosine (Antecol, Darveau, Sonenberg, & Mukherjee, 1986; Kay, 1978; Morkin, Kimata, & Skillman, 1972), voire plusieurs dizaines d'années comme pour la cristalline exprimée par les cellules du cristallin, la lentille naturelle de l'œil (Toyama & Hetzer, 2013), et le contrôle de leur expression (dans l'espace et dans le temps) sont des paramètres clés dans la régulation de processus cellulaires importants, comme le cycle cellulaire par exemple (Casimiro, Crosariol, Loro, Li, & Pestell, 2012). La régulation de la dégradation sélective des protéines intracellulaires à large échelle qui consiste en l'hydrolyse des liaisons peptidiques et la libération d'acides aminés libres et réutilisables par la voie dépendante de l'ubiquitine, ou leur stabilisation, est essentielle à l'ajustement du contrôle de nombreuses voies de signalisation.

Les études pionnières de R Schoenheimer ont montré que les protéines cellulaires se renouvellent (Schoenheimer R. The dynamic state of body constituents. Harvard University Press, 1942). Avec la découverte du lysosome par C de Duve, un appareil protéolytique responsable de la dégradation de certaines protéines a été révélé (De Duve & Wattiaux, 1966). Cependant, ce mécanisme de dégradation, impliquant des parties limitées du cytosol qui contiennent un aliquote du protéome cytosolique, et correspondant à la microautophagie (voir I.B-3), ne pouvait pas expliquer la sélectivité du processus protéolytique conduisant à la dégradation de la majorité des protéines cellulaires. C'est en disséquant des extraits cellulaires de réticulocytes, cellules dépourvues de lysosomes, que A Ciechanover et al (récompensés d'un prix Nobel de chimie en 2004) ont caractérisé l'ubiquitine, baptisée alors APF-1 (ATP-dependant Proteolysis Factor 1) en référence à la dépendance de la dégradation protéique vis-à-vis de l'ATP (Ciechanover, Elias, Heller, Ferber, & Hershko, 1980; Ciechanover, Heller, Elias, Haas, & Hershko, 1980; Hershko, Ciechanover, Heller, Haas, & Rose, 1980; Hershko, Ciechanover, & Rose, 1979). Cette protéine de 76 acides aminés, dont l'expression est ubiquitaire et qui est très conservée, est un composant essentiel du système ubiquitine/protéasome (SUP ou UPS, Ubiquitin Proteasome System) qui dégrade 80 à 90% des protéines intracellulaires (Shen, Schmitt, Buac, & Dou, 2013).

La dégradation d'une protéine par l'intermédiaire de la voie ubiquitine/protéasome, implique deux étapes successives, 1) le marquage de la protéine à l'aide de la conjugaison de multiples

molécules d'ubiquitine au substrat, appelé ubiquitination et 2), la dégradation de cette protéine marquée par le complexe protéasome 26S. L'ubiquitination est ainsi une modification post-traductionnelle consistant en la liaison covalente d'une ou plusieurs molécule(s) d'ubiquitine sur une protéine cible. L' « arrimage » de l'ubiquitine à une protéine implique la formation d'une liaison isopeptidique entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et généralement un résidu lysine de cette dernière menant à une monoubiquitination (Figure 26a). Plusieurs résidus lysine sur la même protéine peuvent être liée à une molécule d'ubiquitine, conduisant à une multi-monoubiquitination (Figure 26b).
L'ancrage par la partie N-terminale via son résidu méthionine (M-1) ou la fixation de l'un des 7 résidus lysines (Lys-6, -11, -27, -29, -33, -48, -63) d'une molécule d'ubiquitine au niveau d'une ubiquitine préalablement liée au substrat, entraîne la formation d'une chaîne polymère, correspondant à une poly-ubiquitination.

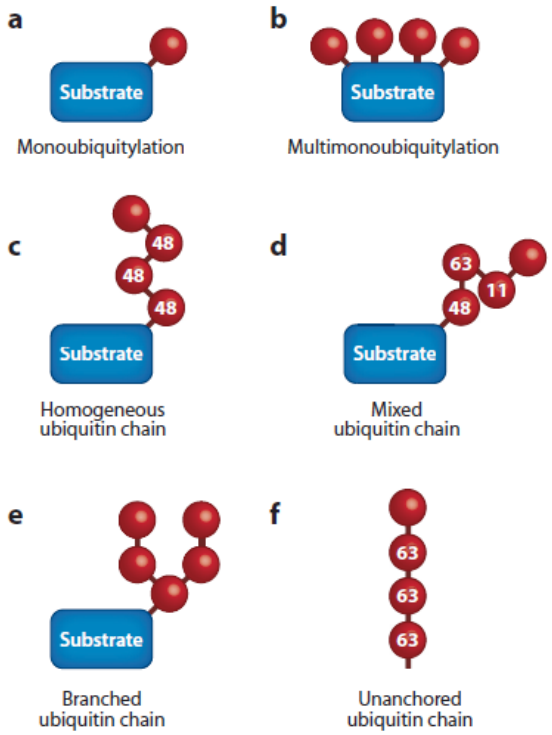


Figure 26 - Les différentes topologies de l'ubiquitination
Tiré de Komander D and Rape M, Annu Rev Biochem 2012

Les chaînes formées peuvent être courtes et ne contenir que 2 molécules d'ubiquitine, comme longues et en incorporer plus d'une dizaine. Les chaînes sont dites homogènes si le même résidu est utilisé au cours de l'élongation (Figure 26c) alors qu'elles ont une topologie mixte si des résidus de nature différente sont impliqués (Figure 26 d). Dans le cas où une seule

molécule d'ubiquitine donne naissance à plusieurs chaînes d'ubiquitine, la chaîne globale est dite branchée (Figure 26e).

L'ubiquitination n'est pas nécessairement un signal qui condamne la protéine la subissant à une dégradation par le protéasome. En effet, selon le résidu, Met ou Lys (l'une des 7 énumérées plus haut), impliqué dans la formation des chaînes de poly-ubiquitine, le destin de la protéine diffère (Figure 27). Ainsi, la mono-ubiquitination est impliquée dans le trafic cellulaire, l'endocytose ou encore les interactions protéine-protéine et les ubiquitinations de type K27 régulent l'activation de certaines kinases, notamment.

Les types d'ubiquitination les mieux caractérisés sont de type K48 et K63 où une molécule d'ubiquitine est liée par son résidu K48 ou K63 à la G76 en C-terminal de l'ubiquitine précédente, respectivement. Classiquement, une ubiquitination de type K48 conduit à une dégradation du substrat (Wilkinson, 2004), contrairement à une ubiquitination de type K63 qui est plutôt impliquée dans la régulation de voies de signalisation cellulaire (Z. J. Chen & Sun, 2009; Varadan et al., 2004).

Il est toutefois à noter qu'une thréonine, une cystéine ou une sérine, peut aussi servir de point d'ancrage pour l'ubiquitine dans certains cas (Kravtsova-Ivantsiv & Ciechanover, 2012).

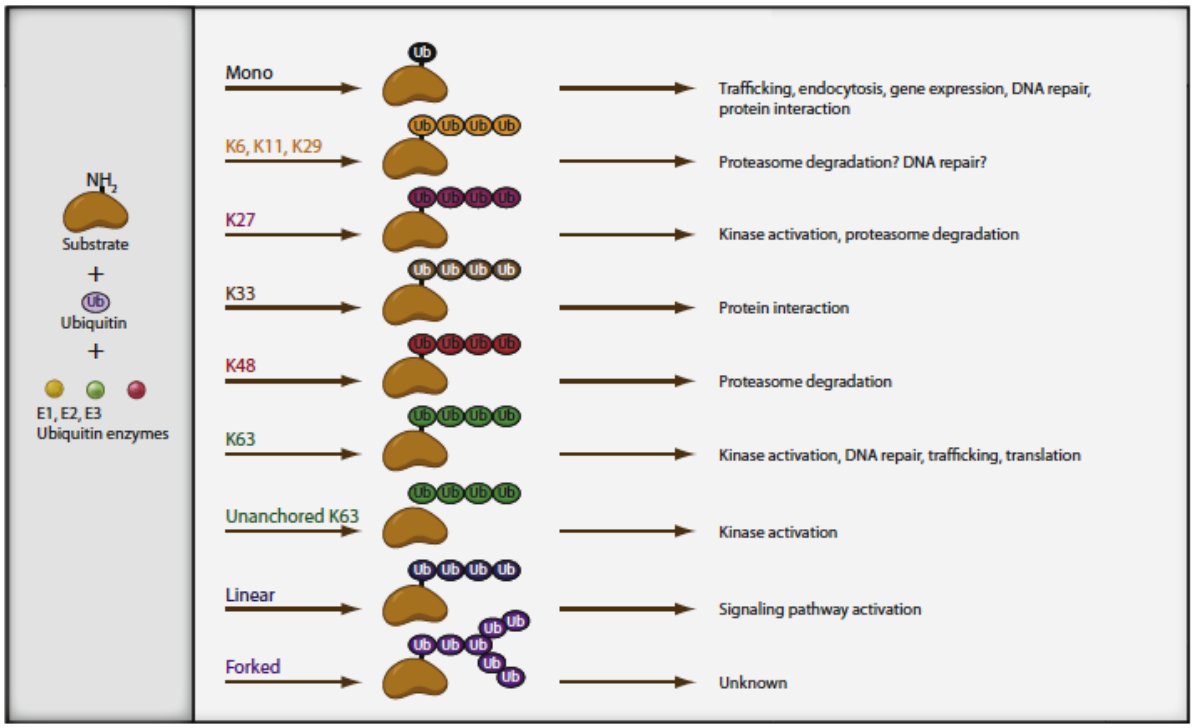


Figure 27 - Les différents types d'ubiquitination et leur conséquence sur le destin du substrat. Tiré de Malynn BA and Ma A, Immunity 2010

A - Le mécanisme, l'histoire d'une livraison

Typiquement, la protéolyse est un tango dansé par 2 molécules, une protéase et son substrat, comme c'est le cas des caspases par exemple (partie II.A). Dans le cadre du système ubiquitine/protéasome, la danse se joue entre une protéine, le substrat et un complexe multi-protéique, le protéasome. Pour entrer dans le bal, le substrat doit avoir sa carte d'invitation qui est sous la forme d'un marquage par plusieurs molécules d'ubiquitine. L'ancrage et l'élaboration d'une chaîne d'ubiquitine, s'apparente à la livraison d'un colis, faisant intervenir la collaboration de 3 enzymes caractéristiques: l'enzyme activatrice E1, l'enzyme de conjugaison E2 puis la ligase E3 (Pickart & Eddins, 2004) (Figure 28).

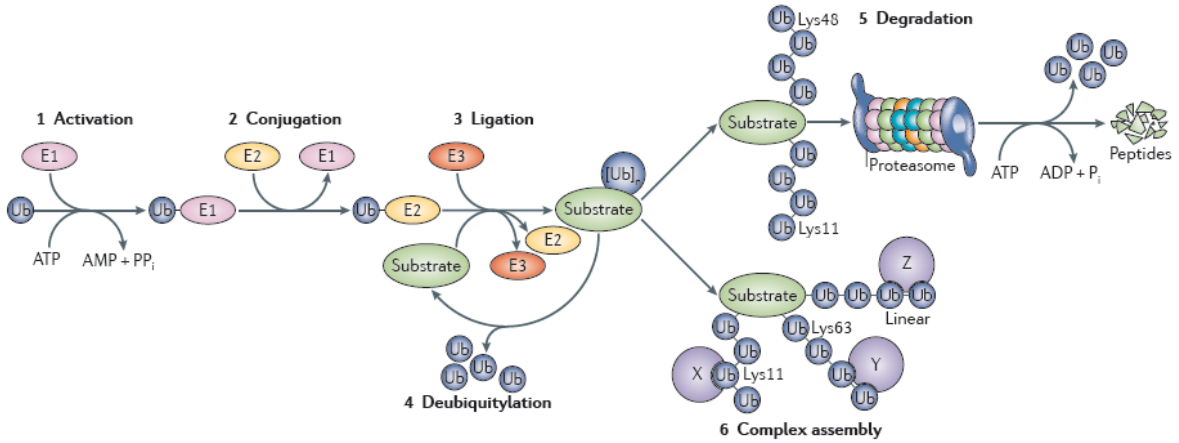


Figure 28 - Les enzymes et réactions du système ubiquitine/protéasome
Tiré de (Vucic, Dixit, & Wertz, 2011)

L'enzyme E1 (E1) doit d'abord activer l'ubiquitine en consommant de l'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée au membre suivant dans la cascade, l'E2 ou enzyme de conjugaison. Enfin, la ligase d'ubiquitine E3 (E3), interagit à la fois avec l'E2 liée à l'ubiquitine et la protéine substrat, contribuant à la livraison finale de l'ubiquitine à cette dernière. Chez les mammifères, cette logistique est assurée par seulement 2 membres de la famille des E1, UBA1 (UBiquitin-like modifier activating enzyme 1) et UBA6, nécessaires à l'étiquetage de l'intégralité des E2 avec la molécule d'ubiquitine. Les E2 qui sont approximativement 40, sont elles, suffisantes pour livrer l'ubiquitine à plus de 600 E3 connues (Deshaies & Joazeiro, 2009). Dans les cellules qui prolifèrent, globalement, toutes les molécules UBA1 (ainsi que plusieurs E2 testées), contrairement à UBA6 (environ 50%), sont chargées avec de l'ubiquitine (Jin, Li, Gygi, & Harper, 2007). Dans ce contexte, l'E1 peut ainsi être apparenté à un entrepôt dans lequel l'E2 vient se servir au cours du processus d'ubiquitination.

1/ L'enzyme d'activation E1, l'entrepôt

Les E1 sont des enzymes à multi-domaines qui doivent activer l'ubiquitine et la transférer de façon efficace à l'E2. Cette fonction est cruciale pour l'homéostasie cellulaire puisqu'un défaut dans l'activation de l'ubiquitine, comme l'inhibition chimique de l'activité de l'E1 dans la cellule entraîne un arrêt total et presque immédiat du SUP et culmine avec la mort cellulaire (Y. Yang et al., 2007).

Des travaux récents ont contribués à une meilleure compréhension des mécanismes d'activation et de transfert de l'ubiquitine de l'E1 vers l'E2, faisant de ceux-ci les mieux caractérisés du SUP (Olsen & Lima, 2013). La réaction catalysée par l'E1 implique de multiples événements moléculaires, dont l'adénylation dépendante de l'ATP du groupement carboxyl de l'ubiquitine, la formation d'une liaison thioester entre le résidu cystéine présent au sein du site catalytique de l'E1 et la glycine C-terminale de l'ubiquitine, puis le transfert de cette ubiquitine à la cystéine du site catalytique de l'E2.

Chaque E1 a la capacité de porter 2 molécules d'ubiquitine, une liée à son site actif et l'autre sous forme adénylée. Le transfert de la molécule d'ubiquitine à l'E2, libère le site actif de l'E1 formant une nouvelle liaison avec la deuxième molécule d'ubiquitine (Jin et al., 2007).

Les analyses de structure des E1 ont révélés que plusieurs changements de conformation intervenaient au cours du cycle de réaction, permettant une optimisation de l'affinité de l'enzyme E1 pour l'ubiquitine. Par exemple, des études structurales des E1 en présence d'ubiquitine adénylée ont montré des conformations dans lesquelles les distances entre le résidu cystéine de l'E1 qui forme la liaison thioester et l'ubiquitine étaient trop grandes pour que la réaction se produise (Lee & Schindelin, 2008), suggérant que des changements de conformation supplémentaires étaient nécessaires.

2/ L'enzyme de conjugaison E2, le livreur

L'enzyme E2 transporte le « cargo » ubiquitine puis, via son interaction avec l'E3, le livre au destinataire, la protéine substrat, dont l'ubiquitination va changer le destin, soit en induisant son élimination par le protéasome, soit au contraire, en entraînant son activation.

La famille des enzymes E2 est caractérisée par la présence d'un domaine de conjugaison à l'ubiquitine, UBC (UBiquitin-Conjugating), très conservé de 150 à 200 acides aminés, qui constitue son site actif et est nécessaire à son interaction avec l'E3 (Burroughs et al., 2008)

(Figure 29). Ce domaine accueille l'ubiquitine préalablement activée par l'ATP en formant une liaison thioester entre cette molécule d'ubiquitine et son résidu cystéine (Markson et al., 2009; Ravid & Hochstrasser, 2007). Les E2 fonctionnent via des interactions sélectives avec les enzymes E1 et E3 et font ainsi le pont entre l'activation de l'ubiquitine et sa liaison covalente au substrat, destinataire final.

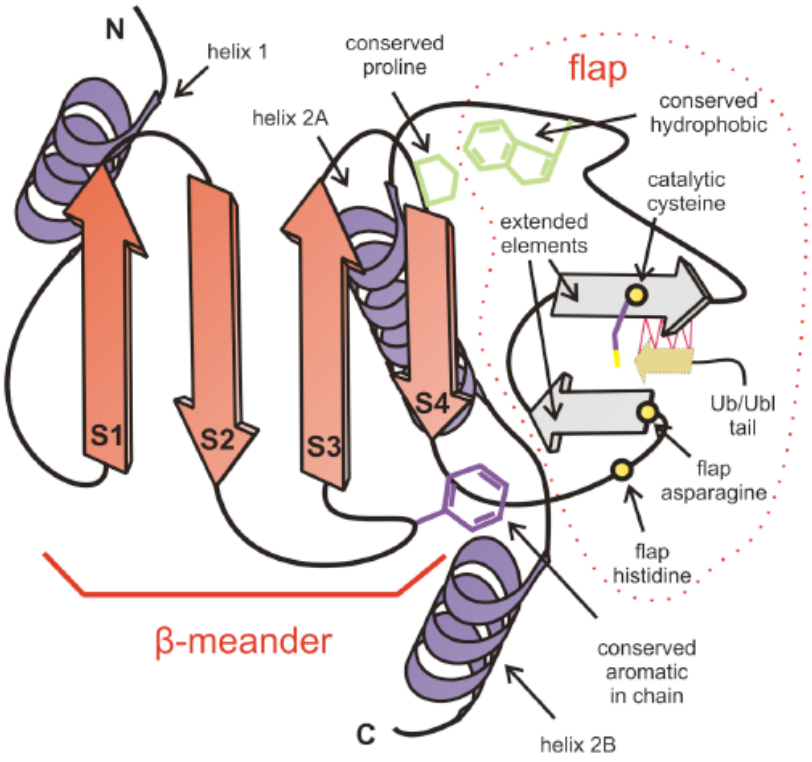


Figure 29- Structure de la protéine de conjugaison E2
Tiré de (Burroughs, Jaffee, Iyer, & Aravind, 2008)

Elles se distinguent aussi entre elles par leur impact sur le devenir du substrat. En effet, alors que les E3 sont impliquées dans la sélection de la protéine ubiquitinée, les E2 déterminent la lysine, parmi les 7 que contiennent les molécules d'ubiquitine, utilisée pour construire les chaînes d'ubiquitine, contrôlant ainsi directement le destin cellulaire du substrat (Christensen, Brzovic, & Klevit, 2007; Ye & Rape, 2009). Certaines E2 font preuve d'une grande flexibilité, leur permettant d'accueillir plusieurs substrats différents, conduisant à une mono-ubiquitination ou la production de chaînes courtes d'ubiquitine (initiation de chaîne). D'autres ne sont capables d'ajouter une molécule d'ubiquitine qu'à une autre molécule d'ubiquitine et sont donc destinées à l'élongation de chaînes d'ubiquitine d'un type particulier (K48 ou K63 par exemple) (Michelle, Vourc'h, Mignon, & Andres, 2009).

Chez l'Homme, la famille des E2 compte une quarantaine de membres dont 35 dédiées à la conjugaison de l'ubiquitine. Les E2 peuvent être classées en plusieurs groupes en fonction de

la présence d'extensions au niveau N et/ou C-terminal, régulant leur association avec les E3, leur activité intrinsèque ou encore la reconnaissance du substrat (Pickart, 2001). Ainsi, les E2 portant des extensions uniquement au niveau de leur partie N-terminale appartiennent à la classe II, contrairement à celles les portant au niveau C-terminal faisant partie de la classe III. De plus, les E2 peuvent ne pas porter d'extension du tout (Classe I) ou au niveau de ses deux extrémités (Classe IV) (Hofmann & Pickart, 2001; Winn, Religa, Battey, Banerjee, & Wade, 2004).
Lorsqu'elles sont associées à un sous-groupe particulier de la famille des E3, les E3 à domaine RING (voir plus loin), les E2 peuvent catalyser directement le transfert de l'ubiquitine au substrat ou sur les résidus lysine de molécules d'ubiquitine déjà attachées à la protéine cible, participant ainsi à la poly-ubiquitination de cette dernière.

Pour résumer, les E2, par leurs caractéristiques, portent une sélectivité sur le type de chaîne ajouté lors de l'ubiquitination alors que les E3 portent la sélectivité du substrat. Ces dernières peuvent donc être assimilées au GPS permettant au livreur de livrer le colis à la bonne adresse.

3/ Les ligases, le GPS

Le paramètre le plus remarquable dans le système ubiquitine/protéasome est l'extrême diversité de ses substrats. Ce paramètre, qui explique l'étendue des fonctions biologiques de l'ubiquitine, est un reflet direct du nombre important d'E3 ligases codées par le génome humain, environ 700, un nombre supérieur à celui de l'intégralité des kinases (Hershko & Ciechanover, 1998).
Les E3 sont responsables de la reconnaissance spécifique de la multitude de substrats du système ubiquitine. Une E3 est une protéine ou un complexe protéique capable de fixer à la fois l'E2 portant l'ubiquitine activée et le substrat. Les E3 permettent ainsi de faire le lien entre l'E2 et la protéine cible (Hershko, Heller, Elias, & Ciechanover, 1983) pour permettre l'ubiquitination de cette dernière.
La réaction catalysée par l'E3 nécessite au moins 2 étapes distinctes, 1) sa fixation au substrat suite à un signal d'ubiquitination et 2) la formation d'une liaison covalente entre le substrat et une ou plusieurs molécules d'ubiquitine.

L'ubiquitination est souvent induite par des stimuli extracellulaires comme le TNF (Walczak, 2011) par exemple, et généralement, les substrats ne sont pas fixés de manière constitutive. Ainsi, l'activité du système ubiquitine est à la fois rapidement et finement régulée via la stimulation ou l'inhibition de la reconnaissance du substrat et/ou la modulation de son activité catalytique (Gao & Karin, 2005). Cette régulation peut se faire par l'intermédiaire du contrôle de la localisation subcellulaire de l'E3 ou de ses substrats, ou via la fixation d'une protéine auxiliaire. Dans le cas de la signalisation du TGF-β, Smad7 joue le rôle d'un adaptateur et recrute les E3 Smurf au niveau du récepteur (Izzi & Attisano, 2004). De plus, Smad7 est capable de stimuler l'activité catalytique de Smurf2 en recrutant et en positionnant ainsi l'E2 UbcH7 à proximité (Ogunjimi et al., 2005). Les protéines accessoires peuvent aussi avoir une fonction inhibitrice, comme le suppresseur de tumeur ARF qui bloque l'activité de l'E3 mdm2, entraînant la stabilisation de p53 (Honda & Yasuda, 1999). Des modifications post-traductionnelles du substrat ou d'un composant de la machinerie d'ubiquitination peuvent aussi réguler l'activité de l'E3. Ainsi, elles peuvent être elle-même ubiquitinées, comme mdm2 par exemple (Fang, Jensen, Ludwig, Vousden, & Weissman, 2000) ou phosphorylées (Gao & Karin, 2005), comme cela a été montré pour certaines E2 (Lorick et al., 1999).
Ces modifications post-traductionnelles touchent un large nombre d'E3, qui sont classées en fonction de la nature de leur domaine catalytique.

B - Les différentes familles de ligases d'ubiquitine (E3), une active, l'autre réactive

Deux sous-groupes principaux composent la famille des E3. Ces deux sous-groupes diffèrent par la nature de leur domaine catalytique qui gouverne leur mode de transfert de l'ubiquitine au substrat. La famille des ligases à domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) (Rotin & Kumar, 2009) prend directement en charge le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible et peut donc être qualifiée d' « active » alors que la famille RING (Really Interesting New Gene) (Deshaies & Joazeiro, 2009) catalyse le transfert de l'ubiquitine de l'E2 au substrat et peut par conséquent être considérée comme plutôt « réactive ».

1/ La famille des ligases à domaine HECT, les maçons

Chez les mammifères, cette famille d'E3 compte environ 30 membres et est la première à avoir été caractérisée. Le membre fondateur de cette famille est E6-AP (E6-Associated Protein), détournée par la protéine E6 codée par le papillomavirus (HPV), pour ubiquitiner (Hengstermann, Linares, Ciechanover, Whitaker, & Scheffner, 2001; Huibregtse, Scheffner, & Howley, 1993) et déclencher la dégradation de p53, contribuant ainsi au développement de cancers (Huibregtse & Beaudenon, 1996).

Parmi leurs nombreuses fonctions, les E3 à domaine HECT jouent un rôle important dans le trafic des protéines, la réponse immune et dans différentes voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire (Rotin & Kumar, 2009), notamment. Le domaine conservé HECT, qui comprend approximativement 350 acides aminés, est localisé au niveau C-terminal de ces enzymes, alors qu'en N-terminal, elles expriment des domaines divers, impliqués dans la reconnaissance de la protéine cible (Huibregtse, Scheffner, Beaudenon, & Howley, 1995). Ainsi, l'E3 à domaine HECT est bilobée, consistant en un lobe en N-terminal (lobe N) qui interagit avec l'E2 et un lobe en C-terminal (lobe C) qui contient la cystéine impliquée dans la liaison thioester avec l'ubiquitine, formant une structure en forme de « U » (L. Huang et al., 1999). La spécificité portant sur le type de chaîne d'ubiquitine ancré au niveau de la lysine du substrat semble dépendre des 60 derniers acides aminés du lobe C du domaine HECT (H. C. Kim & Huibregtse, 2009).

Les E3 à domaine HECT emploient un mécanisme particulier pour catalyser l'ubiquitination de leurs substrats. En effet, elles forment un intermédiaire thioester avec l'ubiquitine activée, préalablement portée par l'E2 (Scheffner, Nuber, & Huibregtse, 1995), constituant ainsi le « terminus » où l'ubiquitine quitte le système (Figure 30).

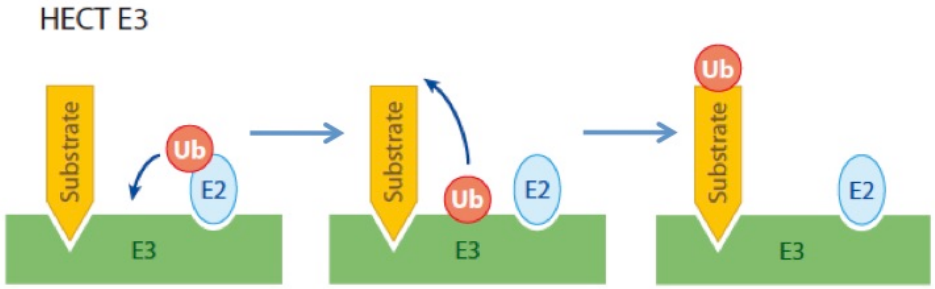


Figure 30 - Mécanisme de fonctionnement des E3 à domaine HECT
D'après (Deshaies & Joazeiro, 2009)

Ce mécanisme est différent de celui mis en œuvre par la deuxième grande famille d'E3 qui compose le système ubiquitine/protéasome, les E3 à domaine RING.

2/ La famille des ligases à domaine RING, les architectes

Le génome des mammifères code pour plus de 600 E3 à domaine RING potentielles (W. Li et al., 2008), qui constituent le groupe le plus large au sein des E3. Un domaine RING canonique coordonne 2 atomes de ZN^{2+} à l'intérieur d'une série de résidus cystéine et histidine espacés de manière spécifique au sein d'un domaine catalytique conservé de 40 à 60 résidus et facilite l'ubiquitination dépendante de l'E2 (Lorick et al., 1999) (Figure 31). Ainsi, contrairement aux E3 à domaine HECT, les E3 à domaine RING, ne forment pas d'intermédiaire catalytique avec l'ubiquitine. En effet, elles servent de plateforme permettant de rapprocher l'E2 et le substrat (Figure 32). Dans ce groupe, l'E2 constitue le « terminus » du système et non l'E3. De plus, au moins une étude suggère que les E3 à domaine RING peuvent activer de façon allostérique les E2 (Ozkan, Yu, & Deisenhofer, 2005). Les membres de la famille des E3 à domaine RING peuvent fonctionner sous forme de monomères, de dimères ou de complexes formés de plusieurs sous-unités. La dimérisation se fait généralement par l'intermédiaire du domaine RING ou des régions l'encadrant et s'accompagne de la formation d'homodimères, comme dans le cas de TRAF2 par exemple (Y. C. Park, Burkitt, Villa, Tong, & Wu, 1999) ou d'hétérodimères, comme mdm2 (Sharp, Kratowicz, Sank, & George, 1999). Pour les hétérodimères, un domaine RING (MDMX, par exemple) est souvent dépourvu d'activité ligase et peut aider à la bonne conformation et/ou stabiliser le domaine RING actif fixant l'E2.

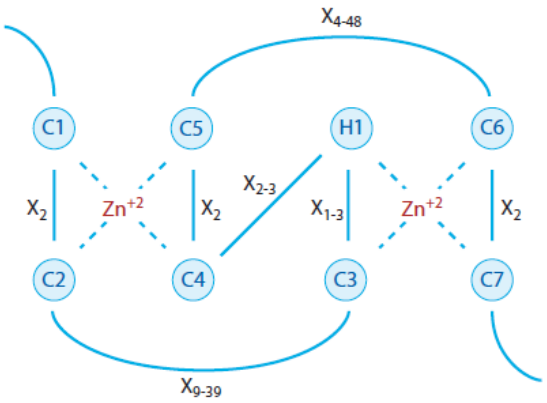


Figure 31 - Séquence primaire du domaine RING
Tiré de (Deshaies & Joazeiro, 2009)

Les protéines de cette famille, par l'intermédiaire d'une activation ou d'une inhibition « inappropriées », sont impliquées dans la dérégulation de multiples processus cellulaires ainsi que dans le développement de nombreuses maladies, dont le cancer (Sun, 2006).

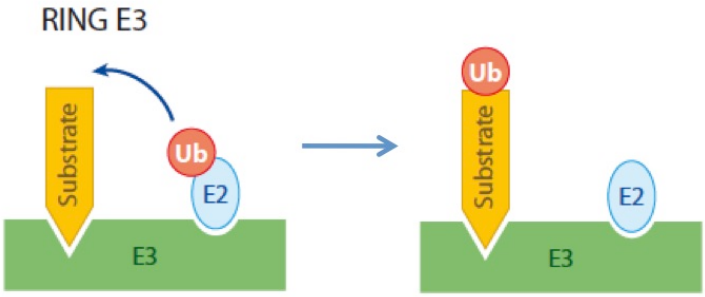


Figure 32 - Mécanisme de fonctionnement des E3 à domaine RING
D'après (Deshaies RJ and Joazeiro CAP, Annu Rev Biochem 2009)

Globalement, le rôle des E3 à domaine HECT ou RING, bien que le mécanisme soit différent, est de contribuer à l'ubiquitination de la protéine cible à la suite d'un stimulus. Cependant, comme c'est le cas de la phosphorylation, mise en balance avec la déphosphorylation, l'ubiquitination est un processus réversible. En effet, les liaisons isopeptidiques entre les molécules d'ubiquitine au sein des chaînes poly-ubiquitine ou entre l'ubiquitine et la protéine cible peuvent être hydrolysées par d'autres enzymes, les déubiquitine ligase ou déubiquitinases (DUB).

C - La déubiquitination, l'antagoniste

Le système ubiquitine/protéasome est fermement établit comme un régulateur général de la fonction cellulaire chez les eucaryotes (Finley, Ciechanover, & Varshavsky, 2004). L' « étiquetage » des protéines avec le polypeptide de 76 acides aminés, ubiquitine, outre le fait de constituer un signal pour la dégradation protéique, est une modification post-traductionnelle réversible utilisée pour réguler l'activité enzymatique ou les interactions protéine-protéine de ses substrats. Les DUB constituent une famille d'une centaine d'enzymes qui contrôlent le flux cellulaire d'ubiquitine en l'excisant des protéines substrat (Nijman et al., 2005). Elles se distinguent par leur mécanisme et la structure de leur domaine catalytique (Husnjak & Dikic, 2012; Reyes-Turcu, Ventii, & Wilkinson, 2009).

1/ Les différentes familles de DUB, faire la même chose de manière différente

Il existe 2 niveaux de classification des DUBs. Elles sont tout d'abord classées en 2 groupes principaux selon leur mécanisme catalytique. Ainsi, les protéases à cystéine et les métalloprotéases constituent les deux grandes familles de DUBs. La famille des protéases à cystéine, qui sont des protéines dont l'activité enzymatique repose sur une triade d'acides aminés catalytiques, cystéine, histidine et asparagine, commune avec les protéases à cystéine classiques, comme la papaïne (Storer & Menard, 1994), se décompose en 5 sous-groupes distincts : les USPs (Ubiquitin Specific proteases), les UCHs (Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase), les OTUs (Ovarian TUmor proteases), les MJDs (Machado-Josephin Domain proteases) et les MCPIPs (Monocyte Chemotactic Protein-Induced Proteases). La classe des métalloprotéases ne contient quant à elle que le seul groupe des protéases JAMM (JAb1/Mov34/Mpr1) (Figure 33).

a) Les DUBs à cystéine

Les USPs constituent le groupe le plus large décrit à ce jour avec 53 membres. Elles ont toutes des domaines USP très conservés en terme de structure, en dépit de séquences diverses, formant 3 sous-domaines ressemblant à la paume, le pouce et les doigts d'une main droite (Hu et al., 2002). Le site catalytique est localisé entre les deux premiers sous-domaines alors que le troisième est responsable des interactions avec l'ubiquitine. Elles sont caractérisées par 2 motifs courts et conservés, les boîtes histidine et cystéine, impliqués dans la protéolyse de l'ubiquitine. Seul CYLD (CYLinDromatosis D), une DUB impliquée dans le développement de la cylindromatose, une tumeur de la peau et la signalisation NFκB, est dépourvue du troisième domaine. De plus, plusieurs USPs ont des domaines additionnels et des extensions terminales qui jouent un rôle important dans leur activité et leur spécificité (Quesada et al., 2004). La fixation de l'ubiquitine entraîne un changement de conformation responsable de l'activation spécifique de ces protéases (Ye, Scheel, Hofmann, & Komander, 2009).

Les UCHs, au nombre de 4 chez l'Homme, constituent la première famille de DUBs dont la structure a été caractérisée. Les cibles de ces enzymes sont uniquement des petits peptides car elles possèdent une boucle exigüe qui empêche la catalyse des longues chaînes de

polyubiquitine. L'extension présente en C-terminal dans la protéase UCHL5 facilite l'excision de l'ubiquitine de ses substrats.

Les protéases à domaine OTU ont d'abord été identifiées par une approche bioinformatique à partir de tumeurs au niveau ovarien chez *Drosophila melanogaster* (Makarova, Aravind, & Koonin, 2000). En 2003, des membres de la famille des OTU ont ensuite été décrits comme des DUBs ayant un site actif à cystéine mais pas d'homolgie de séquence avec les autres DUB décrites à l'époque (Balakirev, Tcherniuk, Jaquinod, & Chroboczek, 2003). Les OTUs, possèdent des résidus asparagine et histidine en plus du résidu cystéine au sein de leur site catalytique actif de manière constitutive, contrairement aux USPs, leur conférant leur spécificité. Quatorze OTUs ont été décrites chez l'Homme jusqu'ici.

La famille des MJDs est composée de 4 membres différents dont l'ataxine-3 (ATXN3) qui est mutée dans l'ataxie spinocerébelleuse ou maladie de Machado-Joseph dont elle tire le nom (Nicastro et al., 2005). Cette protéine fonctionne comme une enzyme d'édition des chaînes de polyubiquitine, contrôlant le repliement et la stabilité de la protéinee cible (Mao et al., 2005). Toutes les MJD possèdent une cystéine et 2 résidus histidine qui sont très conservés et forment une triade catalytique.

Les DUB du groupe des isopeptidases s'est récemment élargi après la description d'un nouveau domaine à activité de déubiquitination dans la protéine MCPIP1 (Liang et al., 2010), portant le nombre de familles au sein des DUB à 6 dans le génome humain. MCPIP1 contient un domaine fonctionnel associé à l'ubiquitine au niveau de sa partie N-terminale régulant son interaction avec les protéines ubiquitinées, un domaine conservé CCCH de type doigt de zinc dans sa région centrale et un domaine riche en prolines en C-terminal. La région conservée en N-terminal ainsi que le doigt de zinc CCCH sont importants pour l'activité catalytique de MCPIP1, gouvernée par les boîtes cystéine et asparagine caractéristiques des protéases à cystéine.

b) Les métalloprotéases

Les JAMMs forment la seule famille de DUBs à activité métalloprotéase à Zn^{2+}. Leur mécanisme catalytique a été élucidé grâce à l'étude de la structure de AMSH-LP (Associated Molecule with SH3 domain-Like Protease), seule ou en complexe avec une chaîne de 2 ubiquitines liées en K63 (Sato et al., 2008). Les membres de la famille des ASMH-LP clivent spécifiquement les chaînes de polyubiquitine liées en K63, facilitant ainsi le trafic des

vésicules et le recyclage des récepteurs (Clague & Urbe, 2006; Hicke & Dunn, 2003). En plus de AMSH-LP, le génome humain code pour 11 autres protéines JAMM dont 5 sont inactives alors que les 6 autres ont une activité isopeptidase pour l'ubiquitine. Le haut degré de conservation de séquence au sein de cette famille, suggère l'existence d'une stratégie commune pour la reconnaissance de l'ubiquitine et la catalyse des chaînes d'ubiquitine.

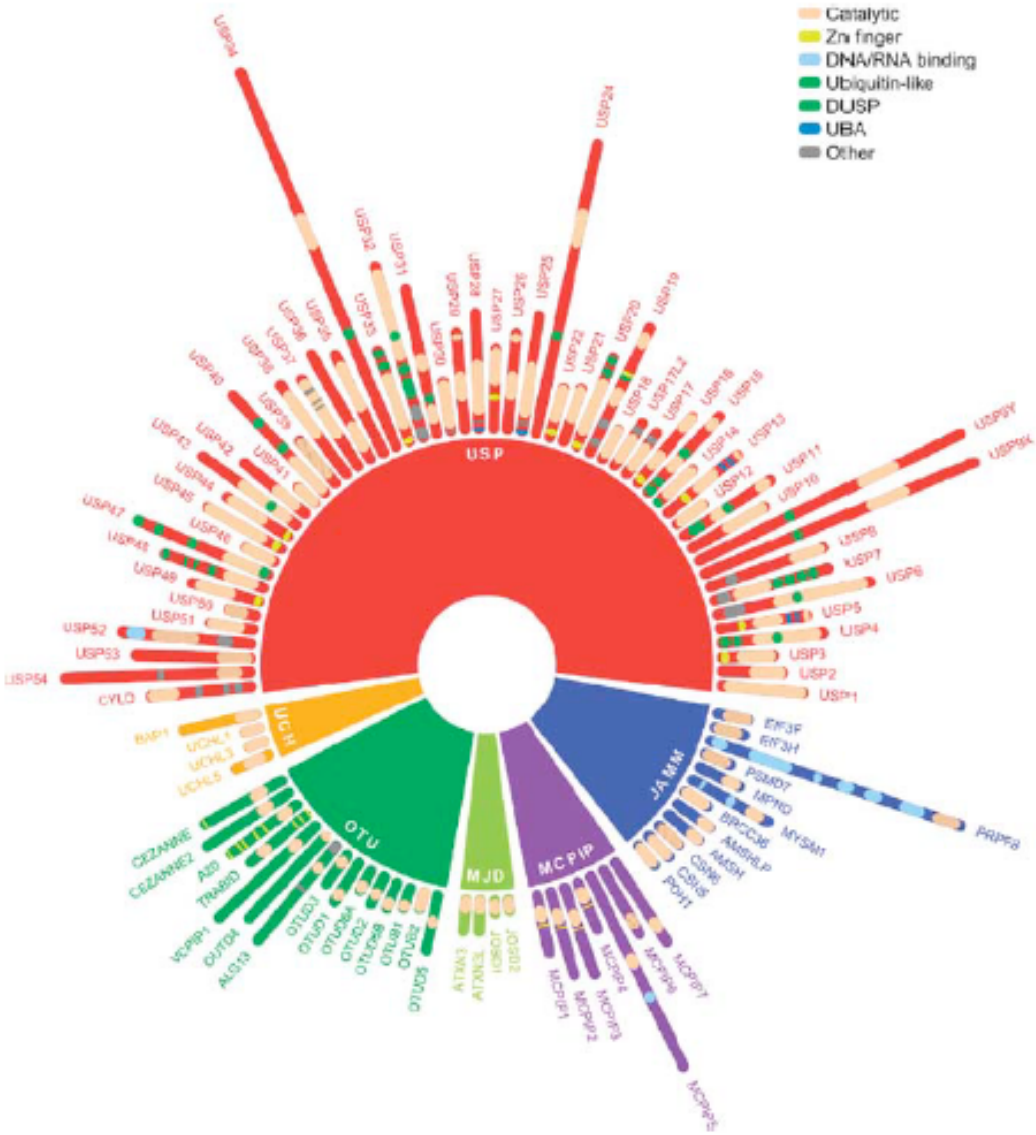


Figure 33 - Classification des DUBs
Tiré de Fraile JM et al, Oncogene 2012

Le mécanisme qui détermine la spécifité de chaque classe de DUB n'a pas été totalement élucidé. Cependant, des analyses fonctionnelles et structurales suggèrent que les USPs et les OTU sont spécifiques de chaînes de type K48, K63 et K11 alors que les MJDs et les JAMMs ne clivent que les chaînes de type K63 (Harhaj & Dixit, 2012).

Cette spécificité dans la reconnaissance des chaînes clivables par les différentes familles de DUB, fait que celles-ci sont impliquées dans des voies de signalisations différentes et leur confère des rôles particuliers.

2/ Leur rôle, défaire pour reconstruire

L'expression des DUBs est régulée dans le temps et dans l'espace. Ainsi, leur localisation subcellulaire varie et est en rapport avec leur fonction essentielle dans les différents processus cellulaires (Figure 34). Ces protéases sont impliquées dans la maturation de l'ubiquitine, l'édition des chaînes d'ubiquitine, le désassemblage des oligomères d'ubiquitine et le traffic des protéines, notamment (Amerik & Hochstrasser, 2004). En effet, les DUBs participent à la maturation des molécules d'ubiquitine qui sont synthétisées sous forme de précurseurs associés à certaines protéines ribosomales dont elles doivent être dissociées pour être utilisable par le système ubiquitine/protéasome, cela permet ainsi de réguler le pool d'ubiquitine libre pouvant participer à l'assemblage des chaînes de polyubiquitine. De plus, la déubiquitination est cruciale pour le recyclage de l'ubiquitine et l'initiation du processus de dégradation protéique par le protéasome qui nécessite le clivage préalable de l'étiquette d'ubiquitine.

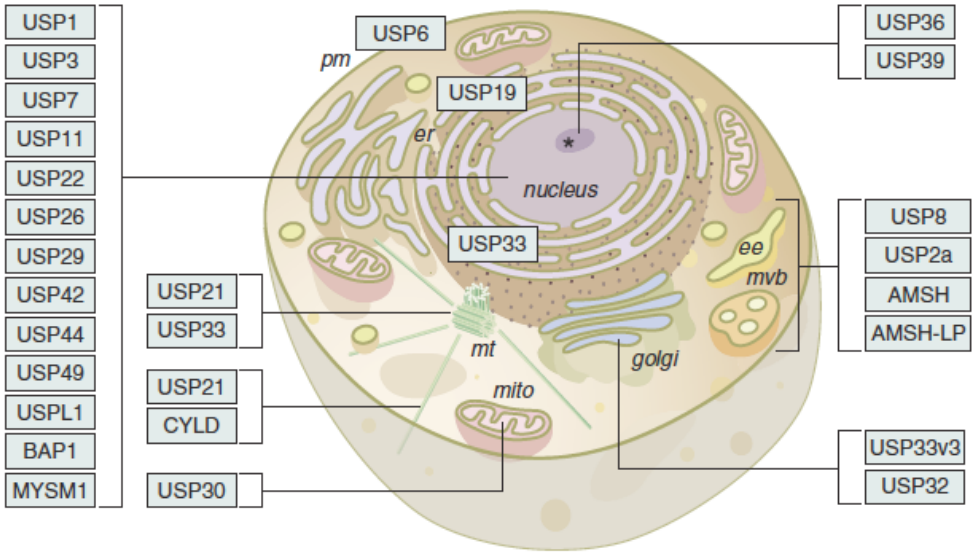


Figure 34 - Localisation subcellulaire des DUBs
Tiré de (Clague et al., 2013)

Il a aussi été montré que déubiquitiner des protéines « étiquetées » en réduisant le polymère de topologie K48 à moins de la longueur critique de 4 molécules d'ubiquitine permet

d'inhiber leur dégradation par le protéasome (Thrower, Hoffman, Rechsteiner, & Pickart, 2000). De plus, certaines DUB sont associées au protéasome 26S et leur activité est nécessaire à son fonctionnement optimal. Elles y assurent 2 fonctions distinctes, elles sont impliquées dans la régulation de l'ouverture de la porte du protéasome ainsi que dans le clivage des chaînes d'ubiquitine avant le dépliement de la protéine à dégrader. Les DUBs permettent aussi de maintenir l'activité du protéasome de façon indirecte en clivant les oligomères d'ubiquitine libres, capables d'entrer en compétition avec des protéines portant une ubiquitination et par conséquent, inhiber son activité et la dégradation protéique. Enfin, l'activité déubiquitinase des DUBs peut permettre de contrôler l'état d'activation de certaines voies de signalisation en régulant de manière spécifique le niveau d'ubiquitination des protéines impliquées dans la transduction du signal (Fraile et al., 2012) (Figure 35).

Comme les autres enzymes, l'activité des DUBs est très finement régulée afin de prévenir une inhibition incontrôlée et inaproppriée de la dégradation protéique. Ainsi, la majorité des DUBs, notamment les USPs et les UCHs, sont inactive jusqu'à leur interaction avec l'ubiquitine, induisant un changement conformationnel, leur conférant une activité catalytique. Des niveaux de régulation supplémentaires peuvent être mis en jeu pour contrôler leur activité catalytique, comme une régulation de leur expression via leur transcription ou encore des modifications post-traductionnelles affectant leur activation comme leur localisation (Eletr & Wilkinson, 2014; Harhaj & Dixit, 2011).

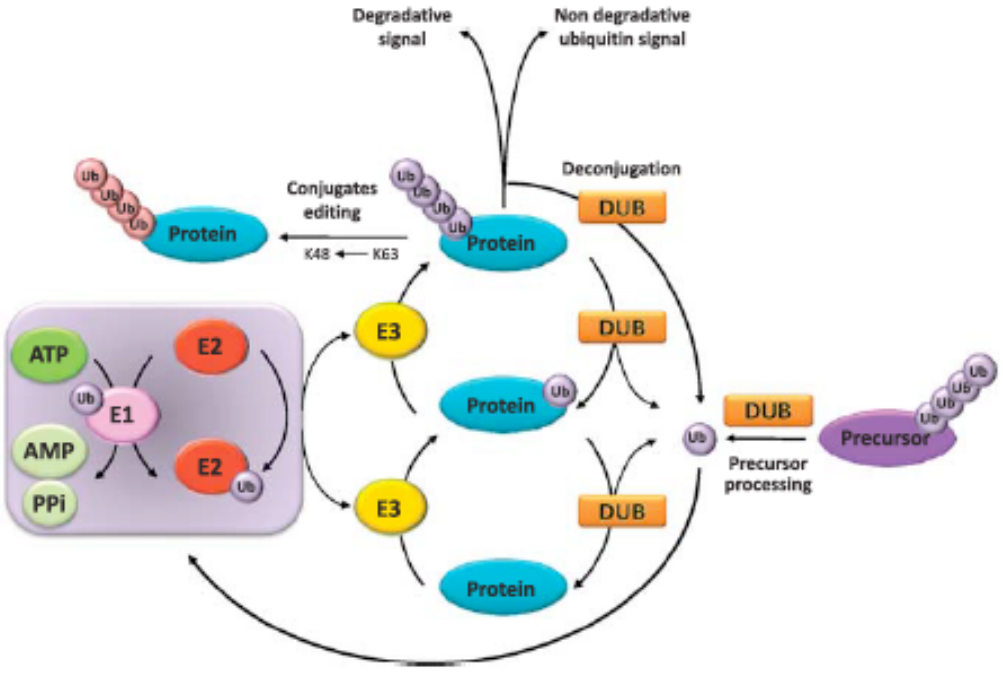


Figure 35 - Les fonctions cellulaires des DUBs
Tiré de (Fraile, Quesada, Rodriguez, Freije, & Lopez-Otin, 2012)

Une dérégulation de l'activité des DUBs est associée au développement de certaines maladies humaines comme le cancer (Lim & Baek, 2013).

Comme vu précédemment (partie I.C-2), l'une des caractéristiques importantes des cellules cancéreuse est l'inhibition des voies apoptotiques. Cette inhibition peut se faire soit indirectement, via l'inactivation de protéines impliquées dans les voies de transduction en amont de l'initiation de l'apoptose, comme c'est le cas de p53 dans la réponse à un stress génotoxique par exemple, soit directement, en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques ou en augmentant celle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Mcl-1. La régulation de l'expression de ces protéines se fait au niveau transcriptionnel suite à l'activation de facteurs de transcription spécifiques en réponse à un stress, mais aussi au niveau post-traductionnel via leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome. Ainsi, le système ubiquitine/protéasome joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose.

D - La régulation de l'apoptose par le processus d'ubiquitination, ajuster le thermostat

Selon le type de cellule (type I ou type II) et selon le type de signal apoptotique (extrinsèque ou intrinsèque), 2 événements caractéristiques peuvent se produire au sein de la cellule pour culminer à la mort cellulaire : l'activation des caspases et la libération du cytochrome c dans le cytosol, contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Ces 2 événements, scellant le sort de la cellule, sont sous haute surveillance pour prévénir un suicide cellulaire « inutile » ou au contraire, pour assurer la mort de la cellule quand le contexte l'exige. L'un des processus en charge de cette régulation de la balance mort/survie, en contrôlant le seuil d'activation de ces 2 événements est le système ubiquitine/protéasome, à travers l'activité des protéines IAP notamment. En effet, XIAP, qui est l'IAP la mieux caractérisée, est un inhibiteur direct des caspases, alors que d'autres IAP telles que DIAP1/2 (*Drosophila* IAP 1/2) ou cIAP1/2 ne sont pas capables d'inhiber l'activité des caspases *in vitro* (Eckelman & Salvesen, 2006). Bien que le domaine RING de XIAP ne soit pas indispensable à l'inhibition des caspases *in vitro* ou lorsqu'elle est surexprimée (Shi, 2002), la situation semble être différente dans des conditions physiologiques normales. En effet, des travaux réalisés par Schile AJ et al (Schile, Garcia-Fernandez, & Steller, 2008) montrent que la délétion du domaine RING de XIAP, sensibilise les fibroblastes à la mort induite par le TNFα et que le niveau d'apoptose est plus

important dans un modèle de lymphome Eμ-Myc chez la souris. De plus, XIAP est capable d'ubiquitiner la caspase-9 (Morizane, Honda, Fukami, & Yasuda, 2005).

L'inhibition de l'apoptose peut aussi passer par la dégradation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou la stabilisation des anti-apoptotiques.

L'expression et donc l'activité de plusieurs BH3-only a été rapporté comme étant régulée par leur dégradation par le protéasome. Ainsi, des travaux suggèrent que la dégradation de Bim et de PUMA peut être induite par leur phosphrylation par les kinases Erk1/2 et IKK, respectivement ((Luciano et al., 2003; Mouhamad et al., 2004) et (Sandow et al., 2012)). Trois E3 sont capables d'ubiquitiner Bim et d'induire sa dégradation suite à un signal de survie. En effet, l'E3 β-TrCP (β-Transducin Repeats-Containing Proteins) est capable d'ubiquitiner Bim, une fois phosphorylé par la kinase Aurora A au cours de la mitose (Moustafa-Kamal, Gamache, Lu, Li, & Teodoro, 2013). Une autre E3, TRIM2, est elle aussi impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation de Bim mais dans ce cas, elle fait suite à sa phosphorylation par les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) p42/p44 (Erk1/2) (S. Thompson et al., 2011). La dernière E3 décrite, est la ligase APC^{cdc20}, qui ubiquitinyle et contribue à dégrader Bim au cours de la mitose (Wan et al., 2014). Il est à noter qu'il a été rapporté que Bim pouvait aussi être dégradé par le potéasome 20S en absence d'ubiquitination, suggérant que l'ubiquitination de Bim n'est pas nécessaire à sa dégradation par le protéasome mais peut l'induire suite à des stimuli spécifiques.

L'expression de certaines protéines anti-apoptotiques est aussi soumise à la régulation par le système ubiquitine/protéasome, comme Bcl-2 par exemple. Il a d'ailleurs été montré que le complexe Cul3-Rbx1 est responsable de l'ubiquitination de Bcl-2 sur la lysine 17. Ce complexe est recruté par l'intermédiaire de la protéine INrF2 (cytosolic Inhibitor of NF-E2 Related Factor 2) qui interagit avec le domaine BH2 de Bcl-2 via son domaine DGR. La phosphorylation de Bcl-2 au niveau de sa sérine 70 est alors nécessaire à la rupture de cette interaction (Niture & Jaiswal, 2011).

La protéine anti-apoptotique dont l'ubiquitination ainsi que les E3 associées ont été le plus étudié est la protéine Mcl-1.

1/ Régulation de l'expression de Mcl-1 par les E3, les fossoyeurs

La protéine anti-apoptotique Mcl-1, largement exprimée dans de nombreux tissus (Krajewski et al., 1995), fait partie des protéines surexprimées dans les cancers (voir partie III.D-2) et

l'augmentation de son expression peut induire une résistance des cellules cancéreuses à des traitements potentiels comme l'ABT, un mimétique BH3 antagoniste des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w (Yecies, Carlson, Deng, & Letai, 2010).

Son temps de demi-vie, comme celui de son ARNm (T. Yang et al., 1996), est très court, trahissant une régulation extrêmement fine de son expression par la cellule. Suite à une stimulation de la cellule par des cytokines (IL-3, -5, -6, …), le niveau de transcription de Mcl-1 est rapidement augmenté via l'activation de STAT3 notamment (Bhattacharya, Ray, & Johnson, 2005). A l'inverse, dans des conditions de stress ou suite à un signal apoptotique tel que l'inhibition de la protéine kinase Syk dans la lignée cellulaire BL(Burkitt's Lymphoma)41 (résultats non publiés d'une étudiante actuellement en thèse dans notre équipe) ou des dommages à l'ADN, le taux de transcription de Mcl-1 chute de manière dramatique et sa dégradation par le protéasome entraîne une diminution importante de son expression, menant à l'apoptose.

Bien qu'une équipe ait montré que la protéine Mcl-1 pouvait être dégradée par le protéasome en absence d'ubiquitination, suite à la mutation de toutes ses lysines (Stewart et al., 2010), de nombreux travaux suggèrent que l'ubiquitination de Mcl-1 par différentes E3 joue un rôle important dans la régulation de son expression suite à des stimuli spécifiques. Ainsi, 5 lysines de Mcl-1, engagées dans une liaison avec des chaînes d'ubiquitine ont été identifiées, les lysines 5, 40, 136, 194 et 197. De plus, la fixation de Mcl-1 par ses E3 ligases, son ubiquitination et sa dégradation, peuvent être régulés par son interaction avec certains BH3-only. Ainsi, l'interaction de Bim avec Mcl-1 contribue à protéger ce dernier (Wuilleme-Toumi et al., 2007), alors que son interaction avec Noxa induit sa dégradation par le protéasome (Gomez-Bougie et al., 2011) et que celle avec PUMA ne suffit pas à prévenir sa dégradation (Mei, Du, Yang, & Wu, 2005).

Sa polyubiquitination par des chaînes de topologie K48 ou plus récemment, par des chaînes de types K63, est responsable de sa dégradation par le protéasome ou de sa stabilisation, respectivement.

a) E3s impliquées dans l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 via son ubiquititnation de type K48 (Figure 36), le baiser d'adieu.

Six E3 ont été identifiées comme étant directement responsables de l'ubiquitination de Mcl-1, l'une capable de catalyser l'ubiquitination de Mcl-1 dans sa forme native, MULE (Mcl-1

Ubiquitin Ligase E3) (Zhong, Gao, Du, & Wang, 2005) aussi connu sous le nom ARF-BP1 (ARF-Binding Protein 1) ou HUWE1 (HECT, UBA, WWE domain containing 1) alors qu'un signal, sous la forme de la phosphorylation de Mcl-1 est nécessaire pour la fixation et l'ubiquitination de Mcl-1 par β-TrCP (Ding et al., 2007), FBW7 (F-Box and WD repeat domain-containing 7) (Inuzuka et al., 2011), Cdc20 (Harley, Allan, Sanderson, & Clarke, 2010), TRIM17 (TRIpartite Motif containing 17), aussi connu sous le nom Terf (TEstis RING Finger protein) (Magiera et al., 2013) et enfin PARKIN (Carroll, Hollville, & Martin, 2014).

- Mule

C'est en utilisant une approche de fractionnement biochimique classique que Mule a été identifiée comme la première E3 responsable de l'ubiquitination et de la dégradation de Mcl-1. Mule est une protéine de haut poids moléculaire (environ 500 kDa), qui en plus de son domaine HECT indispensable à son activité E3 ligase, possède un domaine BH3, domaine nécessaire aux interactions protéine-protéine au sein de la famille Bcl-2. Zhong et al, ainsi qu'une autre équipe, ont montré que ce domaine est nécessaire à son associtation spécifique avec Mcl-1 (Warr et al., 2005; Zhong et al., 2005). La diminution de l'expression de Mule, entraîne la stabilisation et l'accumulation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, rendant les cellules plus résistantes à la mort induite par des agents génotoxiques.

- β-TrCP

L'E3 ligase β-TrCP est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont la division et de multiples voies de signalisation (Frescas & Pagano, 2008), des paramètres essentiels pour de nombreux aspects de la tumorigénèse. C'est la première E3 dont le substrat est la protéine Mcl-1 préalablement phosphorylée à avoir été identifié. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de Mcl-1 au niveau de différentes sérines et thréonines par la kinase GSK3 facilitait son interaction avec β-TrCP. Une surexpression de β-TrCP induit une ubiquitination de Mcl-1 dépendante de sa phosphorylation par GSK3 et nécessite le domaine F-box de β-TrCP, alors que l'extinction de cette E3 entraîne une augmentation de l'expression de Mcl-1. Une étude plus récente a confirmé ces résultats en montrant que les 2 E3 β-TrCP et FBW7

coopéraient pour induire la dégradation de Mcl-1 suite à sa phosphorylation par GSK3 induite par l'inhibition d'Akt (H. Ren et al., 2013).

- FBW7

Le fait qu'un nombre significatif de substrat de FBW7 soient des oncogènes, a poussé de nombreux chercheurs à évaluer son rôle de suppresseur de tumeur. Les premières études ont montré que 6 à 10% des carcinomes colorectaux expriment des formes mutées de FBW7 et des travaux plus tardifs ont révélé des mutations de FBW7 dans de nombreux cancers d'histologies différentes. Ainsi, on retrouve une forte prévalence de ces mutations dans la leucémie lymphoïde aigüe T et le cholangiocarcinome (Akhoondi et al., 2007; Welcker & Clurman, 2008). FBW7 régule de façon négative de nombreuses protéines impliquées dans des voies de signalisation différentes (L. Wang, Ye, Liu, Wei, & Wang, 2014). Ainsi, les protéines NFκB2, c-Myc, mTOR mais aussi Mcl-1 font partie de ses substrats. En effet, il a été montré que FBW7 est capable de réguler l'apoptose en ubiquitinant Mcl-1. Cette ubiquitination est dépendante de la phosphorylation préalable de Mcl-1 par GSK3. Ce phopho-dégron reconnu par FBW7 est par ailleurs très conservé dans le règne animal (humain, chien, vache, …) et est aussi partagé par les autres substrats de FBW7. Une interaction entre Mcl-1 et FBW7 a ainsi été observée en surexpression et une expression élevée de Mcl-1 dans des lignées cellulaires issues de leucémie lymphoïde aigüe déficiente pour FBW7 protège ces cellules contre l'apoptose induite par l'ABT-737.
La protéase FBW7 a aussi été décrite comme étant impliquée dans la mort cellulaire induite par des drogues dirigées contre la tubuline, à l'origine de l'arrêt en mitose des cellules traitées. Cette mort cellulaire est engendrée par l'ubiquitination de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 par FBW7, induisant ainsi sa dégradation (Wertz et al., 2011). Une autre E3 ligase, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire a été rapporté comme pouvant potentiellement ubiquitiner Mcl-1, cdc20.

- Cdc20

De nombreux travaux ont montré que l'expression et l'activité des membres de la famille Bcl-2, et notamment celle de la protéine Mcl-1 sont finement régulées au cours de la mitose (Eichhorn, Sakurikar, Alford, Chu, & Chambers, 2013; Millman & Pagano, 2011; Zhou, Cai,

Han, Xu, & Chang, 2014). Un arrêt prolongé de la mitose induit une diminution drastique de l'expresssion de Mcl-1 passant par sa phosphorylation par CDK1-cycline B et accompagnée d'un déclenchement de l'apoptose (Millman & Pagano, 2011; Tunquist, Woessner, & Walker, 2010).

La protéase cdc20 joue un rôle clé dans le déroulement de la mitose (Fry & Yamano, 2008; Irniger, 2002) et semble être impliquée dans la dégradation de Mcl-1 au cours de l'arrêt de la mitose (Harley et al., 2010; Versteeg et al., 2013). En effet, dans les cellules dont l'arrêt en mitose est induite par des poisons dirigés contre les microtubules, la dégradation de Mcl-1 dépend de sa reconnaissance par cdc20 et nécessite la phosphorylation préalable de celui-ci au niveau de sa thréonine 92 par CDK-cycline B1. Cependant, la démonstration d'une ubiquitination directe de Mcl-1 par cdc20, n'a pas été faite et demande donc à être réalisée.

Les protéases β-TrCP, FBW7 et cdc20 ne sont par les seules E3 capables d'initier la dégradation de Mcl-1 en prenant potentiellement en charge son ubiquitination. En effet, des travaux récents suggèrent que TRIM17 peut aussi assurer l'ubiquitination de Mcl-1 dans les cellules neuronales.

- TRIM17

Les 75 protéines TRIM constituent une famille d'E3 à domaine RING qui est impliquée dans la régulation des voies de signalisation dépendantes de l'activation des récepteurs de l'immunité innée (Versteeg et al., 2013) mais aussi dans de nombreux autres processus biologiques (Napolitano & Meroni, 2012). TRIM17, isolée à partir d'une librairie d'ADN complémentaire issue de testicules de rat et humains, est impliquée dans l'initiation de l'apoptose des neurones (Lassot et al., 2010). Ainsi, TRIM17 est capable d'induire l'apoptose en catalysant l'ubiquitination de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Magiera et al., 2013). En effet, l'équipe de Desagher S, a montré d'une part que la diminution de l'expression de TRIM17 induisait une augmentation de l'expression et de la demi-vie de Mcl-1 et réciproquement, que la surexpression de TRIM17 contribuait à diminuer l'expression de Mcl-1. Cette ubiquitination nécessite la phosphorylation de Mcl-1 au niveau des résidus serine 159 et thréonine 163 amorçant la fixation de TRIM17 puis l'ubiquitination de Mcl-1. De plus, TRIM17 est capable d'ubiquitiner Mcl-1 *in vitro*, confirmant une ubiquitination directe de cette protéine.

- PARKIN

Une sixième E3, PARKIN, pourrait aussi avoir la capacité d'ubiquitiner Mcl-1, induisant ainsi sa dégradation.

PARKIN est une E3 hybride RING/HECT mutée dans la maladie de Parkinson et qui est impliquée dans l'élimination par mitophagie des mitochondries endommagées (Narendra, Tanaka, Suen, & Youle, 2008), tout en jouant aussi un rôle significatif dans d'autres voies de signalisation (Scarffe, Stevens, Dawson, & Dawson, 2014). Ainsi, il a été montré, grâce à des études génétiques et biochimiques que PARKIN prend part aux processus de fusion et de fission des mitochondries (impliqués dans l'apoptose, voir III.B-1), de transport des mitochondries et de la dégradation de certaines protéines mitochondriales suite à une dépolarisation de la mitochondrie (Sarraf et al., 2013). De plus, il a été montré récemment que les protéines mitochondriales de la famille Bcl-2 participaient au contrôle de qualité de la mitochondrie en régulant l'activité du couple PARKIN/PINK1 (Hollville, Carroll, Cullen, & Martin, 2014) et que PARKIN pouvait induire la dégradation de l'E3 FBW7, permettant ainsi une stabilisation de la protéine Mcl-1 en réponse à un stress oxidatif (Ekholm-Reed, Goldberg, Schlossmacher, & Reed, 2013), réalisant un premier lien indirect entre l'ubiquitination de Mcl-1 et l'activité de PARKIN.

En 2014, l'équipe de Martin SJ, a apporté la base d'une possible ubiquitination directe de Mcl-1 par PARKIN (Carroll et al., 2014). En effet, ils ont d'abord montré que PARKIN contribuait à dégrader Mcl-1 de manière sélective suite à une dépolarisation de la mitochondrie puis ont montré une corrélation entre l'inhibition de PARKIN et la diminution de l'expression de Mcl-1. Cependant, ni une interaction directe entre Mcl-1 et PARKIN, ni une ubiquitination de Mcl-1 par PARKIN *in vitro* n'ont été exploré, laissant le doute quant à une ubiquitination directe de Mcl-1 réalisée par PARKIN dans ces conditions.

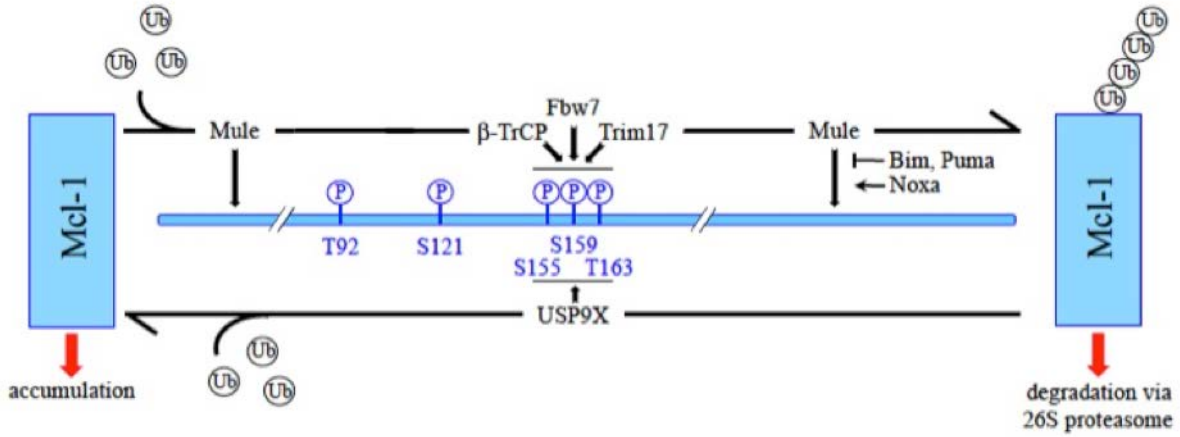


Figure 36 - Régulation de l'état d'ubiquitination de la protéine Mcl-1
D'après (Mojsa, Lassot, & Desagher, 2014)

Plusieurs E3 ligases semblent donc impliquées dans la régulation de l'expression de Mcl-1 via son ubiquitination dégradative (de type K48). Cependant, une étude récente tend à démontrer que Mcl-1 peut être ubiquitiné à l'aide de chaînes de type K63, promouvant ainsi plutôt sa stabilisation.

b) E3 impliquée dans l'ubiquitination et la stabilisation de Mcl-1 via son ubiquititnation de type K63, un ticket gagnant

A l'heure actuelle, 1 E3 capable d'ubiquitiner Mcl-1 avec des chaînes de type K63, a été identifiée, TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) (Choi & Harhaj, 2014).
L'identification de TRAF6 comme une E3 de Mcl-1 s'est faite à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse des protéines ubiquitinées en présence de Tax, une protéine impliquée dans la pathogénèse du virus HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus type 1). TRAF6 est une E3 à domaine RING dont l'activité est dépendante de sa dimérisation et qui joue un rôle important dans la transduction du signal lié à l'activation des récepteurs TLR4 (Toll Like Receptor type 4) et IL1R (InterLeukin 1 Receptor), notamment (Conze, Wu, Thomas, Landstrom, & Ashwell, 2008).
Les auteurs ont tout d'abord mis en évidence pour la première fois que Mcl-1 pouvait être ubiquitiné en K63. Bien qu'ils n'aient pas vérifié que le domaine RING de TRAF6 était nécessaire à l'ubiquitination de Mcl-1, ils ont montré que l'ubiquitination de Mcl-1 était réduite en absence de TRAF6 et que TRAF6 pouvait ubiquitiner Mcl-1 *in vitro*. Cette

ubiquitination est dépendante de Tax, se fait sur les lysines K 276, 279, 302 et 308 et protège Mcl-1 de la dégradation par le protéasome (Figure 37).

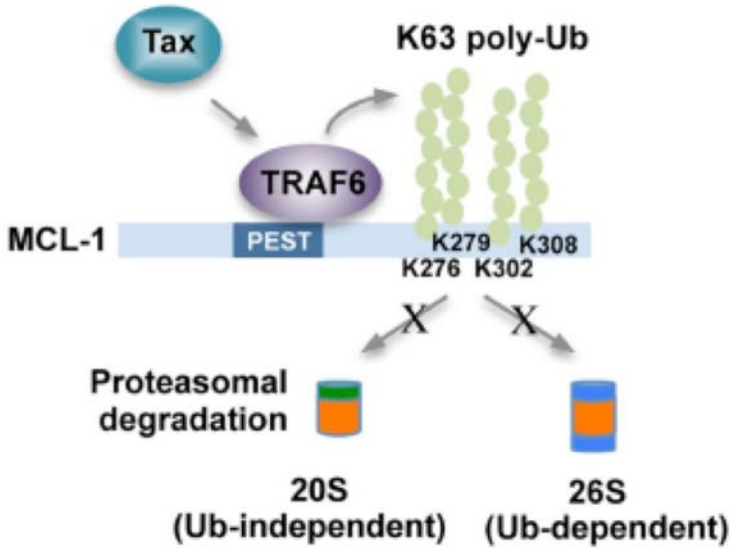


Figure 37 - Implication de l'axe Tax-TRAF6 dans l'ubiquitination de Mcl-1
Tiré de (Choi & Harhaj, 2014)

Le fait que TRAF6 se fixe sur Mcl-1 au niveau de sa région PEST pourrait aussi protéger Mcl-1 de sa dégradation par le protéasome en masquant les sites de phosphorylation de Mcl-1 par la kinase GSK3, nécessaires à la fixation des E3 β-TrCP, FBW7 et TRIM17. Ces résultats, obtenus dans des conditions pathologiques, suite à l'expression de Tax, demandent à être confirmées dans des conditions physiologiques pour savoir si TRAF6 est une E3 impliquée dans le renouvellement de Mcl-1 ou si c'est son détournement par Tax qui contraint cette activité. Il serait d'ailleurs intéressant de voir si TRAF6 est capable d'ubiquitiner Mcl-1 au cours de l'activation de la voie NFκB par exemple ou suite à l'activation des RLRs (RIG-I Like Receptor) qui s'accompagne du recrutement de TRAF6 par MAVS à la mitochondrie (S. Liu et al., 2013).

L'ubiquitination de Mcl-1 par ces 2 groupes d'E3 ligases, a ainsi des conséquences diamétralement opposées sur le devenir de Mcl-1, dégradation par le protéasome en cas d'ubiquitination de type K48 et stabilisation en cas d'ubiquitination de type K63. Dans ce contexte, le clivage des chaînes d'ubiquitine de type K48, devrait permettre une stabilisation de Mcl-1. Ceci a été confimé par l'identification de la DUB USP9X (Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked) par l'équipe de Dixit V (Schwickart et al., 2010).

2/ Régulation de l'expression de Mcl-1 par les DUB, USP9x la secouriste

La protéine USP9X est très conservée et est l'orthologue de FAM (aussi connu sous le nom de FAFX) chez la drosophile qui joue un rôle critique dans le développement de l'œil. Elle est capable d'exciser une mono-ubiquitination d'un substrat et de cliver une large gamme de chaînes d'ubiquitine dont les chaînes de type K48, K63 et K29 (Al-Hakim et al., 2008; Dupont et al., 2009; Mouchantaf et al., 2006; Taya et al., 1998). USP9X contrôle des processus fondamentaux comme le développement préimplantatoire et les voies de signalisation qui régulent la viabilité cellulaire au cours du développment post-natal (Pantaleon et al., 2001) mais est aussi impliquée dans le trafic et l'endocytose des protéines ainsi que la régulation de la polarité cellulaire (Murtaza, Jolly, Gecz, & Wood, 2015). En général, USP9X stimule la survie cellulaire en déubiquitinant et en stabilisant de nombreux substrats favorisant celle-ci. Elle est d'ailleurs surexprimée dans le cancer du sein (S. Deng et al., 2007). L'un de ses substrats est la protéine Mcl-1 (Schwickart et al., 2010). En effet, USP9X déubiquitine Mcl-1, la protégeant d'une dégradation protéasomale et ainsi, inhibe l'apoptose, et l'interaction directe entre les 2 protéines est essentielle dans ce processus. De plus, la déplétion de USP9X augmente la poly-ubiquitination de Mcl-1, rend son renouvellement plus rapide et sensibilise certaines lignées de tumeur à l'ABT-737.

Toutes ces données démontrent que le niveau d'expression et l'activité de la protéine Mcl-1 sont hautement régulés, permettant à la cellule, à tout moment, de répondre au mieux aux signaux qu'elle reçoit en réajustant le thermostat soit vers le rouge et la mort cellulaire, soit vers le bleu et la survie temporaire.

RESULTATS

ARTICLE I

Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells

Gorbatchev Ambroise, Alain Portier, Nathalie Roders, Damien Arnoult, Aimé Vazquez

Oncotarget, 2015

L'activité pro-apoptotique de PUMA est régulée par sa localisation subcellulaire.

Gorbatchev Ambroise, Alain Portier, Nathalie Roders, Damien Arnoult et Aimé Vazquez.
Publié par Oncotarget en septembre 2015

PUMA est une protéine pro-apoptotique à domaine BH3 unique. Elle fait partie de la famille Bcl-2 qui contrôle l'intégrité de la membrane mitochondriale qui est altérée au cours de l'activation de la voie apoptotique intrinsèque, permettant la libération caractéristique du cytochrome c dans le cytosol, contribuant à l'activation des caspases responsables de la démolition minutieuse de la fonction et des structures cellulaires. Cette libération se fait via la formation de pores au niveau de la membrane externe de la mitochondrie impliquant les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH Bax et Bak dites effectrices. Dans une cellule vivante, ces protéines sont séquestrée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-XL, empêchant ainsi leur oligomérisation. Les protéines à domaine BH3 unique constituent un sous-groupe des protéines pro-apoptotiques. Elles peuvent être assimilées à des senseurs de stress dont l'activité est stimulée par des signaux apoptotiques. Ainsi, un stress génotoxique peut conduire à l'activation de p53 capable de stimuler la transcription de PUMA qui en inhibant l'ensemble du répertoire apoptotique permet de lever l'inhibition de ces derniers sur les effecteurs Bax et Bak et de transduire ce signal apoptotique. Cependant, notre équipe a montré qu'une augmentation significative de l'expression de PUMA pouvait ne pas être associée à l'apoptose. En effet, l'activation de cellules B purifiées à partir d'amygdales humaines, induit une augmentation importante de l'expression de PUMA qui n'est pas associée à la mort mais de manière paradoxale, à la prolifération cellulaire. Cette observation suggère que l'activité pro-apoptotique de PUMA est inhibée dans ces cellules. De manière intéressante, les protéines anti-apoptotiques ne semblaient pas intervenir dans cette inhibition puisque leur expression n'augmentait pas comme celle de PUMA, mais restait stable. Un autre mécanisme, indépendant de ces protéines devait donc être mis en jeu pour « éteindre » la fonction pro-apoptotique de PUMA. Le fait que la fonction de certains membres pro-apoptotique de la famille Bcl-2 tels que Bad, Bid et Bax soit régulée par leur localisation cellulaire et leur activation au niveau du cytosol par l'inhibition de leur séquestration, leur clivage ou leur changement de conformation, respectivement, nous a amené à analyser la localisation de PUMA dans les cellules B humaines activées. Grâce à l'utilisation de 2 techniques de fractionnement impliquant un kit commercial ou des centrifugation différentielles successives suite à une lyse mécanique des cellules, permettant de séparer la fraction mitochondriale de la fraction cytosolique, nous

avons montré que dans ces cellules, PUMA était exprimé au niveau du cytosol. Cette localisation a aussi été retrouvée dans des lignées de lymphome de Burkitt, contrepartie tumorales de ces cellules B activées. De plus, nos résultats montrent que suite à un signal apoptotique, PUMA est capable de transloquer au niveau de la mitochondrie de façon indépendante des caspases. Cette translocation, dépendante de l'activation de la MAPKinase p38, permet l'interaction de PUMA avec les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2, contribuant ainsi à leur inhibition et à l'activation des pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak, conduisant à l'apoptose.

Ces travaux permettent de lever le voile sur un niveau supplémentaire de régulation de l'activité de PUMA qui est indépendante de la stimulation de sa transcription et pourraient permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques qui consisteraient à activer directement PUMA pour tuer les cellules cancéreuses sans passer par la stimulation de signaux initiateurs comme p53.

Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells

Gorbatchev Ambroise[1,2,3], Alain Portier[1,2,3], Nathalie Roders[1,2,3], Damien Arnoult[1,2,3] and Aimé Vazquez[1,2,3]

[1] INSERM, UMR_S 1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

[2] Université Paris-Saclay, France

[3] Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France

***Correspondence to**: Aimé Vazquez, **email**: aime.vazquez@inserm.fr*

Keywords: PUMA, Burkitt's Lymphoma, apoptosis, translocation, mitochondria

***Received**: April 30, 2015* ***Accepted**: September 17, 2015* ***Published**: September 29, 2015*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The BH3-only protein PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) is a major regulator of apoptosis. It belongs to the Bcl-2 family of proteins responsible for maintaining mitochondrial outer membrane integrity by controlling the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway. We describe here a new pathway regulating PUMA activation through the control of its subcellular distribution. Surprisingly, neither PUMA upregulation in normal activated human B lymphocytes nor high levels of PUMA in Burkitt's lymphoma (BL) were associated with cell death. We show that PUMA is localized to the cytosol in these cells. By contrast, various apoptosis-triggering signals were found to promote the translocation of PUMA to the mitochondria in these cells, leading to their death by apoptosis. This apoptosis was associated with the binding of mitochondrial PUMA to anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Bcl-2 and Mcl-1. This translocation was caspase-independent but was prevented by inhibiting or knocking down the expression of the MAPK kinase p38. Our data suggest that the accumulation of PUMA in the cytosol may be important for the participation of this protein in apoptosis without the need for prior transcription. This regulatory pathway may be an important feature of differentiation and tumorigenic processes.

INTRODUCTION

Apoptosis is regulated by two major groups of proteins: caspases and the proteins of the Bcl-2 family. Bcl-2 family proteins regulate the integrity of the mitochondrial outer membrane (MOM) and can be classified into three different groups: pro-apoptotic, anti-apoptotic and BH3-only regulators. The pro-apoptotic molecules Bax and Bak are directly responsible for the formation of pores in the MOM, allowing the exit of apoptogenic factors, such as cytochrome-*c*. The anti-apoptotic molecules, such as Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1 or Mcl-1, can inhibit Bax/Bak-dependent MOM permeabilization (MOMP). They can be classified into two subgroups, Mcl-1/A1 and Bcl-2/Bclxl/Bclw, according to their sensitivity to BH3-only proteins and to various inhibitors, such as ABT-737. The third group, BH3-only proteins, contains proteins regulating the other two groups and controlling the pro/antiapoptotic balance. This group can also be classified into two subgroups: (i) BH3-only proteins binding only one subgroup of anti-apoptotic molecules (e.g. Bad and Bik interact with and inhibit the Bcl-2 subgroup whereas Noxa and Bmf interact with the Mcl-1 subgroup) and (ii) BH3-only proteins able to interact with all anti-apoptotic molecules, such as tBid, Bim and PUMA. These two subgroups also differ in their capacity to activate pro-apoptotic proteins directly. Only the proteins of the second subgroup (tBid, Bim and PUMA) have been reported to interact with and activate Bax and Bak directly [1-3].

PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), also known as Bbc3, was described simultaneously by several different groups [4] [5]. Its gene encodes four different isoforms (α, β, γ and δ). Only, the α (23 kDa) and β (18 kDa) isoforms have apoptotic properties. Both these isoforms contain the BH3 domain, essential for

homotypic interaction with other Bcl-2 family members, and the C-terminal domain, which includes a putative transmembrane domain [4]. PUMA gene transcription is regulated by p53-dependent and p53-independent pathways including various transcription factors, such as Foxo3A, C/EBP and E2F1 [4, 6-8]. PUMA can promote apoptosis by either direct interactions with and inhibition of all anti-apoptotic molecules or the direct activation of Bax and Bak, leading to MOMP [4, 9]. Triple-KO mice (Bid/Bim/PUMA) have the same phenotype as Bax/Bak KO mice, whereas Bim/Bid double-KO mice do not, highlighting the importance of PUMA in the mitochondrial apoptotic pathway [10]. PUMA has been implicated in various apoptotic responses, including DNA damage, growth factor/cytokine withdrawal and the response to glucocorticoids[11, 12] [13]. PUMA has also recently been shown to play a major role in the control of memory T- and B-lymphocyte survival [14, 15]. In this context, activated B cells produce large amounts of PUMA, which is associated with cell activation rather than cell death [15]. This raises questions about the mechanisms preventing PUMA-induced apoptosis in activated lymphocytes. We show here that this paradoxical situation is due to localization of PUMA to the cytosol in these cells. We also show that, in response to apoptotic stimuli, PUMA is translocated from the cytosol to the mitochondria, where it can bind anti-apoptotic molecules, including Bcl-2 and Mcl-1, leading to cell death.

RESULTS

PUMA is present in the cytosol of activated B cells

We previously observed that PUMA expression was strongly upregulated in response to mitogenic activation *in vitro*, in normal human B lymphocytes (in which PUMA is barely detectable in the absence of such activation) (Figure 1A). This finding was confirmed *in vivo:* PUMA (mostly the 18 kDa ß isoform) was found to be present in large amounts in germinal center B cells and their tumoral counterparts, Burkitt's lymphoma cells, such as BL41 cells (ref 15 and Figure 1B). Surprisingly, this significant increase in PUMA expression was found to be associated with cell proliferation, as assessed by thymidine uptake, rather than cell death (Figure 1A). This paradoxical observation suggested that the pro-apoptotic activity of PUMA was somehow inhibited, allowing the cells to grow and preventing them from dying. However, we previously observed that the amounts of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 were stable after mitogenic activation, indicating that the increase in PUMA expression was not counterbalanced by the production of large amounts of the anti-apoptotic counterparts of PUMA (see figure 1A in ref. 15). We checked that the protein observed was indeed PUMA, by assessing the specificity of the anti-PUMA antibody (Ab) targeting the C-terminal end of PUMA used in two ways: (i) Following immunoprecipitation of the FLAG-tagged recombinant α or β isoforms of PUMA with an anti-FLAG antibody, our anti-PUMA Ab was able to recognize both these isoforms (which were absent from the control Ig immunoprecipitate; Supplementary Figure 1A & 1B). (ii) Using two different siRNAs, we observed a knockdown of the expression of both the α (23 kDa) and β (18 kDa) isoforms of endogenous PUMA (Supplementary Figure 1C). The activity of some Bcl-2 family members is known to be regulated by their localization to particular compartments within the cell (e.g. Bax, Bid and Bad [16-18]). We therefore investigated the distribution of PUMA within these cells. Using a commercial kit (Calbiochem), we showed that PUMA was concentrated in the cytoplasmic fraction (fraction 1) of SAC-activated B cells. Almost no PUMA was found in the heavy membrane fraction (fraction 2), which included mitochondrion-associated proteins, such as VDAC, the BH3-only protein Bim and the anti-apoptotic protein Mcl-1. No PUMA was present in the fractions corresponding to the nucleus (fraction 3) or the less soluble fraction associated with the cytoskeleton (fraction 4) (Figure 1A). A similar distribution of PUMA and Bim was observed when BL41 cells were fractionated with the same kit (Figure 2A). For confirmation of these observations, we performed another type of fractionation, leading to the separation of cytosolic fractions (S25 or S) and mitochondrion-enriched fractions (P5 or P) (Figure 1C). Again, PUMA was present in the cytosolic fractions (S), whereas Bim and VDAC were present in the heavy membrane fractions (P) prepared from B41 cells (Figure 1B). PUMA was found in the cytosol of other BL cell lines, including CA46, Daudi and Ramos. EBV infection did not alter either the expression or the cytosolic localization of PUMA: no difference was observed between EBV-infected BL cells, such as BL41 95.8 or Ramos AW, and uninfected BL41 or Ramos cells (Figure1D). As previously reported [19], Bim, unlike PUMA, displayed a strong downregulation of expression in the presence of EBV (Figure 1D). We then studied the cellular distribution of PUMA by immunofluorescence methods. Confocal microscopy showed that, unlike Mcl-1, PUMA did not colocalize with the mitochondria (TOM20). This finding confirmed that PUMA was cytosolic rather than located at the mitochondrial surface in BL41 cells (Figure 1E). Moreover, with the exception of the BH3-only protein Bid and the pro-apoptotic protein Bax, the cytoplasmic localization of which has been clearly established, the other Bcl-2 family members present in BL41 cells (the BH3-only proteins Bim, Noxa, Bik, the pro-apoptotic Bak and the anti-apoptotic proteins Mcl-1, Bcl-2 and BclxL) were all found in the mitochondrial fractions (Figure 1F).

Thus, PUMA had an unexpected, never before reported distribution in non-apoptotic activated human

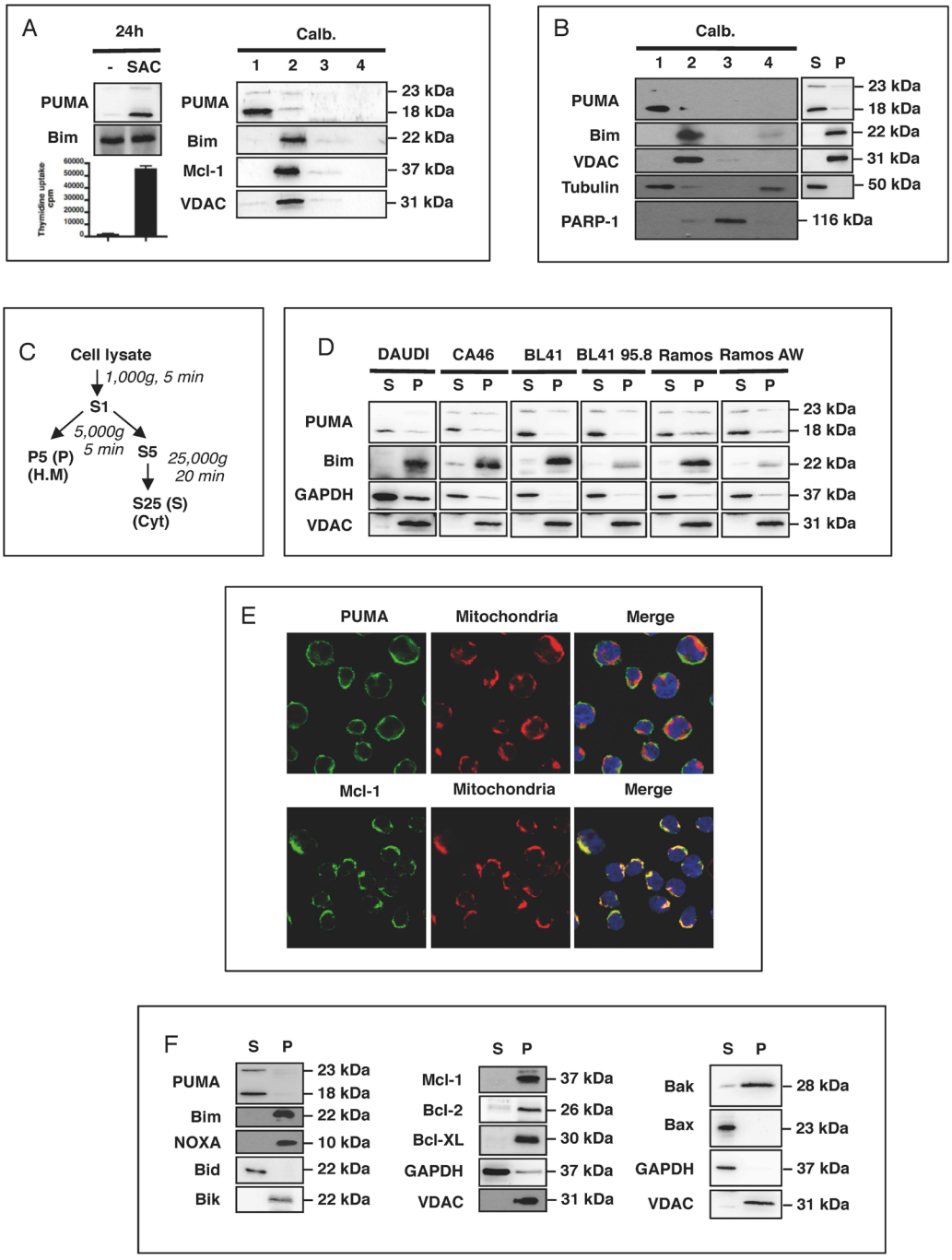


Figure 1: PUMA is present in the cytosol of activated B cells. A. Human tonsilar B cells were treated with mitogenic doses of *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1 (pansorbin: SAC) at a dilution of 1/10,000 for 24 h. Proliferation was assessed by measuring DNA synthesis, as assessed from ^{3}H-thymidine incorporation during the last 16 h of culture, in counts per minute (cpm). Cells were fractionated with the Calbiochem® extraction kit and western blotting was used to determine the subcellular localization of PUMA, Bim and Mcl-1 in the fractions (1: cytosol; 2 heavy membrane; 3: nucleus and 4: less soluble material associated with the cytoskeleton). **B.** Resting BL41 cells were fractionated as in **A.** and the subcellular localization of PUMA, Bim, VDAC, tubulin and PARP was assessed by western blotting. **C.** Purification of the cytosol (S) and heavy membrane (P) fractions by differential centrifugation of cell lysates. **D.** Cell lysates from DAUDI, CA46, BL41 and Ramos Burkitt's lymphoma cell lines and their EBV-positive counterparts (BL41 95.8 for BL41 and RamosAW for Ramos) were fractionated and the S and P fractions tested for PUMA, Bim, GAPDH and VDAC by western blotting. **E.** BL41 cells were stained with anti-PUMA, anti-Mcl-1 and anti-TOM20 primary antibodies with their corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibodies, green for PUMA and Mcl-1 or red for TOM20, and the subcellular distribution of PUMA and Mcl-1 was analyzed by confocal microscopy (E, right panel). **F.** Resting BL41 cells were fractionated as shown in **C.** and the subcellular distributions of the various Bcl-2 family members were analyzed by western blotting.

B cells and in Burkitt's lymphoma cells, in which it was localized to the cytosol.

Apoptosis is associated with the translocation of PUMA to the mitochondria

We then investigated whether apoptotic signals affected the distribution of PUMA. The induction of BL41 cell apoptosis through BCR-mediated activation with cross-linked anti-μ Abs [20], drugs such as anisomycin [21] or by the UV treatment of HeLa cells [22] was associated with the translocation of PUMA from the cytosol to the mitochondria (Figure 2A, 2B, 2C and Supplementary Figure 2). This finding was confirmed by confocal microscopy, showing that anisomycin triggered the translocation of PUMA to the mitochondria, together with Bax expression in the mitochondria, and the release of cytochrome *c* into the cytosol (Supplementary Figure 2A & 2B). This suggests that the translocation of PUMA to the mitochondria may play a role in mitochondrial activation, leading to apoptosis. Consistent with this hypothesis, the translocation of PUMA to the mitochondria was also observed as early as 2 h after the exposure of HeLa cells to UV light, before appearance of apoptotic features, such as caspase-3 activation (manifested by PARP-1 cleavage) and cell shrinkage (Figure 2C). Furthermore, the siRNA-mediated downregulation of PUMA was correlated with the inhibition of anisomycin-mediated apoptosis in BL41 cells, strongly suggesting that this mitochondrial translocation of PUMA played an important role in the apoptotic process (Figure 2D). We checked that this translocation was directly associated with the mitochondrial apoptotic pathway, by activating HeLa cells with recombinant TRAIL. TRAIL-mediated apoptosis was not associated with the mitochondrial translocation of PUMA or the release of mitochondrial cytochrome *c* (Figure 2E panels a and b). These data provide strong support for our conclusion that PUMA translocation is associated with the mitochondrial apoptotic pathway. Nevertheless, it remains possible that the mitochondrion-associated PUMA was a newly synthesized protein rather than that localized to the cytosol in non-apoptotic cells. We addressed this question in two ways: (i) we quantified PUMA gene transcription, by carrying out qPCR on RNA isolated from BL41 cells activated with anisomycin or anti-μ antibody, or not activated. We observed no difference in PUMA mRNA levels between these cells (Supplementary Figure 3 panel a), (ii) we investigated the translocation of PUMA to the mitochondria in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide. We observed no decrease in the amount of PUMA in the mitochondria in the absence of protein synthesis (Supplementary Figure 3 panel b). Overall, these data fully support the conclusion that the PUMA present in the mitochondria came from the pre-existing cytosolic pool and was not synthesized *de novo*.

PUMA overproduction is associated with mitochondrial localization and apoptosis

We overproduced PUMA in HeLa cells, to determine whether the translocation of PUMA to the mitochondria led to the induction of apoptosis. Both biochemical separation (Figure 3A, panel a) and confocal microscopy (panel b), showed that the overproduced PUMA was present at the mitochondria. This mitochondrial localization was associated with cytochrome *c* release (panel c) and cell shrinkage (panel a), suggesting that the presence of PUMA at the mitochondria was sufficient to induce cell death. We investigated the mechanisms underlying this translocation, by studying the localization and the pro-apoptotic activity of various truncated PUMA proteins. Constructs including the N-terminal or C-terminal ends of the β isoform of PUMA, including the BH3 domain, were overproduced in HeLa cells, and their cellular distribution was determined (Figure 3B panel a). The C-terminal fragment, like the full-length protein (PUMA β), was present at mitochondria (panels b and c), and this mitochondrial localization was associated with apoptosis (panel d). By contrast, the N-terminal fragment was found mostly in the cytosol of the transfected cells (Figure 3B panels b and c) and was not associated with cell death (panel d). We therefore verified that the N-terminal fragment was well produced in the presence (Figure 3B panel c) or the absence of the caspase-inhibitor Q-VD-OPh (Figure 3B panel d and Supplementary Figure 4 panel a). The data obtained showed that PUMA-mediated apoptosis was dependent on its mitochondrial localization and also implicated the C-terminal domain of PUMA in this localization. We also found that deletion of the BH3 domain of the C-terminal fragment abolished its apoptotic properties (Supplementary Figure 4 panel b). This suggests that, once translocated to the mitochondria, PUMA binds other Bcl-2 family proteins *via* its BH3 domain.

Mitochondrial PUMA binds to and may inhibit Mcl-1 and Bcl-2 in BL41 cells

The apoptosis-mediating activity of PUMA, like that of all BH3-only proteins, is due to its binding, *via* its BH3 domain, with anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (such as Mcl-1 or Bcl-2) and/or with the pro-apoptotic proteins Bax and Bak [9, 23-25]. We therefore investigated the association of PUMA with Mcl-1 and Bcl-2 in both activated and non-activated BL41 cells. No association between PUMA and these anti-apoptotic proteins (Figure 4A panel a) was observed in healthy cells, consistent with the cytosolic location of PUMA and the mitochondrial location of the anti-apoptotic proteins (Figure 1F). However, following activation with

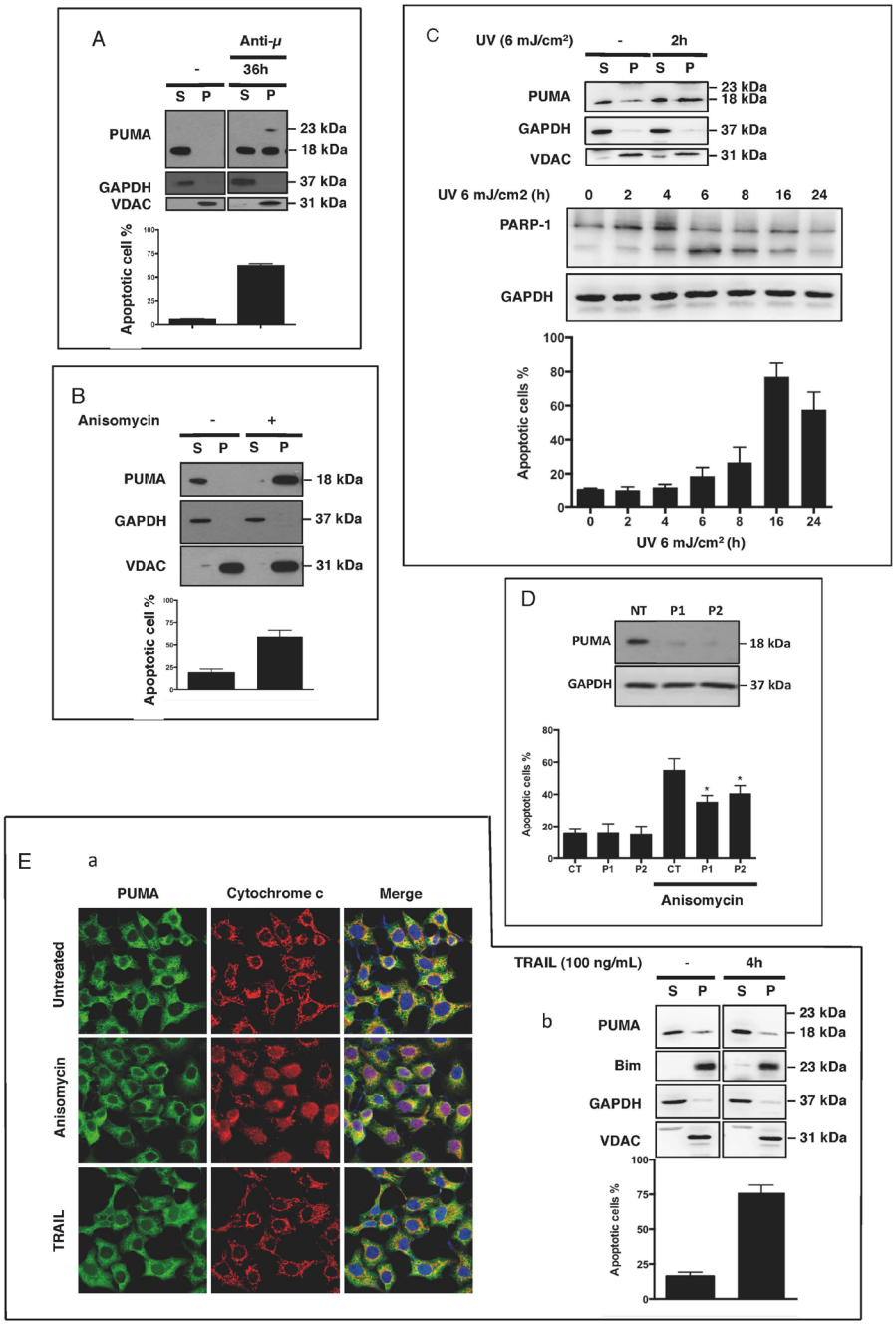


Figure 2: PUMA is found at the mitochondria when apoptosis is triggered. A. BL41 cells were stimulated for 36 h with mouse anti-human μ antibodies (5 μg/ml) cross-linked with anti-mouse IgM antibodies (28 μg/ml). Western blotting was used to test the cytosol (S) and heavy membrane fractions (P) for PUMA. Apoptosis was assessed by flow cytometry and cells were considered apoptotic if they were shrunken, with high side scatter and low forward scatter. The data shown are means ± SD for triplicate experiments. **B.** BL41 cells were stimulated with anisomycin (2 μg/ml) for 4 h. The S and P fractions were tested for PUMA, GAPDH and VDAC by western blotting, and apoptosis was assessed by flow cytometry. **C.**. HeLa cells were exposed to UV (6 mJ/cm^2) and cultured for 2 h. Cell lysates were fractionated and the fractions were tested for PUMA, GAPDH and VDAC by western blotting. Cell shrinking and PARP-1 cleavage were assessed by flow cytometry and western blotting, respectively, at the indicated times following UV exposure. The data shown are means ± SD for triplicate experiments **D.** BL41 cells transfected with a non-targeting siRNA (CT) or a PUMA-targeting siRNA (P1 and P2) for 76 h were treated for 4 h with anisomycin (2 μg/ml) or left untreated (controls). Apoptosis was analyzed by flow cytometry (means ± SD for triplicate experiments) and PUMA knockdown efficiency was analyzed by western blotting with GAPDH as a loading control. **E.** HeLa cells were or were not activated with recombinant TRAIL (100 ng/ml) for 4 h. (panel a) Cells were stained with anti-PUMA and anti-cytochrome *c* primary antibodies with their corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibodies, green for PUMA and red for cytochrome *c*, and the subcellular localization of PUMA and cytochrome *c* was analyzed by confocal microscopy. (panel b) S and P fractions were tested for PUMA, Bim, GAPDH and VDAC by western blotting, and apoptosis was assessed by flow cytometry.

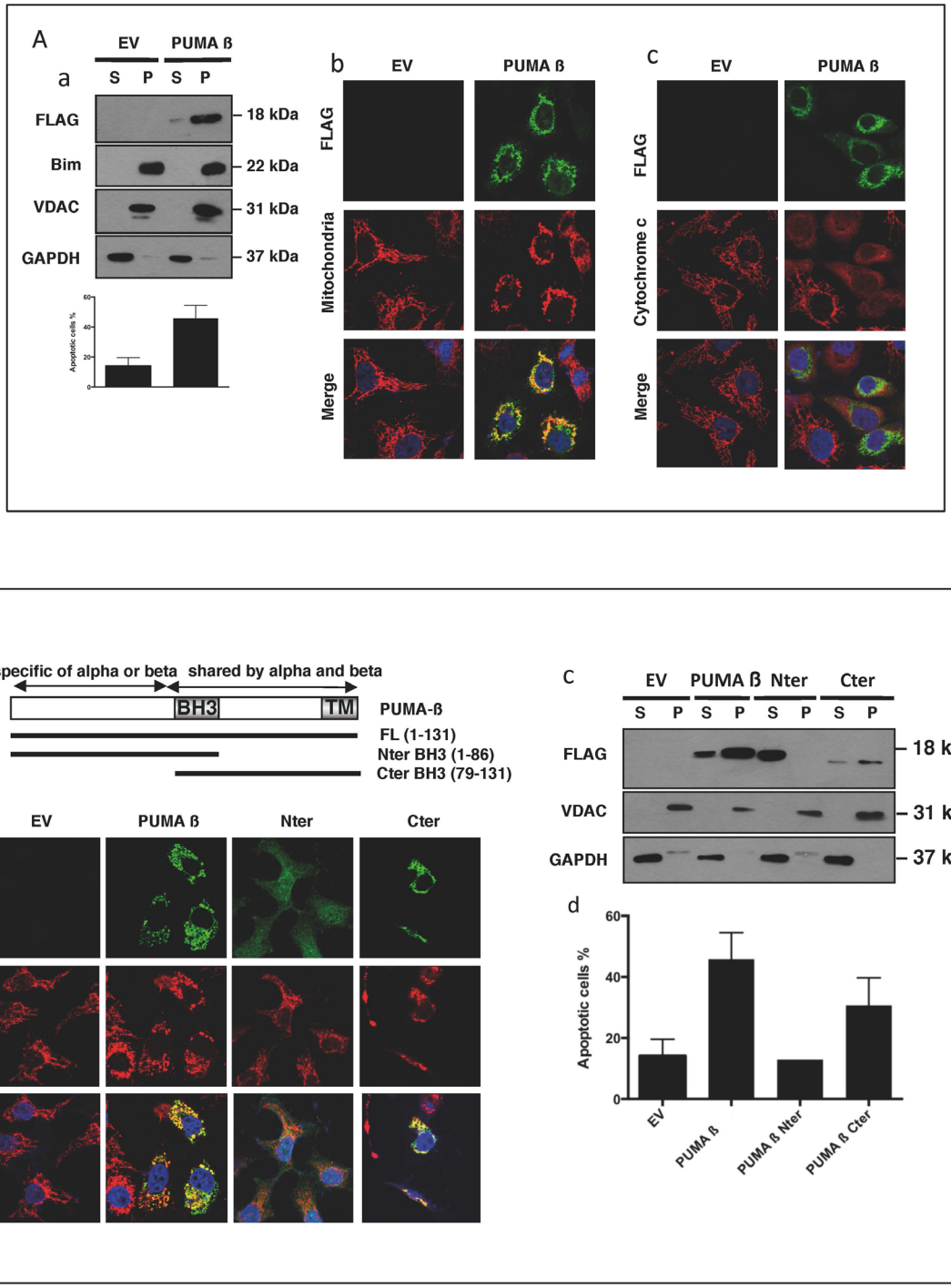


Figure 3: When overproduced, PUMA is found at the mitochondria and induces apoptosis. A. HeLa cells, left untreated or treated for 30 min with 10 µM QVD-OPh, were transfected with a plasmid encoding a full-length Flag-tagged PUMA ß (Puma ß) or an empty vector (EV) and incubated for 24 h. The subcellular distributions of PUMA ß, Bim, VDAC and GAPDH in QVD-OPh-treated cells were analyzed by western blotting (panel a). The data shown are means ± SD for triplicate experiments. EV- or PUMA ß-transfected HeLa cells were stained with anti-FLAG and anti-HSP60 (panel b) or with anti-FLAG and anti-cytochrome *c* (panel c) primary antibodies, together with the corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibodies, green for PUMA and red for HSP60 or cytochrome *c*. **B.** HeLa cells, treated for 30 min with QVD-OPh, were transfected with an empty vector (EV) or the full-length PUMA ß (Puma ß), N-terminal (Nter) or C-terminal (Cter) constructs of PUMA (panel a) and incubated for 24 h. Cells were stained with anti-FLAG and anti-HSP60 (mitochondria) primary antibodies, together with the corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibodies, green for the various PUMA constructs and red for HSP60. Cytosolic (S) and mitochondrion-enriched (P) fractions were studied by western blotting (panel c), to determine the subcellular distribution of the proteins. HeLa cells were transfected with the various constructs, in the absence of QVD-OPh, incubated for 24 h and apoptosis was assessed by flow cytometry (panel c). Mean values ± SD for triplicate experiments are reported.

anisomycin, PUMA was translocated to the mitochondria, where it interacted with Mcl-1 and Bcl-2 (Figure 4A panel b). Likewise, the mitochondrial PUMA β recombinant protein, which strongly induced cell death (Figure 3A and 3B), was able to bind Mcl-1, as demonstrated by cross-immunoprecipitation of transfected cell lysates with anti-FLAG (PUMA) and anti-Mcl-1 Abs (Figure 4B). Unlike the full-length PUMA ß and the C-terminal fragment, the N-terminal fragment, which was located in the cytosol, did not bind Mcl-1 (Supplementary Figure 4 panel c). Similar associations between PUMA and Bax or Bak proteins were not detected in our experimental conditions, either in activated BL41 cells or in transfected HeLa cells (data not shown). Nevertheless, both proteins seem to be required for the apoptotic properties of PUMA.

Indeed, transfection of deficient MEF cells for Bax or Bak promotes an intermediate level of apoptosis in these cells whereas double deficient cells for both Bax and Bak were resistant to apoptosis mediated by PUMA β recombinant (Supplementary Figure 5). Altogether, these data show that (i) translocation of PUMA to mitochondria leads to its association with the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and/or Bcl-2 and (ii) that apoptosis resulting from this translocation depends on both Bax and Bak.

The translocation of PUMA to the mitochondria is caspase-independent but p38-dependent

We assessed the dependence of PUMA translocation on caspases, given the key role that caspases are known

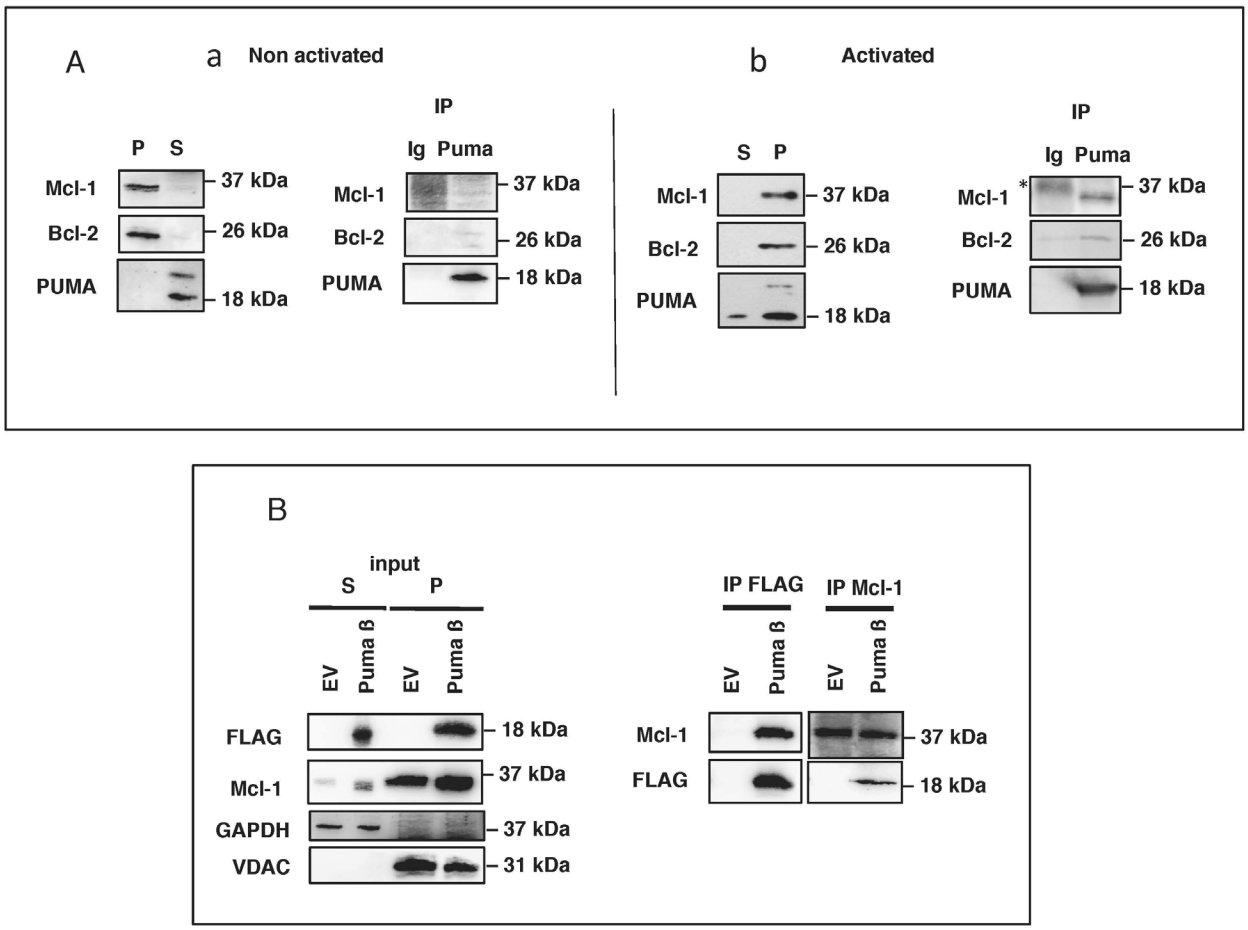


Figure 4: Mitochondrial PUMA binds to Mcl-1 and Bcl-2 in BL41 cells. A. BL41 cells were left untreated or were treated for 4 h with anisomycin (2 µg/ml). Cell lysates were prepared and fractionated. S and P fractions from non-activated (panel a) and activated (panel b) cells were tested for Mcl-1, Bcl-2 and PUMA by western blotting. PUMA was immunoprecipitated (IP) from the S fraction of unstimulated cells (panel a) and the P fraction of stimulated cells (panel b); the immunoprecipitate was tested for Bcl-2 and Mcl-1 by western blotting (* non-specific band). **B.** HeLa cells pretreated with 10 µM QVD-OPh were transfected with an empty vector (EV) or a full-length FLAG-tagged PUMA construct (PUMA ß), incubated for 24 h and lysed; cell lysates were separated into S and P fractions. The P fraction was subjected to IP with anti-FLAG or Mcl-1 antibodies. The resulting immune complexes were analyzed by western blotting with antibodies against PUMA (FLAG) or Mcl-1. VDAC and GAPDH were used as fraction purity controls for mitochondria and cytosol, respectively.

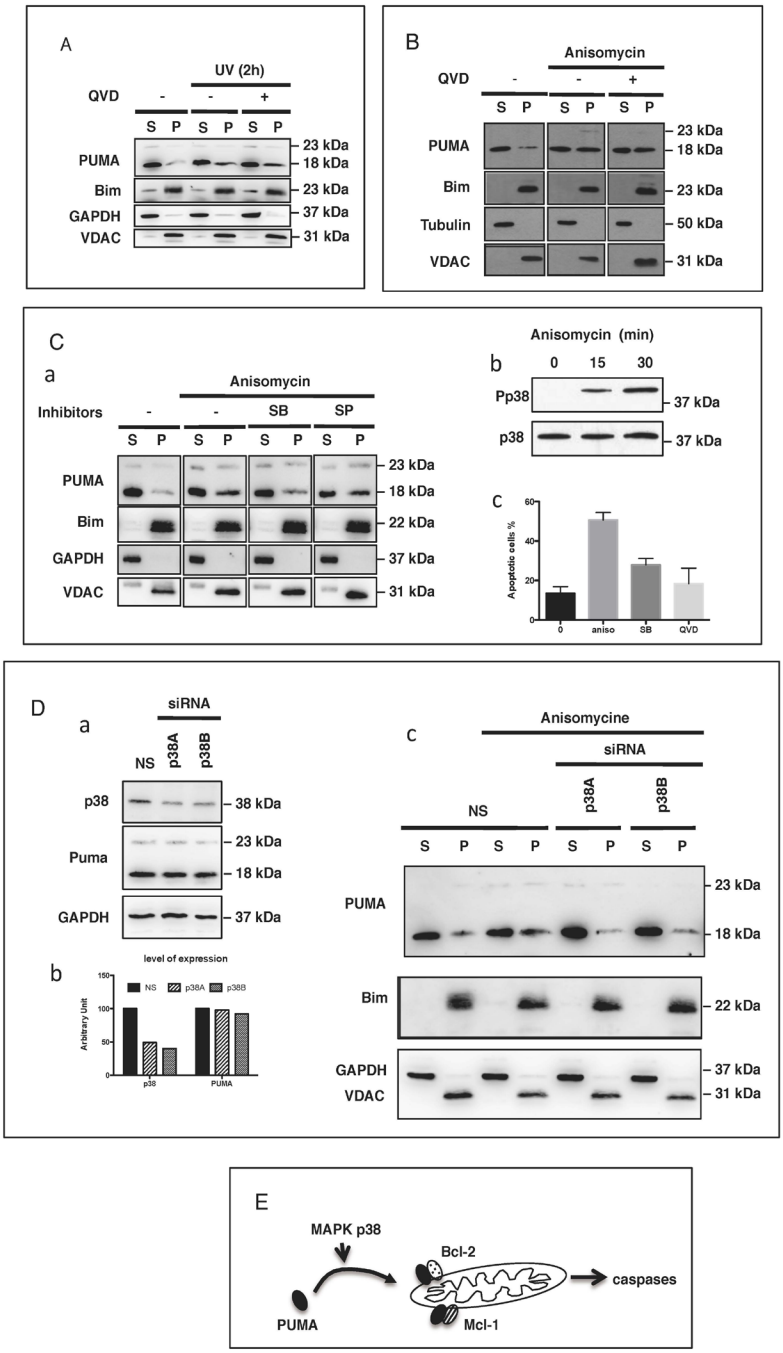


Figure 5: PUMA mitochondrial translocation (PMT) is caspase-independent but p38-dependent. A. HeLa cells were treated or mock-treated with QVD-OPh (10 μM) for 30 min then exposed to UV (6 mJ/cm^2) and cultured for an additional 2 h. The subcellular distribution of PUMA, Bim, GAPDH and VDAC was determined by subjecting western blotting the S and P fractions. **B.** BL41 cells treated or mock-treated with QVD-OPh (10 μM) were stimulated with anisomycin (2 μg/ml) for 4 h and the subcellular distributions of PUMA, Bim, tubulin and VDAC were determined by fractionation and western blotting. **C.** BL41 cells were treated or mock-treated with 10 μM SB203580 (SB) or 10 μM SP600125 (SP) for 30 min then stimulated for 4 h with anisomycin (2 μg/ml). The subcellular distributions of PUMA, cytochrome *c*, GAPDH and VDAC were analyzed by fractionation and western blotting (panel a). BL41 cells were treated with anisomycin (2 μg/ml) for 0, 15 or 30 min. Phosphorylated p38 levels were assessed by western blotting with an anti-phospho-p38 antibody (Pp38) and total p38 levels were assessed with an anti-p38 Ab (p38) (panel b). BL41 cells were treated or mock-treated with 10 μM SB203580 (SB) or 10 μM QVD-OPh for 30 min, then stimulated for 4 h with anisomycin (2 μg/ml), and apoptosis was assessed by flow cytometry (panel c). **D.** BL41 cells transfected with a non-targeting siRNA (NS) or a p38-targeting siRNA (p38A and p38B) for 76 h were treated for 0 (NS) or 4 h with anisomycin (2 μg/ml). The subcellular distributions of PUMA, Bim, GAPDH and VDAC were determined by western blotting the S and P fractions, and p38 knockdown efficiency was analyzed by western blotting with GAPDH as a loading control. **E.** Proposed model for the pathways regulating the translocation of PUMA to the mitochondria and role in apoptosis induction.

to play in apoptotic cell death. Prior treatment of BL41 cells with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh did not prevent the mitochondrial translocation of PUMA following UV exposure (Figure 5A) or treatment with apoptotic doses of anisomycin (Figure 5B). These findings suggest that caspase activation occurs downstream from the translocation of PUMA to the mitochondria. Various members of the MAPK family of kinases play a major role in early signaling. We investigated their possible role in controlling the translocation of PUMA to the mitochondria. We found that, following anisomycin treatment, the translocation of PUMA to the mitochondria was significantly decreased by the MAPK p38 inhibitor SB203580, whereas a more specific inhibitor of JNK (SP600125) had only a very weak effect (Figure 5C panel a). As a control, we checked that anisomycin promoted the phosphorylation and activation of p38 in our experimental conditions (Figure 5C panel b) and that the inhibition of p38 decreased anisomycin-mediated apoptosis (Figure 5C panel c). Furthermore, the siRNA-mediated downregulation of p38 was associated with inhibition of the anisomycin-induced translocation of PUMA to the mitochondria (Figure 5D). We also observed a very similar pattern in HeLa cells treated with UV: (i) p38 was phosphorylated (Supplementary Fig. 6 panel a) and (ii) and the decrease of p38 expression with specific siRNA (Supplementary Figure 6 panel b) inhibited the mitochondrial translocation of PUMA (Supplementary Figure 6 panel c). In this context, no change was observed in the levels of anti-apoptotic proteins, such as Bcl-XL which is present in large amounts in HeLa cells (Supplementary Figure 6 panel d). These findings are consistent with the notion that apoptotic stimuli (such as anisomycin or UV treatment) can induce the translocation of cytosolic PUMA to the mitochondria, in a p38-dependent manner. After reaching the mitochondria, PUMA can bind to and inhibit Mcl-1 and/or Bcl-2, thereby promoting mitochondrial activation and the subsequent activation of caspases and apoptosis (Figure 5E).

DISCUSSION

We describe here an original mechanism controlling PUMA activation: its translocation from the cytosol to the mitochondria. The pro-apoptotic activity of PUMA is believed to be largely controlled by the transcriptional and posttranslational regulation of its expression, through the modulation of its degradation. The general consensus is that once produced, PUMA is targeted to the mitochondria, where it can act as a pro-apoptotic protein [26], as observed in our experimental conditions after the synthesis of recombinant PUMA, eventually inducing cell death. However, in some conditions, the upregulation of PUMA may be associated with cell activation and proliferation rather than apoptosis. This situation has been observed, for example, during the activation of human B lymphocytes *in vitro* following stimulation of the BCR and CD40 receptor, or activation with mitogens, such as SAC [15]. *In vivo*, germinal center B cells and Burkitt's lymphoma cells (their tumoral counterpart) also produce large amounts of PUMA without the occurrence of cell death [15]. We show here that the role of PUMA in these non-apoptotic cells is dependent on its cytosolic localization. Our results also demonstrate that the translocation of PUMA from the cytosol to the mitochondria, in the absence of transcriptional regulation, is an alternative pathway for the expression of the pro-apoptotic activity of PUMA, at least in some cell types, including B lymphocytes. Our findings indicate that, in our system, PUMA must be "activated" by translocation to the mitochondria, to induce apoptosis. Several unanswered questions remain about the maintenance of PUMA in the cytosol. Other BH-3-only proteins are located in the cytoplasm or associated with the cytoskeleton. Bim and Bmf can be associated with skeleton structures, such as tubulin and actin [27, 28], respectively, whereas other proteins are sequestered in the cytoplasm through direct interaction with the chaperone protein 14-3-3 (Bad) or through interactions with unknown partners or in the absence of partners, as for Bid [18, 29, 30]. The subcellular distribution of endogenous PUMA has not been extensively studied. PUMA is generally described as mitochondrial, but one group reported interactions between PUMA and the cytosolic domain of the activated EGFR and EGFRvIII proteins, resulting in its cytosolic sequestration in glioblastoma cells [31]. We detected no interactions, in our cells, between PUMA and other members of the ErbB family (EGFR is not expressed by B cells), such as ErbB1, ErbB2, ErbB3 or ErbB4, which may be present at various levels in some B cells, such as multiple myeloma cells [32]. We have not yet identified any putative cytosolic partners of PUMA in B cells, although mass spectrometry analysis has suggested various potential candidates for further investigation. Alternatively p38 may mediate an increase in PUMA transcription, by activating p53, with or without c-Abl [33-35]. It therefore remains possible that the PUMA in the mitochondria was synthesized *de novo* rather than being translocated from the cytosol of non-apoptotic cells. However, this seems unlikely in our model, because (i) we observed no increase in PUMA mRNA levels in our experimental conditions and (ii) the mitochondrial translocation of PUMA was not prevented by the inhibition of protein synthesis.

Our data indicate that the C-terminal domain, rather than the BH3 domain, is crucial for the targeting of PUMA to mitochondria. Indeed, the N-terminal fragment containing the BH3 domain was located in the cytosol, whereas the C-terminal fragment was associated with mitochondria and able to induce the death of transfected cells. The BH3 domain is therefore not sufficient to target PUMA to mitochondria, whereas the C-terminal domain common to the α and β isoforms of PUMA and containing a putative transmembrane domain, is necessary for the

mitochondrial localization of the protein [36]. These findings suggest that the mitochondrial localization of PUMA involves the insertion of PUMA into the mitochondrial outer membrane rather than simple contact with mitochondrial outer membrane proteins [37]. Three issues need to be addressed: (i) the molecular structure of cytosolic PUMA, (ii) the molecular basis of its translocation to the mitochondria and (iii) the nature of the mitochondrial partners of PUMA.

Phosphorylation regulates the activity of many proteins. The MAPK family of kinases plays an important role in regulating the expression and localization of various BH3-only proteins. Indeed, Erk can phosphorylate Bim, driving its degradation by the proteasome [38] [20]. Phosphorylation by JNK may control the release of Bim and Bmf from tubulin and actin, respectively, and JNK-mediated Bid phosphorylation prevents Bid cleavage by caspase-8 and, thus, its activation [27, 28, 39-41]. Phosphorylation have been reported to affect Bim and PUMA degradation [20, 42, 43]. Sandow et al. recently reported that IKK-mediated phosphorylation of the PUMA S10 residue can induce the degradation of this protein by the proteasome [44]. Interestingly, the β isoform, major isoform present in human B cells ([15] [21] and this paper), lacks the S10 residue, suggesting other residues may be involved in a similar way. Indeed, Fricker et al. described also other phosphorylation sites besides S10 (the predominant one) whose effect on PUMA expression or function remains unknown [43]. It has also been suggested that p38 may trigger an increase in PUMA transcription *via* p53 (with or without c-Abl activation ([33] [35] [34]). This suggests that the PUMA associated with mitochondria might be newly synthesized rather than translocated from the cytoplasm. This is unlikely in our model because (i) there was no increase in PUMA mRNA levels in our experimental conditions and (ii) the translocation of PUMA to the mitochondria was observed in the presence of the protein synthesis cycloheximide. Thus, the translocation of PUMA to the mitochondria is dependent on p38 activation. We are therefore currently trying to determine whether (i) PUMA is phosphorylated upon apoptotic stimuli and (ii) a direct phosphorylation of PUMA by p38 is required for its translocation, and, if not, which targets of p38 might be involved

Once translocated to the mitochondria, PUMA can associate with other members of the Bcl-2 family [26]. Our data clearly show that, following apoptotic stimulation, PUMA can bind to and potentially inhibit both Mcl-1 and Bcl-2 in BL41 cells. This finding is consistent with previous demonstrations that the pro-apoptotic activity of PUMA depends on its capacity to interact with, and thereby inhibit the biologic activity of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, such as Mcl-1 and Bcl-2. However, there is evidence that PUMA may also associate with and directly activate the pro-apoptotic molecules Bax and Bak [23, 26, 45], although this remains to be demonstrated definitively. In our experimental conditions, we detected no direct association between PUMA and Bax or Bak. This implies that (i) no such association occurred in our experimental conditions or, more probably, (ii) no such association was detectable in the physiological conditions used (almost all the experiments showing such an interaction were performed with recombinant proteins) [23, 45, 46]. This is consistent with the "hit and run" model involving a transient interaction of PUMA with Bax and Bak [47-49]. Nevertheless, our data show that PUMA-mediated apoptosis is directly dependent on the production and function of both Bax and Bak, because, in the absence of these molecules, the mitochondrial translocation of PUMA does not lead to apoptosis.

PUMA, along with Bid and Bim, is a major regulator of apoptosis involved in the responses of various types of cells to a large panel of apoptotic stimuli. It is therefore important to determine whether the original mechanism observed in Burkitt's cells is also found in other cell types. We also observed the same cytosolic localization of PUMA in various multiple myeloma cell lines, the tumoral counterpart of normal plasma cells of the B-cell lineage (data not shown). We are currently studying the distribution of PUMA in a wide variety of tumor cells, to determine whether the presence of PUMA in the cytoplasm is restricted to lymphoid cells or is a more general feature as suggested by our observations in HeLa cells. Our data suggest that the accumulation of PUMA in the cytosol may be an important feature in the differentiation and tumorigenesis processes, allowing this protein to participate in the apoptotic process without the need for additional transcription.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

We used primary antibodies against the following proteins for immunoblotting (IB) and immunofluorescence staining (IF): PUMA (C-Term, 1652-1, clone EP512Y) and Bim (1036-1, clone Y36) from Abcam; Bax (N-20, sc-493), Bcl-2 (C-2, sc-7382), Bcl-XL (S18, sc-634), Bik (FC-160, sc-10770), HSP60 (N-20, sc-1052), Mcl-1 (S-19, sc-819), Tom20 (F-10, sc-17764), and tubulin (TU-02, sc-8035) from Santa Cruz Biotechnology; VDAC (AB10527) from Merck Millipore; cytochrome *c* (IB: 556433; IF: 556432) and PARP-1 (556362, clone C2-10) from BD Pharmingen; FLAG (F1804, clone M2) and GAPDH (G9545) from Sigma-Aldrich; NOXA (IMG-349A) from Imgenex; Bid (AF860) from R&D Systems; Bak (38145) caspase-3 (9662) and P-p38 (9211) from Cell Signaling Technology.

Anti-human IgM (DA.44) monoclonal antibodies from the American Type Culture Collection (ATCC) were

purified on protein A-Sepharose columns from Pharmacia Biotech. Anti-mouse IgM antibody was obtained from Jackson Immunotech.

The following reagents were used: anisomycin (A9789) and cycloheximide from Sigma-Aldrich; Q-VD-OPh (OPH001) and recombinant TRAIL from R&D Systems; N-tosyl-Phe chloromethyl ketone (TPCK, 616387) and SP600125 (420119) from Calbiochem and SB203580 (PHZ1253) from Life Technologies.

RNA interference

PUMA/BBC3 silencing was achieved with two small interfering RNAs (siRNA), BBC3HSS146895 and BBC3HS178326 referred to as "P1" and "P2" respectively. Medium GC duplex (12935-112) was used as a negative control. All these siRNA oligomers were purchased from Life Technologies. P38 silencing was achieved with 2 siRNAs, SASI_Hs01_00018465 and SASI_Hs01_00018464, referred to as "p38A" and "p38B" respectively, from Sigma-Aldrich. We assessed siRNA knockdown efficiency by western blotting.

Plasmid construction

The full-length cDNA for the human ß isoform of PUMA (kindly provided by Dr P. Juin, Nantes) was inserted into p3XFLAG-CMV-10 (Sigma-Aldrich, E7658). The sequences encoding N-terminal-BH3 (1-258) and C-terminal-BH3 (232-395) were amplified by PCR and ligated into the same plasmid. All constructs were checked by DNA sequencing.

Cell culture and DNA and siRNA transfections

The BL41, BL41 95.8, Ramos, Ramos AW, DAUDI and CA46 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium with GlutaMAX™, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 1 x nonessential amino acids (Life Technologies). HeLa and MEF cells were cultured in DMEM (Sigma, D0819) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.1 mg/ml Normocin™ (InvivoGen) and antibiotics. SV-40-transformed $Bax^{-/-}$, $Bak^{-/-}$, DKO and the corresponding wild-type (WT) MEF cells were generously provided by Stanley J Korsmeyer (Harvard Medical School, Boston, MA, USA).

BL41 cells were transfected with siRNA in the BTX-Harvard Apparatus ECM 830 Square Wave Electroporation System (Fisher Scientific). For each siRNA, $4x10^6$ BL41 cells were washed twice in RPMI 1640 without GlutaMAX™ and resuspended in 400 µl of medium in a cuvette, with 80 nmol of the appropriate siRNA. Cells were then electroporated at 240 V for 10 ms, and transferred to six-well plates in a final volume of 4 ml. The experiments were carried out 72 h later.

HeLa cells were transiently transfected with empty and PUMA-encoding p-CMV-neo vectors, with Fugene HD (Promega, E2311), according to the manufacturer's protocol or with 5 mol of the appropriate siRNA, with oligofectamine (Invitrogen, 12252-011). Cells were treated with Q-VD-OPh for 30 min, then transfected with DNA.

qPCR

RNA was extracted from the cultured cells with the RNeasy Plus mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Cell lysates for RNA extraction were obtained by homogenization with QIAshredder spin columns (Qiagen). We synthesized cDNA with the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). In brief, 5 µg RNA was combined with oligo $(dT)_{18}$ primer (10 µM), H_2O, 5x reaction buffer, 10 mM dNTP mix, RiboLock RNase inhibitor (20 U/µL) and RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase (200 U/µL). The mixture was incubated at 42°C for 60 minutes and then at 70°C for five minutes to stop the reaction. We carried out qPCR in a volume of 20 µl containing 5 µl undiluted cDNA, primers (0.75 µM final concentration) and Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). The following primers were used: PUMA (fw 5'-GACGACCTCAACGCACAGTA-3'; rv 5'- CTAATTGGGCTCCATCTCG-3')* and 18s (fw 5'-AGAAACGGCTACCACATCCA-3'; rv 5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3')** (SIGMA). PCR was performed on an Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies), as follows: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s. PCR efficiency was determined with 10-fold dilutions, as follows: Efficiency **E.** = $10^{(-1/slope)}$. The ratio of PUMA expression in treated cells to PUMA expression in untreated cells was determined as follows: Ratio = $((E_{PUMA})^{\Delta Ct\ PUMA\ (control-treated)})/((E_{18s})^{\Delta Ct\ 18s\ (control-treated)})$.

Immunofluorescence (IF) staining and confocal microscopy

Cells were fixed by incubation with 4% paraformaldehyde (Alfa Aesar, 43368) for 15 min, then permeabilized by incubation with 0.15% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, X100) for 15 min. Samples were blocked by incubation with 2% BSA (Sigma, A9576) for 30 min. The cells were incubated with relevant primary antibodies at a dilution of 1:400 for 1 h at room temperature or overnight at 4°C, then with the corresponding secondary antibodies conjugated with fluorescent dyes (Alexa Fluor®, Life Technologies), at 1:800, for 1 h at room temperature, in the dark. DAPI (Life Technologies,

D1306) was then incubated with the cells, at a dilution of 1:10,000 for five minutes, for nuclear staining and cells were mounted on cover slips in 7 µL of Fluoromount-G™ slide mounting medium (Beckman Coulter, 731604). Cells were washed three times with PBS between steps. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with a x63 oil immersion fluorescence objective.

Western blot analysis

Whole-cell lysates were prepared by incubation of the cells with TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton and 1% Igepal/NP-40), supplemented with Halt™ protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, 1861279) for 30 min. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 x *g* for 10 min. Cells were fractionated with the ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, 539790), according to the manufacturer's protocol. At least $4x10^6$ cells were lysed mechanically in 27G 1/2 Tuberculin syringes (Sigma, Z192082-100EA), in 200 µL of H60 buffer (20 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl) supplemented with the same protease inhibitor cocktail (18 back and forth movements), and fractionated by differential centrifugation (procedure detailed in Figure 1C). The P5 pellets were washed once in H60 buffer and lysed in TNT buffer with 1% SDS for 30 min. Protein quantity was measured with the microBCA protein assay kit (Thermo Scientific, 23235). Protein samples (usually 5 µg) were then boiled for 5 min at 99°C after the addition of Tris-Glycine SDS sample buffer (Life Technologies, LC2676) with 10% ß-mercaptoethanol (Sigma, M3148), separated on gradient 5-20% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Santa Cruz, sc-201698). The membranes were incubated with specific antibodies, and bound antibody was visualized by chemiluminescence with the Immobilon western chemiluminescence HRP substrate (Millipore, WBKLS0500) and a DDC camera (LAS-4000 mini, Fujifilm).

Immunoprecipitation

500 µl of whole cell lysates, cytosol fractions (S25) or mitochondria-enriched fractions (P5) were pre-cleared by adding 40 µl of protein G-sepharose beads (Sigma-Aldrich, P3296) and placed on a spinning wheel at 4°C. After 30 min, the beads were pulled down by centrifugation at 15,000g for 10 sec. The supernatant was collected and 2 µg of relevant antibody and 40 µl of protein G-sepharose beads were added, and the samples were spinned at 4°C for 2h. The beads were pulled down by centrifugation, and the supernatant discarded. Bound proteins were eluted from the beads with 30 µl of Tris-Glycine SDS sample buffer with 10% ß-mercaptoethanol. Samples were then analyzed by western blotting.

Detection of apoptotic cells

The dot-plot scatter profiles of the cells were analyzed by flow cytometry with a BD Accuri C6 Flow Cytometer® (BD Biosciences). Shrunken cells with high side scatter (SSC) and low forward scatter (FSC) were considered apoptotic. The number of apoptotic cells is expressed as a percentage of the total population.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by fellowships and grants from INSERM, *Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée),* and *Cancéropole IdF* (ERABL project). GA and NR hold fellowships from *Vaincre le Cancer-Nouvelles Recherches Biomédicales* (NRB) and the French Ministry of Research respectively.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no competing financial interests relating to this work to declare.

REFERENCES

1. Galonek HL and Hardwick JM. Upgrading the BCL-2 network. Nat Cell Biol. 2006; 8:1317-1319.
2. Youle RJ and Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9:47-59.
3. Huang DC and Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. Cell. 2000; 103:839-842.
4. Nakano K and Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell. 2001; 7:683-694.
5. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW and Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol Cell. 2001; 7:673-682.
6. Hershko T and Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. J Biol Chem. 2004; 279:8627-8634.
7. Li J, Lee B and Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. J Biol Chem. 2006; 281:7260-7270.
8. You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A and Mak TW. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. J Exp Med. 2006; 203:1657-1663.
9. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM and Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by

their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. Mol Cell. 2005; 17:393-403.

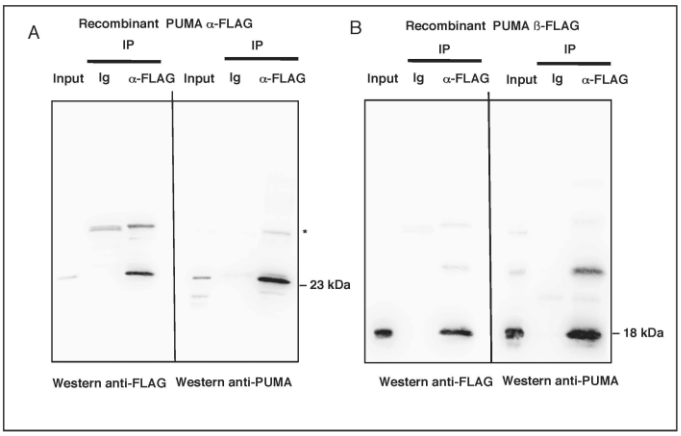
10. Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ and Cheng EH. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. Science. 2010; 330:1390-1393.
11. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu 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. 2001; 98:11318-11323.
12. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL and Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. Cancer Cell. 2003; 4:321-328.
13. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A and Villunger A. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells *in vivo*. Blood. 2005; 106:4131-4138.
14. Fischer SF, Belz GT and Strasser A. BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:3035-3040.
15. Clybouw C, Fischer S, Auffredou MT, Hugues P, Alexia C, Bouillet P, Raphael M, Leca G, Strasser A, Tarlinton DM and Vazquez A. Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma. Blood. 2011; 118:4120-4128.
16. 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. 1999; 144:891-901.
17. 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. 1997; 94:3668-3672.
18. 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. 1996; 87:619-628.
19. Clybouw C, McHichi B, Mouhamad S, Auffredou MT, Bourgeade MF, Sharma S, Leca G and Vazquez A. EBV infection of human B lymphocytes leads to down-regulation of Bim expression: relationship to resistance to apoptosis. Journal of immunology. 2005; 175:2968-2973.
20. Mouhamad S, Besnault L, Auffredou MT, Leprince C, Bourgeade MF, Leca G and Vazquez A. B cell receptor-mediated apoptosis of human lymphocytes is associated with a new regulatory pathway of Bim isoform expression. Journal of immunology. 2004; 172:2084-2091.
21. Hadji A, Clybouw C, Auffredou MT, Alexia C, Poalas K, Burlion A, Feraud O, Leca G and Vazquez A. Caspase-3 triggers a TPCK-sensitive protease pathway leading to degradation of the BH3-only protein puma. Apoptosis. 2010; 15:1529-1539.
22. Martin SJ and Cotter TG. Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis. Int J Radiat Biol. 1991; 59:1001-1016.
23. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM and Juin P. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. Mol Cell. 2004; 16:807-818.
24. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ and Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol. 2006; 8:1348-1358.
25. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM and Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes Dev. 2005; 19:1294-1305.
26. Chipuk JE and Green DR. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. Cell Cycle. 2009; 8:2692-2696.
27. 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. 1999; 3:287-296.
28. 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. 2001; 293:1829-1832.
29. 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. 1998; 94:481-490.
30. 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. 1998; 94:491-501.
31. Zhu H, Cao X, Ali-Osman F, Keir S and Lo HW. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocalization of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. Cancer Lett. 2010; 294:101-110.
32. Mahtouk K, Hose D, Reme T, De Vos J, Jourdan M, Moreaux J, Fiol G, Raab M, Jourdan E, Grau V, Moos M, Goldschmidt H, Baudard M, Rossi JF, Cremer FW and Klein B. Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. Oncogene. 2005; 24:3512-3524.
33. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E and Fornace AJ, Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates

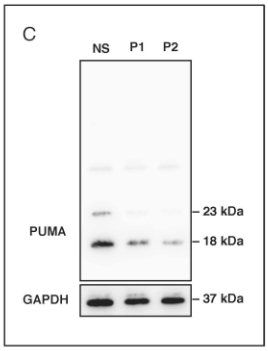
N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. The EMBO journal. 1999; 18:6845-6854.

34. Sridevi P, Nhiayi MK, Setten RL and Wang JY. Persistent inhibition of ABL tyrosine kinase causes enhanced apoptotic response to TRAIL and disrupts the pro-apoptotic effect of chloroquine. PloS one. 2013; 8:e77495.
35. Galan-Moya EM, Hernandez-Losa J, Aceves Luquero CI, de la Cruz-Morcillo MA, Ramirez-Castillejo C, Callejas-Valera JL, Arriaga A, Aranburo AF, Ramon y Cajal S, Silvio Gutkind J and Sanchez-Prieto R. c-Abl activates p38 MAPK independently of its tyrosine kinase activity: Implications in cisplatin-based therapy. International journal of cancer Journal international du cancer. 2008; 122:289-297.
36. Yee KS and Vousden KH. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. Apoptosis. 2008; 13:87-95.
37. Wilfling F, Weber A, Potthoff S, Vogtle FN, Meisinger C, Paschen SA and Hacker G. BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. Cell Death Differ. 2012; 19:1328-1336.
38. Luciano F, Jacquel A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G and Auberger P. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation *via* the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. Oncogene. 2003; 22:6785-6793.
39. Lei K and Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:2432-2437.
40. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y and Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. Cell. 2003; 115:61-70.
41. Prakasam A, Ghose S, Oleinik NV, Bethard JR, Peterson YK, Krupenko NI and Krupenko SA. JNK1/2 regulate Bid by direct phosphorylation at Thr59 in response to ALDH1L1. Cell Death Dis. 2014; 5:e1358.
42. Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A and Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. J Biol Chem. 2006; 281:25215-25222.
43. Fricker M, O'Prey J, Tolkovsky AM and Ryan KM. Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. Cell Death Dis. 2010; 1:e59.
44. Sandow JJ, Jabbour AM, Condina MR, Daunt CP, Stomski FC, Green BD, Riffkin CD, Hoffmann P, Guthridge MA, Silke J, Lopez AF and Ekert PG. Cytokine receptor signaling activates an IKK-dependent phosphorylation of PUMA to prevent cell death. Cell Death Differ. 2012; 19:633-641.
45. Dai H, Pang YP, Ramirez-Alvarado M and Kaufmann SH. Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. J Biol Chem. 2014; 289:89-99.
46. Azad A and Storey A. Chk1 activity is required for BAK multimerization in association with PUMA during mitochondrial apoptosis. Cell Commun Signal. 2014; 12:42.
47. 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. 2000; 14:2060-2071.
48. Kushnareva Y, Andreyev AY, Kuwana T and Newmeyer DD. Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. PLoS Biol. 2012; 10:e1001394.
49. Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K, Kriwacki RW and Green DR. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. Nat Struct Mol Biol. 2013; 20:589-597.

Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells

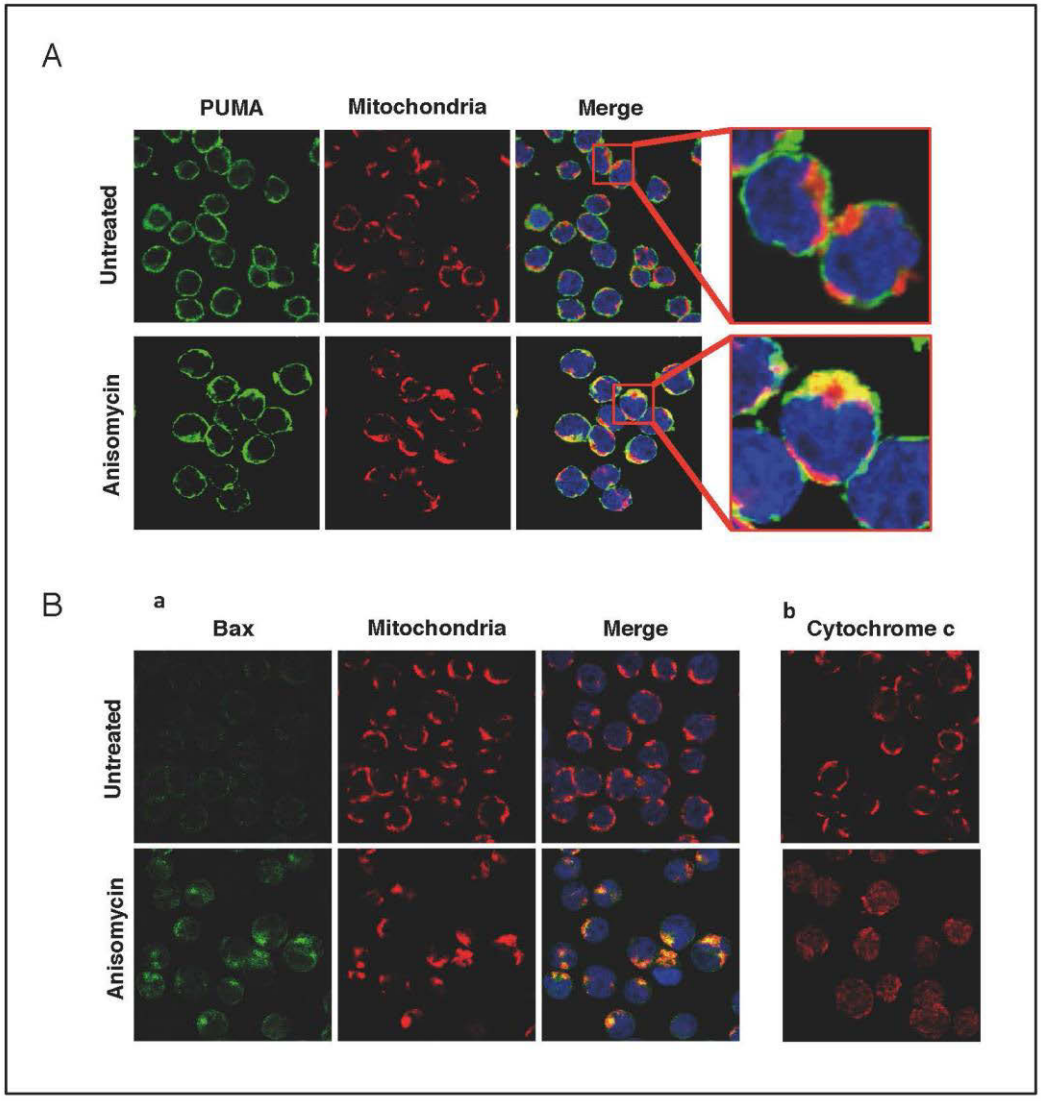
Supplementary Material





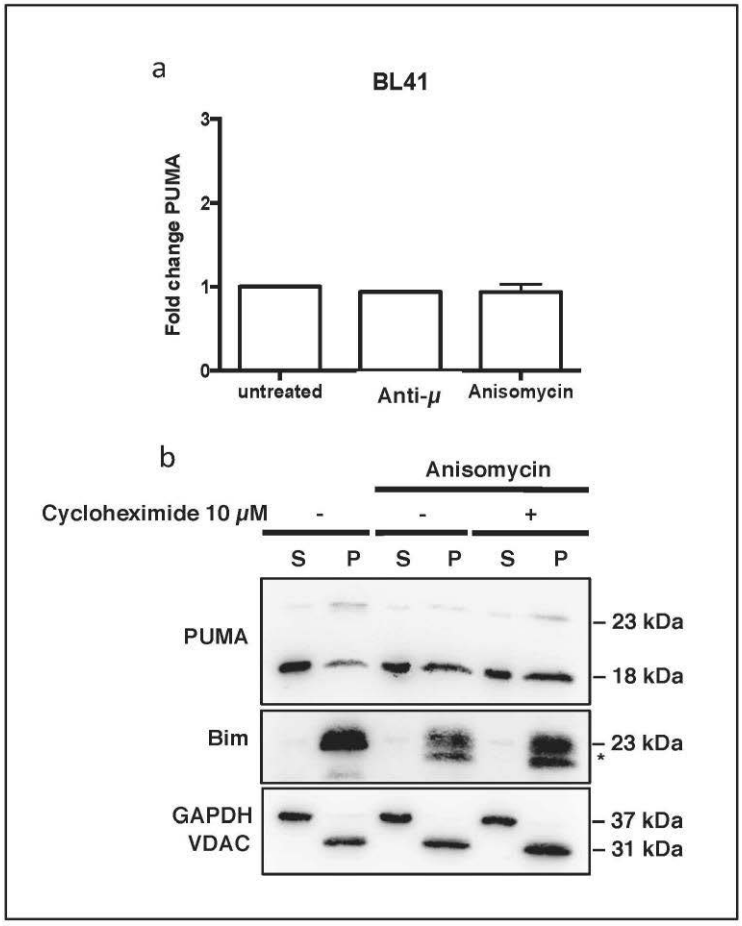
Supplementary Figure 1: The anti-PUMA Ab **(**clone EP512Y from Abcam) recognize both α and ß isoforms of PUMA.

Recombinant FLAG-tagged PUMA ß (**A**) or FLAG-tagged PUMA α (**B**) proteins were immunoprecipitated with the anti-FLAG Ab. The immunoprecipitates were analyzed for the presence of PUMA α (23 kDa) or PUMA ß (18 kDa) by western blotting with anti-FLAG or anti-PUMA (clone EP512Y from Abcam) Abs. (* non-specific band). BL41 cells were transfected with a non-targeting siRNA (NS) or PUMA-targeting siRNA (P1 and P2) for 76 h and PUMA levels were assessed by western blotting with the anti-PUMA Ab **(**clone EP512Y).



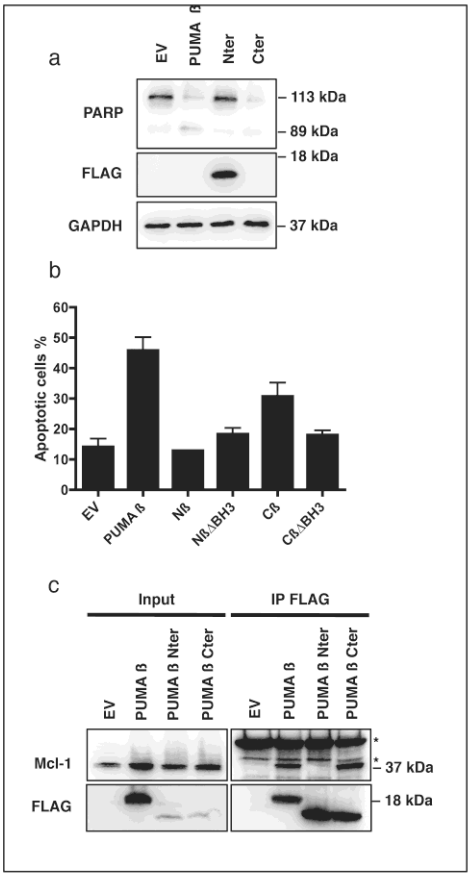
Supplementary Figure 2: PUMA translocates to the mitochondria upon anisomycin-induced apoptosis.

BL41 cells were stimulated with anisomycin (2 µg/ml) for 0 or 4 h, and then stained with anti-PUMA (**A**) or anti-Bax (**B: a**) and anti-TOM20 primary antibodies, together with the corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibodies, green for PUMA and Bax or red for TOM20, for analysis of the subcellular distributions of PUMA and Bax by confocal microscopy. (**B: b**) BL41 cells were stimulated as in A and B and stained with anti-cytochrome *c* primary antibodies and secondary antibodies conjugated to a red fluorochrome, to analyze cytochrome *c* release, the hallmark of mitochondrial apoptosis.



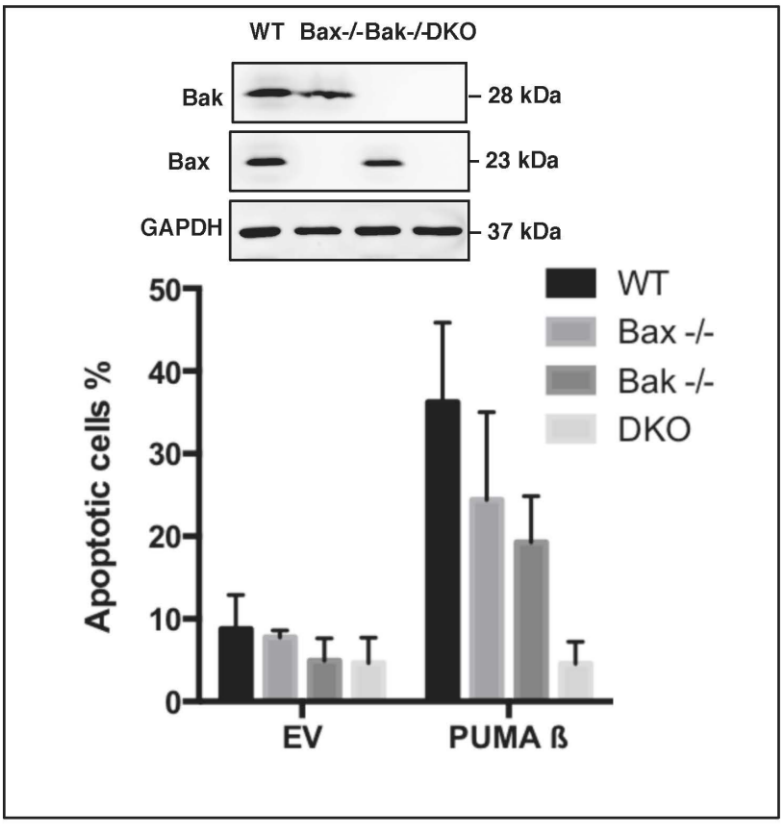
Supplementary Figure 3: Mitochondrial translocation of PUMA is not dependent o de novo protein synthesis.

BL41 cells were stimulated with mouse anti-human μ antibodies (5 μg/ml) cross-linked with anti-mouse IgM antibodies (28 μg/ml) or anisomycin (2 μg/ml) and PUMA mRNA levels were quantified by qPCR (panel a). Mean values +/- S.D. of three different experiments. BL41 cells were treated or mock-treated with 10 μM cycloheximide for 30 min, followed by anisomycin (2 μg/ml) for 4 h, and the subcellular distributions of PUMA, Bim, GAPDH and VDAC were determined by western blotting the S and P fractions.



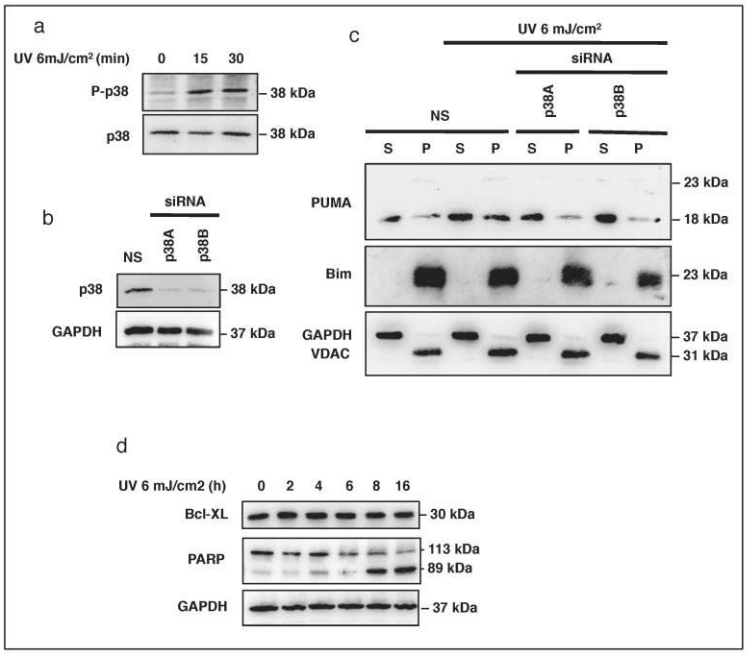
Supplementary Figure 4: N-ter and C-ter PUMA differ in their apoptotic properties.

(panel a) HeLa cells were transfected with an empty vector (EV) or full-length PUMA ß (Puma ß), N-terminal (Nter) or C-terminal (Cter) constructs of PUMA (panel a) and incubated for 24 h. PARP-1 cleavage and recombinant protein production were assessed by western blotting with anti-PARP anti-FLAG Abs, respectively. (**panel b**) HeLa cells were transfected with an empty vector (EV) or full-length PUMA ß (Puma ß), N-terminal (Nß), BH3-deleted N-terminal (NßΔBH3), C-terminal (Cter) or BH3-deleted C-terminal (CßΔBH3) constructs of PUMA (panel a) and incubated for 24 h. Apoptosis was assessed by flow cytometry. Mean values ± SD of triplicate experiments are reported. (**panel c**) HeLa cells were transfected with an empty vector (EV) or full-length PUMA ß (Puma ß), N-terminal (Nter) or C-terminal (Cter) constructs of PUMA (panel a) and incubated for 24 h. Cell lysates were subjected to IP with an anti-FLAG antibody. The resulting immune complexes were analyzed by western blotting with antibodies against PUMA (FLAG) or Mcl-1.



Supplementary Figure 5: PUMA-mediated apoptosis is dependent of Bax and Bak expression.

Bax-/-, Bak-/- or Double Knock Out (DKO, Bax-/- Bak-/-) MEF cells and their wild-type (WT) counterparts were transfected with an EV or Puma ß vector, incubated for 24h, and apoptosis was assessed by flow cytometry. The values reported are means +/- S.D. of triplicate experiments. Bak, Bax and GAPDH expression, analyzed by western blotting, in the three cell lines is shown in the inset.



Supplementary Figure 6: *UV-mediated mitochondrial translocation of PUMA is 38 dependent.*

(**panel a**) HeLa cells were exposed to UV (6 mJ/cm^2) and cultured for 0, 15 or 30 min. Phosphorylated (Pp38) and total p38 were analyzed by western blotting. (**panel b**) Hela cells were transfected with a non-targeting siRNA (NS) or a p38-targeting siRNA (p38A and p38B) for 48h and p38 expression was assessed by western blotting. GADPH was used as a loading control. (**panel c**) Hela cells were transfected with a non-targeting siRNA (NS) or a p38-targeting siRNA (p38A or p38B) for 48h, subjected to UV exposure (6 mJ/cm2) and then left in culture for 2h. The subcellular localization of Puma, Bim, GAPDH and VDAC was determined by subjecting S and P fractions to western blotting. (**panel d**). HeLa cells were exposed to UV (6 mJ/cm2) and cultured for the indicated time. Bcl-XL expression and PARP-1 cleavage were assessed by western blotting.

Les résultats présentés dans cet article suggèrent qu'au lieu d'un seul niveau de régulation de la fonction de PUMA, correspondant au contrôle de son expression, notamment via la stimulation de sa transcription par de nombreux facteurs de transcription, tels que p53, FoxO3a et CHOP par exemple, deux niveaux existent. En effet, dans certains cas, comme lors de l'activation de lymphocytes B par l'agent mitogénique SAC, l'augmentation importante de l'expression de PUMA ne suffit pas à induire l'apoptose. Nous avons montré que dans ces cellules, la fonction pro-apoptotique de PUMA était inhibée par sa localisation cytosolique. Cependant, un signal apoptotique permet d'activer PUMA en induisant sa translocation au niveau de la mitochondrie où cette protéine peut conduire à l'apoptose en inhibant les anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 notamment. Les anti-apoptotiques, et Mcl-1 en particulier, sont surexprimés dans les cancers et sont associés à une résistance aux radio- et chimiothérapies. Inhiber leur fonction pour tuer les cellules tumorales est donc une approche qui est largement explorée, via le développement de *BH3 mimetics,* mimant le domaine BH3 des protéines BH3-only, par exemple. L'inhibition des anti-apoptotiques peut néanmoins aussi passer par la diminution de leur expression dans la cellule. Mcl-1 est une protéine labile dont la dégradation par le protéasome dépend de son ubiquitination au niveau de lysines spécifiques. Cette ubiquitination est sous le contrôle de ligases d'ubiquitine E3 capables de la catalyser et de déubiquitinases capables d'hydrolyser ces chaînes d'ubiquitine. Au cours de ma thèse, nous avons identifié un nouveau régulateur de l'ubiquitination et de la dégradation de Mcl-1, USP14.

ARTICLE II

Deubiquitinase USP14 promotes Mcl-1 stabilization and cell survival in HeLa cells

Gorbatchev Ambroise, Alain Portier, Aimé Vazquez

La déubiquitinase USP14 stabilise Mcl-1 et contribue à la survie des cellules HeLa.

Gorbatchev Ambroise, Alain Portier, Aimé Vazquez
(en préparation/à soumettre)

Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 qui contribue à maintenir l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie en inhibant les protéines pro-apoptotique de cette famille, comme PUMA. Cette fonction est mise à profit par les cancers qui, pour assurer leur développement ont besoin d'inhiber l'apoptose, leur permettant de ne pas succomber aux stress importants auxquels ces cellules sont soumises. Ainsi, une surexpression de Mcl-1 est observée dans de nombreux cancers et est associée à une résistance aux radio- et chimiothérapies. L'étude de la régulation de son expression occupe donc une place non négligeable dans le domaine de la recherche contre le cancer, matérialisée par la publication de plus de 300 articles liés à celle-ci chaque année depuis 2012 selon PubMed. Mcl-1, tout comme son ARNm, a une demi-vie très courte, n'excédant pas quelques heures. En effet, après sa synthèse, la protéine Mcl-1 est très rapidement dégradée par le protéasome. Cette dégradation est induite par l'ubiquitination de Mcl-1. Il a été montré que plusieurs ligases d'ubiquitine E3 étaient capables de catalyser cette ubiquitination, comme Mule par exemple. Cependant, une seule déubiquitinase (DUB) capable de cliver ces chaînes d'ubiquitine au niveau de Mcl-1 a été décrite, USP9X. De manière intéressante, l'inhibition de la fonction de USP9X dans les cellules HeLa par l'intermédiaire de siRNA, ne permettait pas de déstabiliser la protéine Mcl-1 en favorisant sa dégradation par le protéasome. Cette observation suggérait que d'autres DUBs pouvaient potentiellement prendre en charge la déubiquitination de Mcl-1 dans ces cellules. Nous avons donc immunoprecipité Mcl-1 dans nos cellules puis identifié ses partenaires potentiels par spectrométrie de masse. Parmi les candidats obtenus, USP14, une DUB associée au protéasome a particulièrement retenu notre attention parce que son activité était inhibée par la molécule WP1130 qui entraînait une diminution de l'expression de Mcl-1 lorsque les cellules HeLa étaient cultivées en sa présence. L'extinction de cette protéine via l'utilisation de siRNA, nous a permis de montrer que USP14 était capable de réguler négativement et de manière spécifique l'ubiquitination de Mcl-1 ainsi que sa dégradation par le protéasome. De plus, de manière importante, l'inhibition de l'activité de USP14 à l'aide de la molécule b-AP15 était associée à une induction massive de l'apoptose, indiquant que USP14 régulerait la survie des cellules HeLa à travers l'inhibition de la dégradation de Mcl-1.

Cette étude apporte donc 3 informations majeures. La première est que USP9X n'est pas la seule DUB capable de stimuler la déubiquitination de Mcl-1 et pourrait ne pas jouer un rôle important dans la déubiquitination de Mcl-1 dans tous les types cellulaires, et notamment les cellules HeLa. La deuxième est l'identification d'un nouveau régulateur de ce processus, USP14 et la dernière, l'apport d'un mécanisme expliquant la mort cellulaire des cellules induite par les inhibiteurs de USP14.

Deubiquitinase USP14 promotes Mcl-1 stabilization and cell survival in HeLa cells

Gorbatchev Ambroise[1,2,3], Alain Portier[1,2,3], Aimé Vazquez[1,2,3]*

From [1]INSERM, UMR_S 1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France. [2]Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France. [3]Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif 94800, France.

* Corresponding author: A. Vazquez, INSERM U.1197, Batiment Lavoisier, Hôpital Paul Brousse, 14 ave Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif, France. Tel: 33-1-49-59-52-65; Fax: 33-1-45-59-53-43; E-mail: aime.vazquez@inserm.fr

Keywords: Bcl-2 family, Mcl-1, ubiquitination, USP14, apoptosis

Abstract:

The Bcl-2 family, consisting of pro-apoptotic members kept in check by anti-apoptotic members in healthy cells, plays a decisive role in controlling the activation of the intrinsic (mitochondrial, Bcl-2-regulated) apoptotic pathway leading to the activation of caspases and cell death. Among the anti-apoptotic members, Mcl-1, a protein overexpressed in various cancers and involved in chemoresistance, is unique. Indeed, Mcl-1 has a very short turnover ensued from its rapid degradation by the proteasome. This degradation depends on the ubiquitylation of Mcl-1, catalyzed by E3 ubiquitin ligases (E3) and thwarted by deubiquitinases (DUB). A handful of E3s have been reported to carry Mcl-1 ubiquitylation while only one DUB, USP9X was proposed to be undoing their work. However, USP9X was unable to regulate Mcl-1 expression in HeLa cells, suggesting that other DUB(s) could be involved in Mcl-1 deubiquitylation. We therefore undertook to identify new DUBs involved in Mcl-1 deubiquitylation by immunoprecipitating Mcl-1 in our cells and analyzing its potential partners by mass spectrometry. Among the candidates obtained, USP14, a DUB associated with cell proliferation, and a secondary target of the USP9X inhibitor WP1130, was able to specifically promote Mcl-1 ubiquitylation and degradation when knocked down. Conversely, when overexpressed, Mcl-1 expression was markedly increased. Moreover, inhibition of USP14 activity by b-AP15, triggered apoptosis in HeLa cells. Thus, we identified a new regulator of Mcl-1 deubiquitylation in HeLa cells.

INTRODUCTION

Mcl-1 is an anti-apoptotic protein that belongs to the Bcl-2 family. This family regulates the intrinsic (mitochondrial, Bcl-2 regulated) apoptotic pathway by controlling the release of apoptogenic factors such as cytochrome c from mitochondria. It consists of two major antagonist groups, the pro-apoptotic members (eg. : Bax, Bak, Bim and PUMA), kept in check by the anti-apoptotic members of the family (eg. : Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-XL) in healthy cells [1]. It has been shown that an overexpression of anti-apoptotic proteins protected cells from apoptotic stimuli [2]. Unfortunately, cancer cells take advantage of this key feature to allow proliferation and escape cell death [3]. Indeed, Mcl-1 is overexpressed in several hematologic cancers [4-6] and solid tumors [7, 8], including chronic myeloid leukemia and hepatocellular carcinoma, and is also involved in chemo resistance [9, 10], making it a very attractive therapeutic target. Mcl-1 is a labile protein with a very short half-life and is degraded by the proteasome. Mcl-1 degradation by the proteasome depends on its ubiquitylation. Several E3 ubiquitin ligases have been reported to carry Mcl-1 ubiquitylation, such as Mule [11], β-TrCP [12], FBW7 [13] and TRIM17 [14], among others. This ubiquitylation can be catalyzed without (Mule) or following a degradation signal corresponding to the phosphorylation of Mcl-1 on specific serines and threonines by GSK-3 (the others). However, only one deubiquitinase (DUB), USP9X, was shown to deubiquitinylate and stabilize Mcl-1 [15]. We showed that this DUB was not able to stabilize Mcl-1 in HeLa cells, leading us to investigate the involvement of other DUBs in this process. We therefore immunoprecipitated Mcl-1 in our cells and a mass spectrometry analysis enabled us to identify USP14 as a new regulator of Mcl-1 ubiquitylation and degradation by the protesome. Indeed, in absence of USP14, ubiquitylation of Mcl-1 was increased, its expression decreased and interestingly, apoptosis was triggered when USP14 activity was inhibited.

RESULTS

The expression of Mcl-1 is not regulated by the DUB USP9X in HeLa cells

To confirm Mcl-1 rapid turnover, we treated HeLa cells with the inhibitor of translation cycloheximide for different times, ranging from 0 up to 4h. As it has been previously shown by others [16-18], Mcl-1 expression collapsed very rapidly. Indeed, Mcl-1 half-life was shorter than 2h in our cells (Figure 1A). This snap loss of Mcl-1 was dependent on proteasome degradation since the inhibition of its activity by MG132 thwarted the decrease of Mcl-1 expression in presence of cycloheximide and a significant accumulation of Mcl-1 was observed when cells were treated with MG132 alone (Figure 2B). We also showed that the inhibition of the proteasome by MG132 promoted the accumulation of ubiquitylated forms of Mcl-1 (Figure 1C). This result is in agreement with an ubiquitin-dependent degradation of Mcl-1 by the proteasome [19]. Indeed, it has been shown that Mcl-1 ubiquitylation can be catalyzed by different E3 ubiquitin ligases and so far, only one DUB, USP9X has been shown to rescue Mcl-1 from degradation by hydrolyzing its ubiquitin chains [15]. To investigate the role of this DUB in the regulation of Mcl-1 in HeLa cells, we transfected them with USP9X-targeting siRNAs or non-targeting siRNA for control (Figure 1C). Surprisingly, the knock down of USP9X had no significant impact on Mcl-1 expression despite the fact that inhibition of its activity by the molecule WP1130 [20] could promote a decrease in Mcl-1 expression (Figure 1E). This result suggested that other DUBs could potentially be involved in Mcl-1 deubiquitylation in HeLa cells.

USP14 regulates Mcl-1 degradation and survival of HeLa cells

To identify new DUBs that could carry Mcl-1 deubiquitylation, we undertook to immunoprecipitate Mcl-1 in our cells and analyzed its potential partners by mass spectrometry. Several DUBs were thereby found to be interacting with Mcl-1. Among them, interestingly, USP14, also inhibited by the partly selective DUB inhibitor WP1130 [20] was found. To investigate its potential role in regulating Mcl-1 expression, we transfected HeLa cells with USP14-targeting siRNAs or non-targeting siRNA (Figure 2B). Knock down of USP14 was associated with a significant decrease in Mcl-1 expression. Importantly, the expression of other members of the Bcl-2 family such as the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL, and the pro-apoptotic BH3-only proteins PUMA and Bim was unaffected (Figure 2 B and C). Moreover, knock down of USP14 did not affect the expression of another protein

known to have a short half-life, cFLIP either [21], suggesting that USP14 was specifically regulating Mcl-1 expression. On the contrary, overexpression of USP14 led to a marked increase in Mcl-1 expression. USP14 is a peculiar DUB. Indeed, like POH1 and UCH37/UCH-L5, it is associated with the proteasome. However, unlike POH1 that performs ubiquitin chain amputation by cleaving entire chains from substrates in a process coupled to degradation [22, 23], USP14 and UCH37/UCH-L5 trim ubiquitin chains from distal end in a process that slow down or even thwart degradation by the proteasome. This similarity in localization and function of USP14 and UCH37/UCH-L5, led us to investigate UCH37/UCH-L5 potential involvement in Mcl-1 degradation. Interestingly, like USP9X knock down, knock down of UCH37/UCH-L5 did not promote Mcl-1 degradation, strengthening the apparent specificity of USP14 in Mcl-1 degradation (Figure 2F). Furthermore, inhibition of USP14 activity with b-AP15 was associated with the cleavage of effector caspase-3 substrate PARP and apoptosis. Importantly, inhibition of caspase activation by QVD-OPh did not significantly inhibit Mcl-1 decrease, suggesting that the decrease in Mcl-1 expression observed after inhibition of USP14 was upstream of caspase activation (Figure 2G).

Altogether, these results suggest that the activity of USP14 is important for HeLa survival and that USP14 regulates Mcl-1 degradation.

Mcl-1 ubiquitylation and degradation are increased when USP14 is knocked down

Mcl-1 degradation by the proteasome is under the control of its ubiquitylation. Since USP14 was able to regulate Mcl-1 degradation, we investigated whether it could also negatively regulate Mcl-1 ubiquitylation. Indeed, Mcl-1 ubiquitylation was dramatically increased when USP14 was knocked down in HeLa cells (Figure 3A). Moreover, Mcl-1 was accumulating more when USP14 was knocked down and cells treated with the proteasome inhibitor MG132 for 0, 2 and 4h (Figure 3B). These data indicate that USP14 regulates Mcl-1 degradation by promoting its deubiquitylation.

DISCUSSION

The regulation of Mcl-1 expression and degradation depend on the ubiquitin/proteasome system [19]. Indeed, ubiquitylation of Mcl-1 promotes its degradation by the proteasome, while the opposite reaction, its deubiquitylation inhibits its degradation and promotes its stabilization. So far, only the deubiquitinase (DUB) USP9X has been reported to hydrolyze K48-linked ubiquitin chains anchored to Mcl-1 [15]. However, we showed that knock down of USP9X is not associated with an increase in Mcl-1 degradation in HeLa cells. This result, indicating that USP9X was not involved in the turnover of Mcl-1 in HeLa cells, suggested that other DUBs could regulate Mcl-1 expression in these cells. Mcl-1 immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis helped us identify a new regulator of Mcl-1 ubiquitylation and degradation, USP14. USP14 is one of the three proteasome-associated DUBs with UCH37/UCH-L5 and POH1 [24]. It is involved in the amputation of K48-linked ubiquitin chains prior to substrate degradation by the proteasome [25]. Thus, USP14 is able to stop the ubiquitin signal and keep a stable amount of free ubiquitin available in the cell. Moreover, it has been reported that the activity of this DUB depends on its interaction with the proteasome [26]. Here, we showed that USP14 is able to specifically inhibit Mcl-1 ubiquitylation and degradation by the proteasome. Indeed, unlike USP9X or UCH37/UCH-L5, knock down of USP14 promoted Mcl-1 ubiquitylation and degradation, without affecting the expression of other members of the Bcl-2 family or cFLIP, another protein with a short half-life, in HeLa cells. The fact that USP14 but not UCH37/UCH-L5 could regulate Mcl-1 degradation suggests that these two proteins associated with the proteasome could have different substrates. However, further experiments are needed to assess whether the inhibition of Mcl-1 degradation involve its direct deubiquitylation by USP14. Importantly, we also showed that inhibition of USP14 by b-AP15 both promoted caspase-independent Mcl-1 decrease of expression and apoptosis in HeLa cells, suggesting that USP14 positively regulates survival of HeLa cells, potentially through Mcl-1 stabilization. Overexpression of USP14, like Mcl-1, has been associated with cancer. Indeed, overexpression of USP14 is observed in colorectal cancer [27], hepatic cholangiocarcinoma [28] and lung carcinoma [29]. Interestingly, it has been shown that USP14 regulates cell proliferation and apoptosis in ovary cancer [30]. Inhibitors of USP14, like b-AP15, have therefore been developed. However, how they promote apoptosis in cancer cells is still poorly understood. Here, we present a mechanism by which inhibition of USP14 could lead to cell death. Indeed, our results indicate that lack of USP14 activity enhance the degradation of the anti-apoptotic

protein Mcl-1, thereby weakening resistance to cell death.

1. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
2. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Aichberger, K.J., et al., *Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides.* Blood, 2005. **105**(8): p. 3303-11.
5. Le Gouill, S., et al., *Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma.* Cell Cycle, 2004. **3**(10): p. 1259-62.
6. Breitenbuecher, F., et al., *A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML.* Blood, 2009. **113**(17): p. 4063-73.
7. Fleischer, B., et al., *Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma.* Int J Oncol, 2006. **28**(1): p. 25-32.
8. Henson, E.S., X. Hu, and S.B. Gibson, *Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 845-53.
9. Song, L., et al., *Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells.* Cancer Biol Ther, 2005. **4**(3): p. 267-76.
10. Thallinger, C., et al., *Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4185-91.
11. Zhong, Q., et al., *Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis.* Cell, 2005. **121**(7): p. 1085-95.
12. Ding, Q., et al., *Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 4006-17.
13. Inuzuka, H., et al., *SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction.* Nature, 2011. **471**(7336): p. 104-9.
14. Magiera, M.M., et al., *Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons.* Cell Death Differ, 2013. **20**(2): p. 281-92.
15. Schwickart, M., et al., *Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival.* Nature, 2010. **463**(7277): p. 103-7.
16. Nijhawan, D., et al., *Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation.* Genes Dev, 2003. **17**(12): p. 1475-86.
17. Yang, T., K.M. Kozopas, and R.W. Craig, *The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2.* J Cell Biol, 1995. **128**(6): p. 1173-84.
18. Liu, H., et al., *Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3117-26.
19. Mojsa, B., I. Lassot, and S. Desagher, *Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein.* Cells, 2014. **3**(2): p. 418-37.
20. Kapuria, V., et al., *Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis.* Cancer Res, 2010. **70**(22): p. 9265-76.

21. Poukkula, M., et al., *Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail.* J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27345-55.
22. Yao, T. and R.E. Cohen, *A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome.* Nature, 2002. **419**(6905): p. 403-7.
23. Verma, R., et al., *Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome.* Science, 2002. **298**(5593): p. 611-5.
24. Lee, M.J., et al., *Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes.* Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(5): p. R110 003871.
25. Hu, M., et al., *Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14.* EMBO J, 2005. **24**(21): p. 3747-56.
26. Leggett, D.S., et al., *Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function.* Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 495-507.
27. Shinji, S., et al., *Ubiquitin-specific protease 14 expression in colorectal cancer is associated with liver and lymph node metastases.* Oncol Rep, 2006. **15**(3): p. 539-43.
28. Chuensumran, U., et al., *Ubiquitin-specific protease 14 expression associated with intrahepatic cholangiocarcinoma cell differentiation.* Asian Pac J Cancer Prev, 2011. **12**(3): p. 775-9.
29. Wu, N., et al., *Over-expression of deubiquitinating enzyme USP14 in lung adenocarcinoma promotes proliferation through the accumulation of beta-catenin.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 10749-60.
30. Wang, Y., et al., *Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer.* Med Oncol, 2015. **32**(1): p. 379.

Antibodies and reagents

Primary antibodies used for immunoblotting were PUMA (ab33906, clone EP512Y) and Bim (ab32158, clone Y36) from Abcam; USP14 (6E6, sc-100630), Bcl-2 (C-2, sc-7382), Bcl-XL (S18, sc-634), Mcl-1 (S-19, sc-819), cFLIP (G-11, sc-5276), Tubulin (TU-02, sc-8035) from Santa Cruz Biotechnology; VDAC (AB10527) from Merck Millipore; PARP-1 (556362, clone C2-10) from BD pharmingen; FLAG (F1804, clone M2), GAPDH (G9545) from Sigma-Aldrich and USP9X (H00008239-M07) from Abnova.
Reagents used were cycloheximide (C4859) from Sigma-Aldrich, Q-VD-OPh (OPH001) from R&D systems; MG132 (474787) and b-AP15 (662140) from Calbiochem and WP1130, kindly provided by Nick Donato (Michigan).

RNA interference

UCH37/UCH-L5, USP9X and USP14 silencing was achieved by using 2 different small interfering RNAs (siRNA), SASI_Hs01_00142742 and SASI_Hs01_00142743, SASI_Hs01_00031439 and SASI_Hs02_00308597, and SASI_Hs01_00016087 and SASI_Hs01_00016089, respectively. One negative control siRNA (SIC002) was used. All these siRNA oligomers were purchased from SIGMA Aldrich. siRNA knockdown efficiency was assessed by western blot analysis.

Plasmids

Plasmids encoding for EGFP (EX-EGFP-M14) and USP14 (EX-M0584-M14) were purchased from GeneCopoeia, Inc.

Cell culture and DNA or siRNA transfections

HeLa cells were cultured in DMEM medium (Sigma, D0819) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.1 mg/ml Normocin™ (InvivoGen) and antibiotics.
Transient transfections of HeLa cells with either non-targeting or relevant siRNAs were performed using Oligofectamine (Invitrogen, 12252-011) according to manufacturer's protocol, and their transfections with control eGFP or USP14 encoding vectors were performed using Fugene HD (Promega, E2311) according to manufacturer's protocol.

Western Blot analysis

Whole cell lysates were prepared in TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton and 1% Igepal/NP-40), supplemented with Halt™ Protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, 1861279). Cells were lyzed for 30 min and lysates clarified by 10,000g centrifugation for 10 min. Protein quantity was then assessed by using the microBCA protein assay kit (Thermo Scientific, 23235). Protein samples (usually 5 µg) were then boiled for 5 min at 99°C after addition of Tris-Glycine SDS sample buffer (Life Technologies, LC2676) with 10% β-mercaptoethanol (Sigma, M3148), separated on gradient 5-20% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Santa Cruz, sc-201698) prior to incubation with specific antibodies. Western blots were then visualized by chemiluminescence using Immobilon Western chemiliminescent HRP substrate (Millipore, WBKLS0500) and a DDC camera (LAS-4000 mini, Fujifilm).

Analysis of Mcl-1 ubiquitylation

After transfection and/or treatment, cells were collected, then lysed for 30 min in 100 µL of TNT buffer supplemented with Halt™ Protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, 1861279) and 1% Triton X-100 (SIGMA Aldrich, X100). Lysates were then boiled for 15 min at 99°C. Triton was then diluted by adding 400 µL of TNT buffer. The obtained lysates were first pre-cleared by adding 40 µL of protein G-sepharose beads (Sigma-Aldrich, P3296) and placed on a spinning wheel at 4°C. After 30 min, beads were pulled down by 15,000g centrifugation for 10 sec. Supernatent was collected and 2 µg of Mcl-1 antibody was added along with 40 µL of protein G-sepharose beads and let spinning at 4°C. After 2h, beads were pulled down, supernatent discarded and elution was made using 30 µL of Tris-Glycine SDS sample buffer with 10% β-mercaptoethanol. Samples were then submitted to western bolt analysis.

Detection of apoptotic cells

The dot plot scatter profile of cells was analysed by flow cytometry using a BD accuri C6 Flow Cytometer® (BD Biosciences). Shrunken cells featuring high side scatter (SSC) and low forward scatter (FSC) were considered apoptotic. The number of apoptotic cells was then expressed as a percentage of total population.

Figure 1: USP9X does not regulate Mcl-1 expression in HeLa cells.

(A) HeLa cells were treated with the inhibitor of translation, cycloheximide (10 μM) for the indicated times. Expression of Mcl-1 was then analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control. (B) HeLa cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 (10 μM) and/or the inhibitor of translation, cycloheximide (10 μM) for 0 or 4h. The expression of Mcl-1 was then analyzed by western blot. Tubulin was used as a loading control. (C) HeLa cells were treated as in (B) and immunoprecipitation of Mcl-1 was performed under denaturing conditions (see Material and Methods). Mcl-1 ubiquitinylation and expression was then analyzed by western blot using the relevant antibodies. (D) HeLa cells were transfected with a non-targeting siRNA or a USP9X-targeting siRNA (A or B). After 48h, cells were collected and expression of USP9X and Mcl-1 was analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control. (E) HeLa cells were treated with the deubiquitinase (DUB) inhibitor WP1130 (5 μM) for 16h and expression of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-XL was analyzed by western blot. HSP60 was used as a loading control. The different targets of WP1130 are also shown.

Figure 2: USP14 regulates specifically Mcl-1 expression, and survival of HeLa cells

(A) HeLa cells were transfected with non-targeting siRNA or a USP14-targeting siRNA (A or B). After 48h, cells were collected and expression of USP14 and Mcl-1 were analyzed by western blot. VDAC was used as a loading control. (B, C, D) HeLa cells were transfected as in (A). After 48h, expression of either USP14 and the anti-apoptotic proteins Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-XL (B) or USP14, Mcl-1 and the pro-apoptotic BH3-only proteins PUMA and Bim (C) or Mcl-1 and cFLIP, a protein with a short half-life, were analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control. (E) HeLa cells were transfected with a plasmid encoding a full length FLAG-tagged USP14 (vUSP14-FLAG) or the same plasmid encoding FLAG-tagged eGFP (eGFP-FLAG). After 24h, cells were collected and expression of Mcl-1, and overexpressed USP14 and eGFP were analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control. (F) HeLa cells were transfected with a non-targeting siRNA or with USP9X-, USP14-, UCH-L5-targeting siRNAs. After 48h, cells were collected and expression of USP14 and Mcl-1 were analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control. (G) HeLa cells were pre-treated with or without QVD-OPh (QVD, 10 μM) for 30 min and then treated with the USP14 inhibitor b-AP15. At the indicated times, cells were collected, and PARP cleavage and Mcl-1 expression were analyzed by western blot. GAPDH was used as a

loading control. The percentage of shrunk cells, considered as apoptotic was assessed by flow cytometry.

Figure 3: Mcl-1 ubiquitylation and degradation are enhanced when USP14 is knocked down

(A) HeLa cells were transfected with a non-targeting siRNA or an USP14-targeting siRNA (A or B). After 48h, cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 (10 μM) for 4h and immunoprecipitation of Mcl-1 was performed under denaturing conditions (see Material and Methods). USP14 expression and Mcl-1 ubiquitylation and expression were then analyzed by western blot using the relevant antibodies. (B) HeLa cells were transfected as in (A). After 48h, cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 (10 μM). At the indicated times, cells were collected and expression of USP14 and Mcl-1 were analyzed by western blot. GAPDH was used as a loading control.

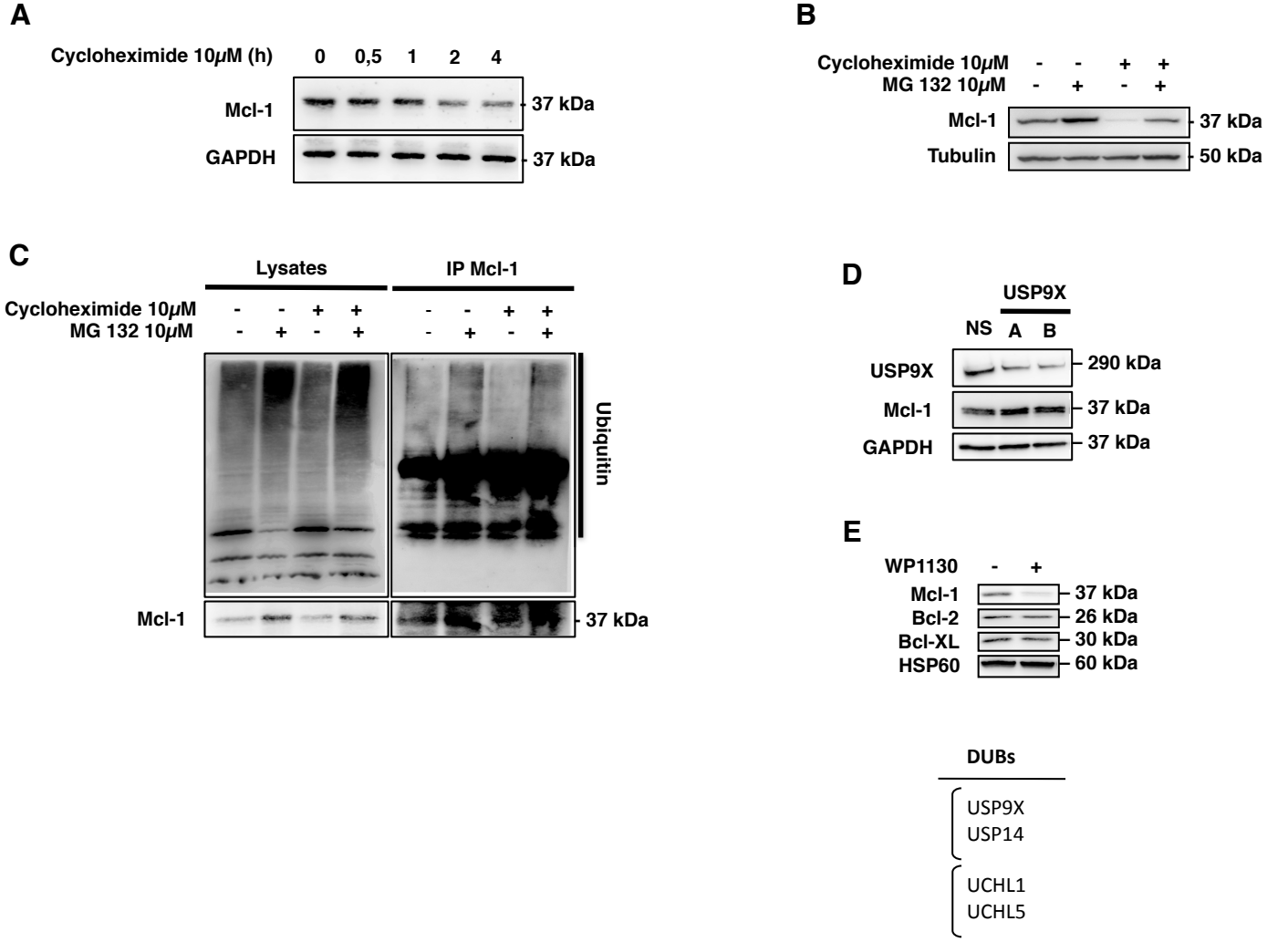

A
Cycloheximide 10μM (h)
0
0,5
1
2
4
Mcl-1
37 kDa
GAPDH
37 kDa
B
Cycloheximide 10μM
MG 132 10μM
Mcl-1
37 kDa
Tubulin
50 kDa
C
Lysates
IP Mcl-1
Cycloheximide 10μM
MG 132 10μM
Ubiquitin
Mcl-1
37 kDa
D
USP9X
NS
A
B
USP9X
290 kDa
Mcl-1
37 kDa
GAPDH
37 kDa
E
WP1130
Mcl-1
37 kDa
Bcl-2
26 kDa
Bcl-XL
30 kDa
HSP60
60 kDa
DUBs
USP9X
USP14
UCHL1
UCHL5

Figure 1

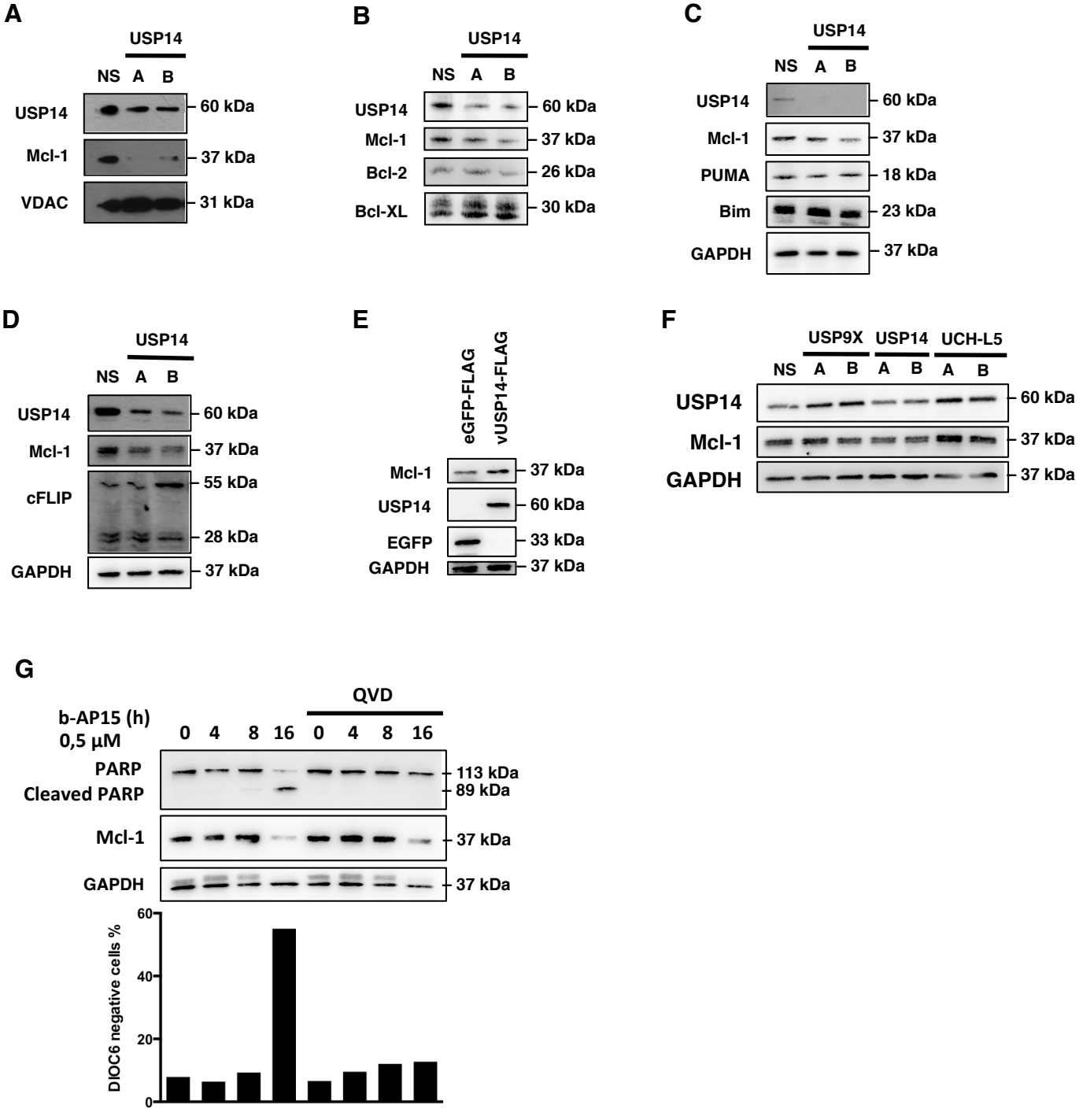

A
USP14
NS A B
USP14
Mcl-1
VDAC
60 kDa
37 kDa
31 kDa
B
USP14
NS A B
USP14
Mcl-1
Bcl-2
Bcl-XL
60 kDa
37 kDa
26 kDa
30 kDa
C
USP14
NS A B
USP14
Mcl-1
PUMA
Bim
GAPDH
60 kDa
37 kDa
18 kDa
23 kDa
37 kDa
D
USP14
NS A B
USP14
Mcl-1
cFLIP
GAPDH
60 kDa
37 kDa
55 kDa
28 kDa
37 kDa
E
eGFP-FLAG
vUSP14-FLAG
Mcl-1
USP14
EGFP
GAPDH
37 kDa
60 kDa
33 kDa
37 kDa
F
USP9X USP14 UCH-L5
NS A B A B A B
USP14
Mcl-1
GAPDH
60 kDa
37 kDa
37 kDa
G
QVD
b-AP15 (h)
0,5 µM
0 4 8 16 0 4 8 16
PARP
Cleaved PARP
Mcl-1
GAPDH
113 kDa
89 kDa
37 kDa
37 kDa
DIOC6 negative cells %
60
40
20
0

Figure 2

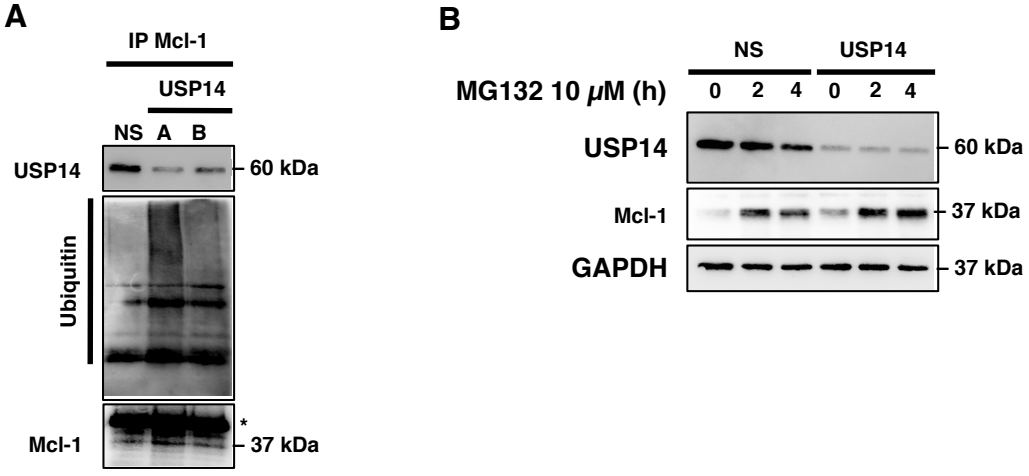

A
IP Mcl-1
USP14
NS A B
USP14
60 kDa
Ubiquitin
Mcl-1
*
37 kDa
B
NS
USP14
MG132 10 μM (h)
0 2 4 0 2 4
USP14
60 kDa
Mcl-1
37 kDa
GAPDH
37 kDa

Figure 3

DISCUSSION

Denis Diderot était un écrivain, philosophe et encyclopédiste français. Avec l'aide de D'alembert, il a notamment dirigé la rédaction de l' « Encyclopédie ou dictionnaire des sciences, des arts et des métiers », un ouvrage majeur paru au cours du siècle des lumières. Cette œuvre colossale (17 volumes de texte et 11 volumes de planches) rassemblait l'ensemble des connaissances de l'époque et pourrait être assimilée à une version « archaïque » d'internet et de son index PubMed que l'on a à notre disposition de nos jours dans le domaine des sciences. Il a dit un jour : « On doit exiger de moi que je cherche la vérité, mais non que je la trouve », ce qui, transposé au domaine de la recherche pourrait correspondre à une vision « romantique » s'écrasant brutalement contre la loi inébranlable du « *publish or perish* » qui régit le fonctionnement de la recherche aujourd'hui.

Il a aussi dit que « Les choses dont on parle le plus parmi les hommes sont assez ordinairement celles qu'on connaît le moins ». On parle de la mort cellulaire dans le développement depuis le milieu du XIXe siècle et formellement de l'apoptose depuis 1972 et l'article de Kerr, Wyllie et Currie, introduisant le terme et décrivant les modifications morphologiques qui l'accompagnent (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Bien que des progrès significatifs et marquants aient été réalisé dans la compréhension des mécanismes qui gouvernent cette mort cellulaire programmée, la dissection approfondie du réseau formé avec les autres voies de signalisation ainsi que l'étude détaillée de l'activation de certains acteurs de l'apoptose sont encore à réaliser (Siddiqui, Ahad, & Ahsan, 2015).

Deux voies différentes interviennent dans le déclenchement de l'apoptose, la voie apoptotique extrinsèque et la voie apoptotique intrinsèque. La voie apoptotique intrinsèque ou mitochondriale est caractérisée par la formation de pores au niveau de la mitochondrie, à l'origine de la libération du cytochrome c dans le cytosol, point de non retour dans la voie, qui est suivi par l'activation des caspases et le démantèlement de la cellule (Danial & Korsmeyer, 2004). Contrairement au processus entier de l'apoptose, depuis le signal initial jusqu'à la destruction de la cellule, qui peut prendre des heures ou des jours, il se passe environ 10 min entre la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale et l'activation efficace des caspases (Green, 2005). La famille Bcl-2 est celle qui décide du moment auquel ce compte à rebours est lancé. Elle est composée de membres pro-apoptotiques tenus en échec par des protéines anti-apoptotiques dans les cellules vivantes (Youle & Strasser, 2008). Les pro-apoptotiques sont classés en deux groupes, les effecteurs Bax et Bak, directement responsables de la formation des pores au niveau de la mitochondrie et les BH3-only, stimulés par les différents stress cellulaires et capables d'activer ces derniers. La protéine PUMA (p53-

Upregulated Modulator of Apoptosis) fait partie de ce dernier sous-groupe. Elle a un puissant pouvoir pro-apoptotique lié au fait qu'elle est capable d'inhiber le répertoire anti-apoptotique dans son ensemble et est impliquée dans la réponse à de nombreux signaux apoptotiques, dépendants ou non de p53 (Yu & Zhang, 2008). Durant ma thèse, nous avons caractérisé une nouvelle voie contrôlant son activité.

I. COMMENT PUMA EXCERCE SA FONCTION PRO-APOPTOTIQUE ?

Notre équipe s'est beaucoup intéressée à l'apoptose initiée par des stimuli variés dans les lymphomes B. Ainsi, la mort induite par les cations divalents, comme le manganèse (El Mchichi, Hadji, Vazquez, & Leca, 2007; Schrantz et al., 1999) ou le zinc (Schrantz, Auffredou, et al., 2001), les cytokines comme le TGF-β (Clybouw et al., 2008; Schrantz, Bourgeade, et al., 2001) ou l'activation du BCR (Besnault et al., 2001; Clybouw et al., 2009; Mouhamad et al., 2004) ont été étudiés. Cependant, c'est en analysant l'expression des différents membres de la famille Bcl-2 suite à une activation mitogénique de cellules B issues d'amygdales humaines que l'on a observé une augmentation significative et spécifique de l'expression du BH3-only PUMA (Clybouw et al., 2011). Bien que cette augmentation n'était pas accompagnée d'une élévation concomitante de l'expression des anti-apoptotiques, non seulement elle ne menait pas à l'apoptose de ces cellules mais en plus, de manière surprenante, elle était corrélée à une prolifération cellulaire. Ceci suggérait que ces cellules, par un mécanisme *a priori* indépendant des protéines anti-apoptotiques, étaient capables d'inhiber la fonction anti-apoptotique de PUMA.

Les premiers travaux rapportant l'identification de PUMA, une cible transcriptionnelle du suppresseur de tumeur p53, ainsi que des travaux ultérieurs de l'équipe de Vousden KH, ont rapidement établi que cette protéine était mitochondriale à partir d'expériences dans lesquelles PUMA était surexprimé (Nakano & Vousden, 2001; Yee & Vousden, 2008; Yu, Zhang, Hwang, Kinzler, & Vogelstein, 2001). Cependant, ces observations, combinées au fait que certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 soient exprimés au niveau du cytosol (Bad (Zha, Harada, Yang, Jockel, & Korsmeyer, 1996) et Bax (Wolter et al., 1997), par exemple) et la publication de travaux récents rapportant une localisation cytosolique de PUMA (H. Zhu, Cao, Ali-Osman, Keir, & Lo, 2010), nous ont amené à analyser la localisation subcellulaire de PUMA dans notre système après l'activation de ces cellules. A l'aide de 2 techniques de fractionnement cellulaire, l'une utilisant un kit commercial de chez

calbiochem (539790) et l'autre faisant intervenir des étapes successives de centrifugations différentielles, associées à l'immunofluorescence, nous avons mis en évidence une localisation cytosolique de PUMA dans les cellules B activées et des lignées cellulaires issues de lymphome de Burkitt infectées ou non par le virus EBV (Epstein Barr Virus).
PUMA est une protéine qui, en plus de son domaine fonctionnel BH3, contient un signal de localisation mitochondrial (ou MLS, Mitochondrial Localization Signal), cela amène à se questionner sur le ou les mécanisme(s) permettant cette localisation « ectopique ».

1) Comment PUMA peut-elle être cytosolique dans notre système ?

Deux options sont possibles, soit la protéine PUMA est exprimée de façon monomérique au niveau du cytosol, soit elle y est séquestrée.
Est-il possible que la protéine PUMA soit exprimée de façon monomérique au niveau du cytosol ? Comme mentionné précédemment, PUMA possède un MLS. Etre exprimé au niveau du cytosol de manière monomérique, impliquerait que ce domaine hydrophobe soit dissimulé. Deux exemples existent au sein de la famille Bcl-2 de protéines cytosoliques rapportée comme étant monomériques, Bax et Bid. En effet, Bax est principalement exprimée sous forme monomérique dans le cytosol (voir Figure 1 de notre papier) et sa queue hydrophobe est masquée dans sa poche hydrophobe à sa surface et libérée après son activation par des BH3-only tels que Bim ou Bid, voire PUMA, permettant sa translocation au niveau de la membrane externe de la mitochondrie au sein de laquelle elle va s'oligomériser et qu'elle va perforer pour induire la libération du cytochrome c et l'apoptose, à travers l'activation des caspases via la formation de l'apoptosome (Antonsson, Montessuit, Lauper, Eskes, & Martinou, 2000; Antonsson, Montessuit, Sanchez, & Martinou, 2001; Lovell et al., 2008; Nechushtan, Smith, Hsu, & Youle, 1999; Suzuki, Youle, & Tjandra, 2000). Bid, comme Bax, a une structure globulaire dans le cytosol, proche de celles des protéines anti-apoptotiques (Billen, Shamas-Din, & Andrews, 2008; McDonnell, Fushman, Milliman, Korsmeyer, & Cowburn, 1999). Suite à l'induction de l'apoptose, Bid peut être clivé par les caspases, perdre sa structure tridimensionnelle et transloquer au niveau de la mitochondrie sous une forme tronquée active de 15 kDa (tBid) pour amplifier le signal apoptotique (H. Li, Zhu, Xu, & Yuan, 1998; Puthalakath & Strasser, 2002). PUMA est une protéine à domaine BH3 seul, par conséquent, elle est dépourvue des 3 autres domaines BH présents dans la protéine Bax, l'empêchant ainsi de pouvoir masquer son domaine MLS elle-même au sein d'un sillon

hydrophobe similaire à celui de Bax. L'absence de ce sillon hydrophobe, rend la possibilité que PUMA soit exprimée au niveau du cytosol dans une conformation proche de celle de Bax quasiment nulle. De plus, PUMA, comme la vaste majorité des BH3-only (Bid étant une exception), est décrite comme étant un protéine intrinsèquement déstructurée dont le domaine BH3 se structure au contact de la poche hydrophobe de ses partenaires (Hinds et al., 2007; Rautureau, Day, & Hinds, 2010), il est donc tout aussi improbable que PUMA se comporte comme la protéine Bid.

A la vue de ces remarques, la protéine PUMA ne semble donc pas être exprimée de manière monomérique au niveau du cytosol. PUMA est-elle alors séquestrée au niveau du cytosol par une autre protéine ?

C'est le cas du BH3-only Bad qui, lorsqu'il est phosphorylé par Akt ou PKA peut être séquestré par les protéines chaperonne 14-3-3, prévenant sa translocation à la mitochondrie et l'induction de l'apoptose (Danial, 2008). Bien que dans les cellules BL41, Bim soit associé à Mcl-1 (Clybouw et al., 2008) et soit retrouvé au niveau de la fraction enrichie en mitochondries dans les expériences que j'ai réalisées, et que ces observations aient été reproduites ailleurs (Bunin, Khwaja, & Kersh, 2005; Gomez-Bougie, Bataille, & Amiot, 2004; Seward, von Haller, Aebersold, & Huber, 2003; Y. Zhu et al., 2004), il a été rapporté que Bim pouvait être associé au complexe moteur dynéine et que cette interaction dépendait de son motif DKST (acides aminés 51-4) (Puthalakath, Huang, O'Reilly, King, & Strasser, 1999), alors que le BH3-only Bmf, impliqué dans la mort par anoïkis (mort initiée par le détachement cellulaire), serait associé aux filaments d'actine de façon dépendante de la séquence en acides aminés DKA (acides aminés 67-9) (Puthalakath et al., 2001). Qu'en est-il de PUMA ? Des travaux de Zhu H et al, ont montré que PUMA pouvait être séquestré au niveau du cytosol via une interaction directe avec le récepteur à l'EGF activé dans les cellules de glioblastome (H. Zhu et al., 2010). Cependant, ils ne se sont pas intéressés aux régions de PUMA et du récepteur importantes pour cette interaction, ni à une éventuelle modification post-traductionnelle de PUMA. Comment et pourquoi ces protéines interagissent entre elles reste donc une question ouverte. Aucune interaction avec les autres membres de la famille ErbB (le récepteur à l'EGF n'est pas exprimé par les cellules B), ErbB1/2/3/4 n'a été détectée dans nos cellules. Nous avons aussi écarté l'hypothèse d'une interaction de PUMA avec le cytosquelette pour 2 raisons principales. La première est que lorsque les cellules B activées et les cellules BL41 sont fractionnées à l'aide d'un kit commercial, PUMA est retrouvé très majoritairement au niveau de la fraction I cytosolique alors qu'il n'est pas détectable dans la

fraction IV contenant les éléments du cytosquelette comme la tubuline (Figure 1). La deuxième est que PUMA ne possède pas de motifs proches de ceux de Bim (DKST) ou Bmf (DKA). PUMA semble néanmoins avoir un partenaire au niveau du cytosol.

Des expériences de réticulation montrent que comme lorsque PUMA est exprimé à la mitochondrie suite à sa surexpression, dans des conditions basales, PUMA est présent dans un complexe protéique (Figure 38). En effet, suite à la surexpression de PUMA dans des cellules HEK293T, deux bandes distinctes apparaissent après réticulation, une première aux alentours de 45kDa qui pourrait correspondre à son interaction avec Bcl-2 (26 kDa) et une autre entre 55 et 70 kDa qui pourrait correspondre à son interaction avec Mcl-1 (38 kDa). Dans les cellules à l'état basal, on observe l'apparition d'une bande située entre 25 et 35 kDa qui pourrait correspondre à l'interaction de PUMA avec une protéine d'une vingtaine de kDa.

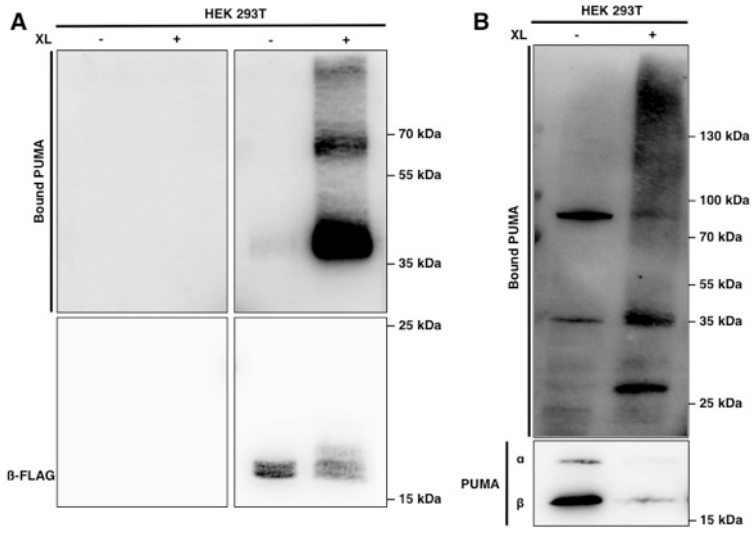


Figure 38 - PUMA interagit avec une protéine d'une vingtaine de kDa au niveau du cytosol. (A) Des cellules HEK293T ont été transfectées par la méthode de précipitation de phosphate de calcium en présence de chloroquine (6 premières h puis changement de milieu) avec un vecteur vide ou un plasmide codant l'isoforme β de la protéine PUMA portant une étiquette FLAG. Après 24h, les cellules ont été collectées puis lysées. Une réticulation a ensuite été réalisée selon le protocole du fabricant en utilisant le DSS (Sigma-Aldrich) (XL : cross-link). L'expression de PUMA a ensuite été analysée par western blot. (B) Des cellules HEK293 ont été lysées, puis le lysat cellulaire a été soumis à une réticulation comme dans (A). L'expression de PUMA a ensuite été analysée par western blot.

Nous avons donc entrepris de faire une immunoprécipitation de PUMA dans la fraction cytosolique de nos cellules et ensuite d'analyser par spectrométrie de masse les partenaires potentiels de PUMA. L'étape suivante consisterait dans un premier temps à transfecter nos cellules avec des siRNA dirigés contre ces partenaires potentiels et d'analyser leur viabilité par FACS. En effet, si ces protéines contribuent à séquestrer PUMA au niveau du cytosol,

leur extinction devrait permettre à PUMA de transloquer au niveau de la mitochondrie et ainsi d'induire la mort cellulaire.

Les travaux rapportés dans notre article montrent une localisation cytosolique de PUMA dans les cellules B. Il serait intéressant de savoir si cette localisation est marginale et restreinte à ce type cellulaire ou si au contraire elle est plus générale.

2) Quelle est la localisation de PUMA dans les autres types cellulaires ?

D'après nos résultats, l'expression de PUMA semble être stimulée et PUMA être localisé au niveau du cytosol des cellules B activées : les cellules B purifiées à partir d'amygdales humaines activées avec l'agent mitogénique SAC (*Staphylococcus aureus* strain Cowan 1) ou les lignées cellulaires issues du lymphome de Burkitt (Abastado, 2015), qu'elles soient infectées (BL41 95.8 et Ramos AW) ou non (DAUDI, CA46, BL41, Ramos) par EBV.

Dans tous les autres types cellulaires qui ont été soumis à un fractionnement, on observe qu'au moins la moitié de la quantité totale de PUMA est exprimée au niveau du cytosol (Figure 39).

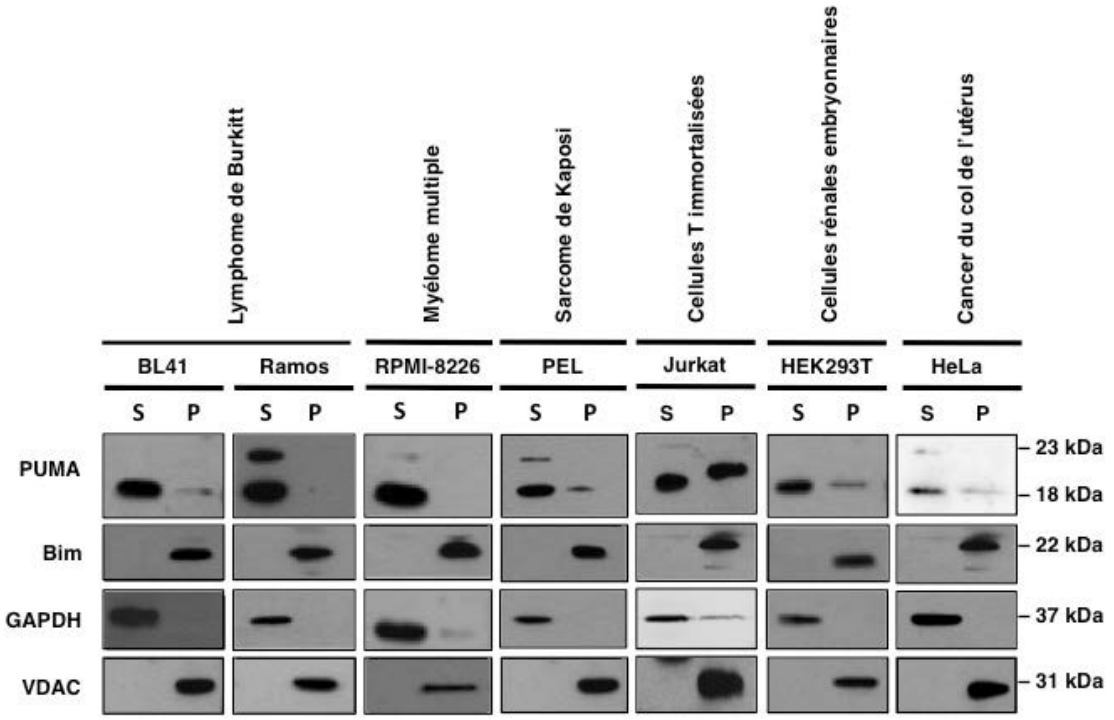


Figure 39 - Localisation subcellulaire de PUMA dans différents types cellulaires

En effet, PUMA est exprimé majoritairement au niveau du cytosol des cellules RPMI-8226, issues de myélome multiple, des PEL (Primary Effusion Lymphoma cells, ou sarcome de

Kaposi), des cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney cells) ou encore les cellules HeLa (HEnrietta LAcks, issues d'un cancer du col de l'utérus de cette dame). Seules les Jurkats (lignée cellulaire de lymphocytes T humains immortalisés) semblent présenter une distribution partagée de PUMA entre le cytosol et la mitochondrie. De plus, dans la lignée cellulaire HCT116 (Human Colon Carcinoma 116), non présentée ici, PUMA est aussi exprimé de manière plus ou moins égale entre le cytosol et la mitochondrie. Enfin, bien qu'il faudrait le vérifier, on peut imaginer que ce cas de figure pourrait être retrouvé dans les cellules de cancer colorectal, puisqu'il a été rapporté que ces cellules expriment une quantité élevée de PUMA (M. R. Kim et al., 2007), traduisant une inhibition de sa forte activité pro-apoptotique. Ainsi, une localisation cytosolique de PUMA, comme ce que l'on retrouve dans les cellules B humaines activées, pourrait expliquer cette situation bien que ce ne soit pas la seule solution possible.

Pour conclure, toutes les lignées cellulaires disponibles au laboratoire et analysées par fractionnement, expriment une quantité non négligeable, quand ce n'est pas la majorité de PUMA au niveau de leur cytosol, suggérant que cette localisation pourrait être partagée par différents types cellulaires et non pas limitée aux seules cellules B activées. Par conséquent, on peut présumer que la localisation cytosolique de PUMA pourrait être une caractéristique générale et pas seulement une « anomalie » présente uniquement dans les cellules B.

Il est cependant important d'analyser la localisation subcellulaire de PUMA dans des cellules primaires autres que les cellules B pour confirmer cette assomption.

De manière intéressante, au cours de notre étude, nous avons mis en évidence une translocation de PUMA à la mitochondrie indépendante des caspases suite à l'induction de l'apoptose par différents stimuli.

3) Comment PUMA transloque du cytosol à la mitochondrie ?

Contrairement aux travaux de l'équipe de Lo HW (H. Zhu et al., 2010) dans lesquels PUMA ne transloque jamais à la mitochondrie, même après le traitement des cellules avec de l'anisomycine ou la staurosporine, bien qu'ils aient mis en évidence une translocation du récepteur à l'EGF activé à la mitochondrie au cours de l'apoptose un an plus tard (Cao, Zhu, Ali-Osman, & Lo, 2011), nous avons montré une translocation de PUMA à la mitochondrie suite à l'induction de l'apoptose par l'anisomycine, l'activation du BCR et l'exposition aux

UV. De plus, cette translocation semble être dépendante de la partie C-terminale de PUMA. Ainsi, un fragment de PUMA dépourvu de la partie C-terminale (PUMA N-ter) a une localisation cytosolique et est incapable d'induire l'apoptose alors que la protéine entière ou un fragment dépourvu de la partie N-terminale (PUMA C-ter) sont exprimés au niveau de la mitochondrie et induisent la mort des cellules HeLa (Figure 3). PUMA N-ter et PUMA C-ter conservent le domaine BH3 nécessaire aux interactions au sein de la famille Bcl-2, ce qui suggère qu'il n'est pas suffisant à la translocation et à l'interaction de PUMA avec les protéines anti-apoptotiques au niveau de la mitochondrie. Ces résultats semblent aller à l'encontre des travaux menés par l'équipe de Vousden KH, analysant la contribution de la localisation mitochondriale de PUMA à sa fonction apoptotique, qui montrent que même une protéine PUMA dépourvue de sa région MLS (Mitochondrial Localization Signal) et exprimant un NLS (Nuclear Localization Signal) est capable d'être exprimée au niveau de la mitochondrie via son interaction avec Bcl-2 (Yee & Vousden, 2008). Cette différence pourrait s'expliquer par le nombre d'acides aminés conservés après le domaine BH3 en C-terminal dans les fragments générés. En effet, dans leur article, ils ont montré que l'addition d'acides aminés en aval du domaine BH3 permettait de récupérer une interaction avec Bcl-2.

La fonction de PUMA a jusqu'à maintenant surtout été abordée sous le prisme de sa régulation transcriptionnelle. En effet, de nombreux facteurs de transcription sont capables de stimuler son expression : p53 (Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001), p73 (Bhattacharya, Ray, & Johnson, 2005; Melino et al., 2004), FoxO3a (You et al., 2006), CHOP (J. Li, Lee, & Lee, 2006) et E2F1 (Hershko & Ginsberg, 2004), soulevant la question du rôle que peut jouer le niveau d'expression de PUMA dans sa translocation mitochondriale.

D'après nos résultats, l'activation de cellules B purifiées à partir d'amygdales entraîne une augmentation importante de l'expression de PUMA sans qu'une translocation n'ait lieu, suggérant qu'élever le niveau d'expression de PUMA, bien que nécessaire (PUMA est exprimé à un niveau très faible dans les tissus sains) n'est pas suffisante pour induire sa translocation mitochondriale. De plus, une augmentation de l'expression de PUMA sans induction d'apoptose a aussi été rapporté ailleurs (Gawad, Ptak-Belowska, Brzozowski, & Pawlik, 2009; Kuroki et al., 2009). Cependant, lorsque PUMA est surexprimé dans les cellules HeLa, la protéine est retrouvée au niveau de la mitochondrie et l'apoptose est déclenchée. Comment l'expliquer ? Trois explications peuvent être avancées. La première serait que l'augmentation de l'expression de PUMA peut être gérée par la cellule jusqu'à un point de rupture où elle devient trop importante et permet la translocation de PUMA à la

mitochondrie. Ceci serait en accord avec l'hypothèse d'une séquestration de PUMA au niveau du cytosol par un ou des partenaire(s) indéterminé(s) à l'heure actuelle. Quand PUMA atteint un certain seuil (à définir), son ou ses partenaire(s) cytosolique(s) ne pourrait plus le contenir et il pourrait donc transloquer au niveau de la mitochondrie grâce à son domaine hydrophobe (MLS). Pour tester cette hypothèse, il faudrait faire exprimer PUMA par les cellules HeLa sous des promoteurs moins fort que le promoteur cmv et voir s'il y a des situations où PUMA est bien surexprimé mais qu'il reste cytosolique et que l'apoptose n'est pas induite. La deuxième explication serait que lorsque PUMA est surexprimé, son expression est si élevée qu'elle permet son interaction avec les protéines anti-apoptotiques présentes à la surface de la mitochondrie sans la nécessité d'une translocation « active » comme observée au cours de notre étude. La troisième, peu probable, pour les raisons invoquées précédemment, serait que cette surexpression entraîne un changement de conformation de la protéine PUMA, permettant sa translocation à la mitochondrie.

Une façon classique d'induire le changement de conformation d'une protéine est de lui ajouter un ou plusieurs groupements phosphates. Le fait que manifestement PUMA ne change pas de conformation, n'écarte pas l'hypothèse qu'une phosphorylation puisse intervenir dans sa translocation.

Récemment, il a été rapporté pour la première fois que PUMA pouvait être phosphorylé, notamment au niveau de sa sérine 10 et que cette phosphorylation constituait un signal de dégradation par le protéasome (Fricker, O'Prey, Tolkovsky, & Ryan, 2010). Les travaux d'un autre groupe suggèrent que la kinase IKK serait impliquée dans cette phosphorylation (Sandow et al., 2012). Une autre kinase, HER2, serait aussi capable de déstabiliser PUMA en le phosphorylant au niveau de ses 3 tyrosines (Carpenter, Han, Paw, & Lo, 2013).

La sérine 10, présente au sein de l'isoforme α de PUMA, est absente de l'isoforme β plus courte, qui transloque dans notre étude et qui ne contient que 2 des 3 tyrosines phosphorylables par HER2 (Y90/110). Ces différents résidus phophorylés entraînent une dégradation de PUMA et ne semblent donc pas pouvoir intervenir dans la translocation mitochondriale de PUMA. Cependant, d'autres résidus présent au sein de la protéine peuvent être phosphorylés (Fricker et al., 2010) et l'impact de leur phosphorylation sur la fonction de PUMA reste encore à explorer.

Bien que nous ne sachions pas exactement comment PUMA transloque au niveau de la mitochondrie, nous savons que 2 conditions doivent être remplies pour que cela arrive, 1)

l'expression de PUMA doit être stimulée (cellules B normales) ou PUMA doit être exprimé à un niveau important à l'état basal (BL41 ou HeLa) et 2), un signal pro-apoptotique doit activer PUMA, pour permettre sa translocation à la mitochondrie et induire l'apoptose. Cette activation en 2 étapes pourrait constituer pour la cellule « normale » un moyen de préparer sa mort au cas où le stress subit ne pourrait pas être résolu et constituer une opportunité pour les cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose induite par PUMA en le tenant éloigné de la mitochondrie et des anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Mcl-1 et/ou des pro-apoptotiques à multi-domaine BH Bax et Bak. Cette translocation mitochondriale de PUMA semble cependant dépendre de l'activité de la MAPKinase p38.

4) Comment p38 régule la translocation de PUMA à la mitochondrie ?

p38 a initialement été identifiée comme un polypeptide de 38 kDa qui subit une phosphorylation au niveau de tyrosines en réponse au LPS (LipoPolySaccharide) ou suite à un choc osmotique (Han, Lee, Bibbs, & Ulevitch, 1994). C'est un membre de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) qui comprend aussi les kinases Erk1/2 et JNK, kinases aussi connues sous le nom de SAPK (Stress-Activated Protein Kinase). Leur activation dépend d'une cascade de phosphorylation au niveau de serines/thréonines, de tyrosines ou les 2 à la fois. Suite à son activation, p38 régule principalement la réponse immune et inflammatoire. En effet, p38 stimule la synthèse de protéines pro-inflammatoires IL-1 et TNFα après un traitement au LPS de monocytes (J. C. Lee et al., 1994) et il a été montré que p38 était capable de réguler COX-2, un autre médiateur de l'inflammation (Hwang, Jang, Yu, & Boudreau, 1997; Paul et al., 1999; Ridley et al., 1998). Cependant, p38 a aussi été lié à l'induction de l'apoptose et à l'arrêt du cycle cellulaire, notamment via l'activation transcriptionnelle ou la phosphorylation de p53 (Bulavin et al., 1999; Sanchez-Prieto, Rojas, Taya, & Gutkind, 2000), la phosphorylation et l'activation de Bax (B. J. Kim, Ryu, & Song, 2006), l'initiation du point de contrôle G2/M (Bulavin et al., 2001; Matsusaka & Pines, 2004; Mikhailov, Shinohara, & Rieder, 2005) et l'arrêt en phase G1 suite à des dommages à l'ADN induit par une exposition aux UV (Manke et al., 2005; Todd et al., 2004). Dans notre étude, par l'intermédiaire de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de p38, le SB203580, et la diminution de son expression par siRNA, nous avons montré que la kinase p38 était impliquée dans la translocation de PUMA à la mitochondrie. En effet, lorsque p38 est inhibé ou son expression diminuée, dans les BL41 et dans les cellules HeLa, la

translocation mitochondriale de PUMA est inhibée de façon significative suite à un traitement à l'anisomycine ou une exposition aux UV, respectivement. Comment ? Nous n'avons pas apporté la réponse à cette question dans notre article, cependant, 2 options sont envisageables. La régulation de la translocation de PUMA au niveau de la mitochondrie pourrait être directe, via une phosphorylation de PUMA par p38 ou indirecte, via la phosphorylation d'une autre protéine capable d'agir directement ou non sur PUMA ou son partenaire potentiel au niveau du cytosol, pour induire sa translocation. Aucune phosphorylation de PUMA par p38 n'est décrite dans la littérature. Cependant, deux études publiées en 2008 et 2010, révèlent une régulation de l'expression de PUMA qui est négative dans un cas et positive dans l'autre. En effet, dans l'étude de 2010, les auteurs montrent qu'une inhibition de p38 entraîne un augmentation de PUMA dans des cellules de mélanome (Keuling, Andrew, & Tron, 2010), alors que dans l'étude de 2008, l'activation de p38 par le 6-OHDA dans des cellules de neuroblastome induit aussi une augmentation de l'expression de PUMA (Gomez-Lazaro et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que le 6-OHD générait des ROS (Reactive Oxygen Species), induisant des dommages à l'ADN, et responsables de l'activation de p53 (Bernstein, Garrison, Zambetti, & O'Malley, 2011). L'augmentation de l'expression de PUMA observée pourrait donc être liée à une stimulation transcriptionnelle de PUMA et non pas directement à l'activation de p38. Nous n'avons observé aucune modification de l'expression ou de la transcription de PUMA après le traitement des cellules BL41 avec de l'anisomycine ou des cellules HeLa exposées aux UV. De plus, le rôle joué par p38 dans la mort induite par les UV est ambigu. P38 pourrait être un acteur important dans le déclenchement de l'apoptose (Van Laethem et al., 2004) ou alors protègerait les cellules contre la mort (Ivanov & Ronai, 2000). Il est donc difficile de se faire une idée précise du mécanisme qui pourrait permettre à p38 de réguler la translocation de PUMA à la mitochondrie. Une régulation directe de ce processus impliquerait la phosphorylation de PUMA. Ainsi, dans un premier temps, nous comptons traiter ou non nos cellules avec de l'anisomycine et ensuite soumettre les lysats à une spectrométrie de masse pour identifier une éventuelle phosphorylation de PUMA et les résidus impliqués (pas de retard sur gel observé). La génération de mutant(s) de PUMA permettrait ensuite d'évaluer l'importance de cette phosphorylation dans la régulation de la fonction de cette protéine. Pour confirmer une phosphorylation directe de PUMA par p38, nous envisagerions ensuite de réduire l'expression de p38 dans les cellules et d'analyser la phosphorylation de PUMA d'une part et chercherions à mettre en évidence une interaction entre les deux protéines en amont de la translocation de PUMA à la mitochondrie par

immunoprécipitation, d'autre part. Dans le cas où PUMA ne serait pas phosphorylé, l'identification de son potentiel partenaire au niveau du cytosol, pourrait nous éclairer sur le rôle joué par p38.

p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA), comme son nom l'indique est une des cibles majeures du facteur de transcription p53 et est essentiel dans la transduction du signal apoptotique initié par ce dernier (Jeffers et al., 2003; Michalak, Villunger, Adams, & Strasser, 2008). Il est donc légitime de se demander si cette protéine peut être importante pour la translocation mitochondriale de PUMA.

5) Le facteur de transcription p53 joue-t-il un rôle dans cette translocation ?

L'inactivation de p53, entraînée par une mutation causant la perte de sa fonction ou une surexpression de son inhibiteur MDM2, est observée dans plus de 50% des cancers humains. De nombreuses drogues ont été mises au point pour rétablir sa fonction et ainsi tuer les cellules tumorales (F. Chen, Wang, & El-Deiry, 2010). P53 est capable d'induire indirectement l'apoptose en stimulant l'expression des protéines pro-apoptotiques PUMA (Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001), NOXA (Oda, 2000) et Bax (Miyashita & Reed, 1995), notamment, ou directement en inhibant Bcl-XL et Bcl-2 (Follis et al., 2013; Park et al., 2005) et en activant directement Bax (Chipuk & Green, 2004).
La fonction de PUMA bien que dépendante de p53 dans certaines conditions, peut aussi être stimulée de façon indépendante de p53 (Jeffers et al., 2003).
Ce qui apparaît comme clair dans nos résultats est que p53 n'est pas nécessaire à la translocation mitochondriale de PUMA. En effet, cette translocation peut être déclenchée dans les cellules BL41 qui expriment une forme mutée non fonctionnelle de p53, suite à la stimulation de leur BCR et à leur traitement à l'anisomycine. De plus, dans les cellules HeLa, dans lesquels p53 est aussi inactivé, on observe une translocation importante de PUMA suite à un stress génotoxique généré par leur exposition aux UV. Ainsi, dans notre système, et sous nos conditions, la translocation de PUMA semble ne pas dépendre de l'activité de p53.
Pour jauger la potentielle implication de p53 et par la même occasion, celle du niveau d'expression de PUMA dans sa translocation mitochondriale, il serait intéressant de travailler avec des types cellulaires qui expriment une protéine p53 complètement fonctionnelle, comme c'est le cas de la lignée cellulaire HCT116 par exemple (Chipuk, Bouchier-Hayes,

Kuwana, Newmeyer, & Green, 2005; Gomes & Espinosa, 2010; Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001).

La translocation de PUMA du cytosol à la mitochondrie, s'accompagne d'une induction de l'apoptose qui se manifeste notamment par la translocation de Bax au niveau de la mitochondrie, la libération du cytochrome c et le rétrécissement des cellules (Figure 2 et Figure S2). Nous nous sommes donc intéressé au mécanisme permettant à PUMA de déclencher ces événements.

6) Comment PUMA induit l'apoptose une fois à la mitochondrie ?

Pour que la cellule meure par apoptose, PUMA doit conduire à l'activation des protéines Bax et Bak. En effet, les cellules MEF déficientes pour Bax ou Bak présentent une sensibilité légèrement inférieure à celle des MEF sauvages lorsque la protéine PUMA est surexprimée pendant 24h alors que les MEFs double KO pour Bax et Bak sont réfractaires à l'apoptose dans les mêmes conditions. Deux moyens d'activer Bax et Bak existent. En effet, ils peuvent être activés soit indirectement par l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Willis et al., 2007), soit directement via une interaction avec les BH3-only activateurs (Dai et al., 2011; H. Kim et al., 2006).
Une fois transloqué à la mitochondrie, PUMA interagit avec les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 (Figure 5). Il a été montré que la protéine Mcl-1 peut fixer et inhiber les 2 pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak alors que Bcl-2 ne semble pas pouvoir inhiber Bak mais seulement Bax (Willis et al., 2005; Zhai, Jin, Huang, Satterthwait, & Reed, 2008). En interagissant avec Mcl-1 et Bcl-2, PUMA peut ainsi potentiellement les inhiber et déplacer Bax et Bak, permettant leur homo-oligomérisation au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et la libération du cytchrome c, conduisant à l'activation des caspases et le déclenchement de la phase d'exécution de l'apoptose. Bien qu'une interaction directe entre PUMA et Bax ou Bak n'ait pas été détectée dans nos conditions (non présenté), des travaux suggèrent que PUMA pourrait être un BH3-only activateur (Azad & Storey, 2014; Cartron et al., 2004; Dai et al., 2013; Gallenne et al., 2009). Il est donc possible que la translocation mitochondriale de PUMA contribue à l'activation directe de ces 2 protéines mais que nos conditions expérimentales ne nous permettent pas de la révéler, ce qui serait en accord avec le modèle d'activation dit « hit and run » caractérisé par une interaction transitoire de PUMA

avec les protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak (Kushnareva, Andreyev, Kuwana, & Newmeyer, 2012; Moldoveanu et al., 2013; Wei et al., 2000).

La translocation de PUMA au niveau de la mitochondrie permet donc au moins l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De plus, elle est nécessaire pour une induction optimale de l'apoptose puisque la diminution de l'expression de PUMA par l'intermédiaire de la transfection de siRNA dirigés contre cette protéine entraîne une inhibition significative de la mort des cellules BL41 suite à leur stimulation par l'anisomycine. Nous avons par conséquent aussi voulu savoir si cette translocation était suffisante.

7) La translocation de PUMA à la mitochondrie est-elle suffisante à l'induction de l'apoptose ?

Dans notre étude, nous avons montré que la surexpression de PUMAβ dans les cellules HeLa provoque sa localisation mitochondriale et est associée à une induction de l'apoptose. Cette expérience suggère que la présence de PUMA en quantité massive au niveau de la mitochondrie est suffisante pour induire l'apoptose. De plus, lorsque les cellules BL41 ou HeLa sont soumises à un signal apoptotique comme l'anisomycine ou l'exposition aux UV, respectivement, nous avons montré qu'une quantité significative de PUMA transloquait à la mitochondrie de façon indépendante des caspases, avant une induction effective de l'apoptose.
L'ensemble de ces résultats soutient l'idée que 1), la translocation de PUMA à la mitochondrie précède l'apoptose et 2), qu'elle est suffisante pour l'induire. L'anisomycine et l'exposition aux UV qui induisent la translocation mitochondriale de PUMA, sont 2 stimuli qui activent la voie apoptotique mitochondriale. Nous avons voulu savoir si cette translocation de PUMA pouvait aussi être associée à l'activation de la voie apoptotique des récepteurs de mort comme cela peut être le cas pour la protéine Bid.

8) La translocation mitochondriale de PUMA est-elle toujours associée à la mort apoptotique ?

Il existe 2 voies menant à l'apoptose : la voie apoptotique extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie apoptotique intrinsèque (ou voie mitochondriale). Ces 2 voies peuvent « communiquer » par l'intermédiaire de Bid qui peut être clivé par la caspase-8 activée. L'induction de l'apoptose suite à l'activation de la voie des récepteurs de mort, peut nécessiter l'activation de la voie mitochondriale. En effet, il existe deux groupes de cellules : les cellules de type I et les cellules de type II. Dans les cellules de type I, comme les lymphocytes, l'activation de la caspase-8 au sein du DISC est suffisante à l'activation des caspases effectrices, la caspase-3 notamment. Au contraire, dans les cellules de type II, comprenant les hépatocytes et les cellules pancréatiques β par exemple, l'activation d'une boucle d'amplification passant par le clivage et l'activation de Bid, entraînant sa translocation à la mitochondrie et la libération de facteurs apoptogènes dans le cytoplasme, est indispensable au déclenchement de l'apoptose suivant une activation des récepteurs de mort.
Au cours de notre étude, nous avons utilisé un stimulus extrinsèque, TRAIL qui appartient à la famille du TNF et qui est un agoniste des récepteurs de mort DR4 et DR5. Lorsque les cellules HeLa sont traitées pendant 4h avec la protéine recombinante TRAIL, elles meurent par apoptose sans qu'il n'y ait l'intervention de la voie mitochondriale (pas de libération de cytochrome c) (Figue 2Ea). Dans ce contexte, la translocation de PUMA à la mitochondrie n'est pas observable. En revanche, lorsque la voie apoptotique intrinsèque est activée, PUMA est capable de transloquer à la mitochondrie. En effet, l'activation du BCR, l'exposition des cellules aux UV (dommages à l'ADN) et la stimulation par l'anisomycine, s'accompagnent tous d'une translocation de PUMA à la mitochondrie et de l'induction de l'apoptose. Bien que nous ne le présentions pas, nous avons aussi traité des cellules HEK293T avec de la staurosporine (un inhibiteur de kinases) et une translocation de PUMA semble se produire après 1h de traitement. En plus de son rôle décisif joué dans l'induction de l'apoptose suite à un dommage à l'ADN (Villunger et al., 2003), PUMA semble aussi être impliqué dans la réponse apoptotique suite à un stress réticulaire (Ghosh, Klocke, Ballestas, & Roth, 2012; Kieran, Woods, Villunger, Strasser, & Prehn, 2007; Reimertz, Kogel, Rami, Chittenden, & Prehn, 2003; Tan et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de PUMA suite au traitement de cellules BL41 et/ou HeLa avec des molécules largement utilisées dans la littérature comme la thapsigargine ou la tunicamycine, 2 puissants inducteurs de ce type de

stress. Elargir le type de stress appliqué à la cellule pourrait aussi permettre d'identifier d'autres protéines potentiellement impliquées dans la translocation de PUMA à la mitochondrie, s'il y en a.
D'après nos résultats, la translocation de PUMA à la mitochondrie semble être un phénomène intervenant spécifiquement au cours de l'induction de l'apoptose par l'intermédiaire de la voie apoptotique mitochondriale et qui n'est pas observé lorsque la voie apoptotique extrinsèque est empruntée.

L'ensemble des expériences réalisées et décrites dans notre article est focalisé sur la régulation de la fonction de l'isoforme β de la protéine PUMA. Il est cependant tout à fait légitime de se demander si une régulation de ce type pourrait concerner l'autre isoforme pro-apoptotique de PUMA, l'isoforme α.

9) Qu'en est-il de l'isoforme α de PUMA ?

L'existence de plusieurs isoformes de PUMA, dont les isoformes α et β, résultent d'un épissage alternatif du gène BBC3 (Bcl-2 Binding Component 3) codant pour cette protéine (Nakano & Vousden, 2001). Dans notre modèle, PUMAα, tout juste détectable, est exprimé très faiblement par rapport à PUMAβ, très majoritaire. Après le fractionnement des cellules, il n'est pas possible d'établir un profil d'expression définitif quant à la localisation de PUMAα. En effet, à cause de cette expression presque résiduelle de PUMAα, il est difficile de discriminer et donc d'assigner une localisation plutôt cytosolique ou plutôt mitochondriale à cette isoforme. Sa localisation au sein de la cellule n'est donc pas claire. Ce qui paraît un peu plus certain est que cette faible expression indique que l'isoforme α joue probablement un rôle mineur dans l'induction de l'apoptose observée suite à la stimulation des cellules par l'activation du BCR (B Cell Receptor), l'anisomycine ou l'exposition aux UV. Cependant, lorsqu'elle est surexprimée, comme PUMAβ, la protéine PUMAα est localisée au niveau de la mitochondrie et est capable d'interagir avec Mcl-1 et Bcl-2 ainsi que d'induire l'apoptose (Figure 40).
Pour conclure, comme pour l'isoforme β, et comme rapporté précédemment, l'isoforme α de la protéine PUMA est capable d'induire l'apoptose une fois exprimée de manière significative au niveau de la mitochondrie, mais, à l'heure actuelle, nous n'avons pas les bases pour discuter d'un éventuel mécanisme similaire d'« activation » de cette isoforme pour

déclencher l'apoptose. Ainsi, pour répondre à cette question de manière précise, on pourrait analyser la localisation de PUMA et son éventuelle translocation au cours de l'apoptose dans des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) car la souris exprime majoritairement l'isoforme α de PUMA.

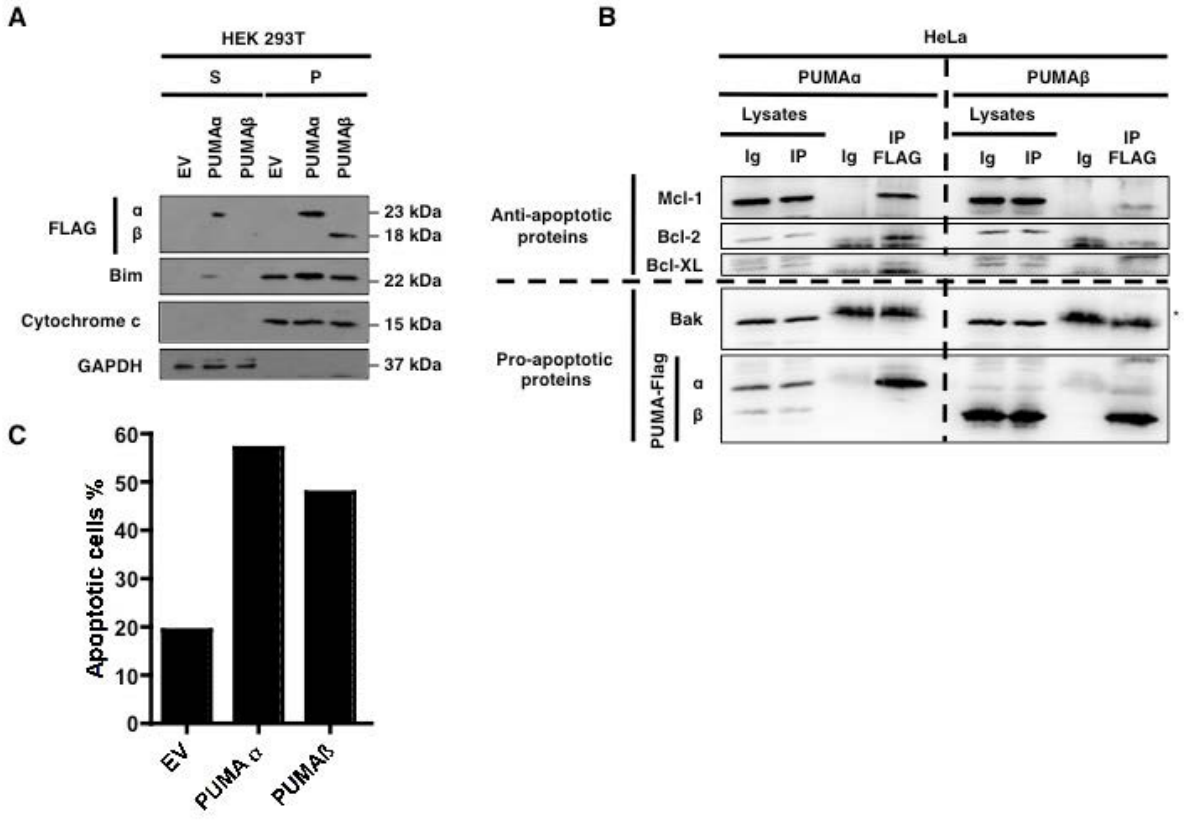


Figure 40 – La protéine PUMAα se comporte comme PUMAβ lorsqu'elle est surexprimée

(A) Des cellules HEK293T ont été transfectées par la méthode de précipitation de phosphate de calcium en présence de chloroquine (6 premières h puis changement de milieu) avec un vecteur vide ou un plasmide codant l'isoforme α ou β de la protéine PUMA portant une étiquette FLAG. Après 24h, les cellules ont été collectées puis fractionnées (voir Figure 1c, Ambroise G et al, 2015) pour obtenir une fraction cytosolique (S) et une fraction enrichie en mitochondrie (P). L'expression et la localisation des protéines PUMA (FLAG) et Bim ont ensuite été analysées par western blot. Le cytochrome c et la GAPDH ont été utilisés comme contrôles de pureté des fractions et contrôles de charge. (B) Des cellules HeLa ont été tranfectées avec un plasmide codant l'isoforme α ou β de la protéine PUMA portant une étiquette FLAG en présence de l'inhibiteur de caspases QVD-Oph à l'aide de FuGene (Promega), en suivant le protocole du fabricant. Après 24h, les cellules ont été lysées et PUMA (FLAG) immunoprécipité (voir Ambroise G et al, 2015). Son interaction avec les protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-XL ainsi que la protéine pro-apoptotique Bax a été analysée par western blot (* chaînes légères des Ig). (C) Des cellules HeLa ont été transfectées comme dans (B) mais en absence de QVD-OPh. Après 24h, les cellules ont été collectées et l'induction de l'apoptose analysée par FACS (voir Ambroise G et al, 2015).

Pour résumer, l'ensemble de nos résultats ajoute un niveau supplémentaire dans la régulation de la fonction de PUMA qui ne dépend pas strictement de son niveau de transcription. En effet, nous avons montré que PUMA est exprimé au niveau du cytosol des cellules B activées, comme d'autres types cellulaires tels que les cellules HeLa, HCT116, HEK293T ou Jurkat et qu'un signal apoptotique intrinsèque peut entraîner sa translocation à la mitochondrie de façon indépendante des caspases. Cette translocation, suffisante à l'induction de l'apoptose, permet à PUMA d'inhiber les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 et de potentiellement lever leur inhibition sur les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak.
En suggérant que PUMA peut être activé directement pour induire l'apoptose, nos résultats ouvrent la porte à de nouvelles stratégies dans le traitement des cancers, notamment.

10) Quel impact cette découverte pourrait-elle avoir dans le traitement du cancer ?

PUMA a un potentiel apoptotique important lié à sa capacité à fixer avec une affinité forte l'ensemble du répertoire anti-apoptotique (L. Chen et al., 2005). Cette protéine constitue donc une cible intéressante pour l'induction de l'apoptose dans le cancer. Ainsi, PUMA sensibilise différents types de cancer à l'apoptose. En effet, il a été montré que PUMA contribue à sensibiliser les cellules du cancer du sein à la radiothérapie (R. Wang et al., 2009) ou encore sensibilise les cellules du cancer de l'œsophage, du cancer de la tête et du cou, et du cancer du poumon aux drogues chimiothérapeutiques et/ou aux radiations (Sun, Sakaida, Yue, Gollin, & Yu, 2007; H. Wang et al., 2006; Yu, Yue, Wu, & Zhang, 2006). Pour induire l'activation de PUMA, plusieurs options sont disponibles. Il est ainsi possible de cibler les miRNA 221/222, régulant négativement la traduction de PUMA (C. Zhang et al., 2010; C. Z. Zhang et al., 2010). Leur inhibition par des miRNA anti-sens a d'ailleurs une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* dans le myélome multiple (Di Martino et al., 2013; Zhao et al., 2015). Cependant, il est difficile de traduire ces résultats, et les traitements utilisant des oligonucléotides anti-sens en général, en clinique pour traiter les patients. En effet, dans le corps humain, ce type d'oligonucléotides à une demi-vie extrêmement courte qui rend compliqué l'établissement de concentrations suffisantes dans le sang pour être efficace. Une autre option stimulant indirectement l'activité de PUMA réside dans la restauration de l'activité de p53. Des drogues ayant un effet anti-tumoral ont ainsi été mises au point (F. Chen et al., 2010).
Le fait que PUMA soit un effecteur majeur de l'apoptose dépendante de p53 dont la fonction est perdue dans 50% des cancers, suggère que les mécanismes induisant ou mimant sa

fonction peuvent avoir un potentiel thérapeutique important, en se substituant à l'activité pro-apoptotique de p53, notamment dans le gliome (Ito et al., 2005). Ainsi, en montrant que PUMA peut être activé de manière indépendante de sa transcription, nos résultats pourraient permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques contribuant à éliminer les cellules tumorales en contournant la nécessité de signaux initiateurs tels que p53 par exemple. De plus, un des problèmes majeurs des molécules chimiothérapeutiques, sont les effets secondaires qui peuvent être lourds et sont dus en partie à une activité toxique au niveau de cellules saines. Comme nous l'avons montré au cours de notre étude, PUMA est exprimé de manière importante dans les cellules B activées et un nombre significatif de lignées cellulaires issues de tumeurs différentes (HeLa, HEK293, Jurkat, …). Ciblé l'activité de PUMA via l'induction de sa translocation mitochondriale nous permettrait donc idéalement de mettre à profit cette expression anormalement élevée de PUMA pour tuer les cellules cancéreuses avec l'espoir d'épargner les cellules saines, exprimant un niveau très faible de la protéine.

Le point le plus important, pour que ce travail ait un impact décisif, est de comprendre le ou les mécanisme(s) qui permettent à la protéine PUMA de passer d'une localisation cytosolique où elle « inactive » par rapport à l'induction de l'apoptose à une localisation mitochondriale après un stress important et ainsi, devenir « active » pour induire l'apoptose, principalement en gagnant l'accès à ses partenaires anti-apoptotiques, Bcl-2 et Mcl-1. Savoir précisément comment la translocation de PUMA est régulée et avoir la possibilité d'agir directement sur son déclenchement, signifierait avoir un interrupteur moléculaire que nous pourrions potentiellement actionner dans les deux sens. L'allumer pour déclencher la mort cellulaire et tuer les cellules malignes chez les patients atteints de cancer, d'un côté, ou au contraire l'éteindre, pour protéger les cellules de l'apoptose dans le cas de maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, où l'implication de PUMA a été rapportée) par exemple, de l'autre côté. Naturellement, pour que cet outil soit utile, il faudrait vérifier l'expression de PUMA et analyser sa localisation subcellulaire dans les tumeurs et dans les cellules qui meurent dans le cadre des maladies neurodégénératives citées précédemment avant d'envisager tout traitement.

Comme décrit dans notre article, la translocation de PUMA à la mitochondrie permet son interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 qu'il inhibe pour induire l'apoptose. En effet, il a été rapporté que l'inhibition des anti-apoptotiques est un moyen

efficace de déclencher la mort cellulaire (Willis et al., 2007). Cependant, l'inhibition de la fonction de ces protéines peut être réalisée par d'autres moyens. En plus de leur inhibition par les BH3-onlys dont l'expression est stimulée (par exemple NOXA) et/ou activés (par exemple PUMA), leur fonction peut être altérée suite à une action directe sur la protéine elle-même, comme une modification post-traductionnelle (phosphorylation), régulant sa capacité à fixer efficacement ses partenaires pro-apoptotiques (Dai et al., 2013; Kobayashi et al., 2007) ou sa dégradation, réduisant son expression. Bien que l'activité de Mcl-1 soit contrôlée par l'ajustement de ces 2 paramètres, le paramètre prédominant est la régulation fine de son niveau d'expression. En effet, Mcl-1 a une demi-vie très courte (entre 30 min et quelques heures selon le type cellulaire) et sa dégradation par le protéasome dépend essentiellement de son ubiquitination. L'ubiquitination, comme la phosphorylation, est un processus réversible consistant en la liaison de chaînes d'ubiquitine au niveau de résidus lysine spécifiques au sein de la protéine cible. Cette liaison est catalysée par des ligases d'ubiquitine E3 (E3) et hydrolysée par les déubiquitinases (DUB). Alors que de nombreuses E3 sont capables de prendre en charge l'ubiquitination de Mcl-1 (Mule, la première caractérisée, β-TrCP, TRIM17, etc), seule une DUB, USP9X a été identifié comme étant capable d'annuler leur action. Dans notre modèle, nous avons observé que contrairement à ce qui avait été montré (Schwickart et al., 2010) et bien que son inhibiteur, le WP1130 induise une diminution importante de l'expression de Mcl-1, l'extinction de USP9X n'avait pas d'impact significatif sur l'expression de Mcl-1, suggérant qu'une ou plusieurs autre(s) DUB(s) pouvaient être impliquées dans sa déubiquitination. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation de Mcl-1 dans nos cellules puis analysé ses partenaires potentiels par spectrométrie de masse. Plusieurs candidats ont ainsi été mis en évidence. Parmi eux, USP14, une déubiquitinase notamment exprimée au niveau du protéasome, induit une diminution marquée de l'expression de Mcl-1 lorsque son expression est diminuée, tout en épargnant les autres membres de la famille Bcl-2, suggérant qu'elle pourrait être impliquée de manière spécifique dans la régulation de l'expression de Mcl-1.

II. COMMENT LA DEUBIQUITINATION DE MCL-1 EST-ELLE REGULEE DANS LES CELLULES HELA ?

Le système ubiquitine/protéasome joue un rôle crucial dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaire, dont l'apoptose (Vucic, Dixit, & Wertz, 2011; Wertz et al., 2011).

Au sein de ce système, les DUBs, capables d'hydrolyser les chaînes d'ubiquitine, constituent des antagonistes des ligases d'ubiquitine (E3) qui au contraire les catalyse (Kleiger & Mayor, 2014). Ainsi, l'expression, la localisation subcellulaire et la fonction des DUBs sont très finement régulées, et l'altération de ces paramètres est associée à de nombreuses pathologies humaines, dont le cancer notamment (Shi & Grossman, 2010).

USP14 est l'une des trois DUBs associées au protéasome au niveau du complexe régulateur 19S avec UCH37/UCH-L5 et POH1 chez l'homme (M. J. Lee, Lee, Hanna, King, & Finley, 2011). Elle est impliquée dans l'amputation des chaînes d'ubiquitine de type K48 présentes au niveau du substrat avant sa dégradation par le protéasome (Hu et al., 2005). USP14 met ainsi un terme au signal ubiquitine et contribue à maintenir un niveau stable d'ubiquitine libre dans la cellule. De manière importante, il a été montré que l'activité de cette DUB nécessite son interaction avec le protéasome (Leggett et al., 2002), le pool cytosolique libre de USP14 est donc inactif.

Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 qui possède un taux de renouvellement élevé et dont la dégradation, contrôlée par son niveau d'ubiquitination, passe par le protéasome (Figure 1). Nous avons montré que USP14 était capable de réguler de façon positive l'expression de Mcl-1. En effet, en son absence, l'expression de Mcl-1 est diminuée de façon significative alors qu'elle est augmentée lorsque USP14 est surexprimée. Le niveau d'expression et par conséquent, l'activité de ces deux protéines semblent donc liées. Cependant, il reste à déterminer si USP14 régule directement l'expression de Mcl-1 en contrôlant son niveau d'ubiquitination.

1) La DUB USP14 catalyse-t-elle directement la déubiquitination de Mcl-1 ?

En absence de USP14, le niveau d'ubiquitination de Mcl-1 est plus élevé et son accumulation plus importante en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (Figure 3). Ces résultats suggèrent fortement que USP14 est impliquée dans la régulation de l'ubiquitination de Mcl-1 dans les cellules HeLa mais ne permettent pas de trancher quant à une régulation directe ou indirecte de ce processus.

Classiquement, pour montrer qu'une DUB (ou une E3) est directement impliquée dans la régulation de l'ubiquitination d'une protéine de manière robuste, 3 points importants doivent être validés : 1) une interaction directe entre les 2 protéines doit pouvoir être mise en évidence, 2) la mutation du site catalytique de la DUB (ou de l'E3) en question doit permettre

l'abolition de l'effet observé avec la protéine sauvage, et 3) la protéine doit être capable de déubiquitiner (ou d'ubiquitiner) le substrat protéique *in vitro*.

Bien que USP14 ait été identifiée suite à une analyse par spectrométrie de masse d'une immunoprécipitation de Mcl-1, validée par l'obtention de ses partenaires décrits dans la littérature, tels que Bim, PUMA et Mule, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une interaction entre Mcl-1 et USP14 dans nos cellules dans des conditions basales. Il est possible que dans ces conditions, la quantité de Mcl-1 ubiquitiné soit très faible par rapport à celle de Mcl-1 non marqué par l'ubiquitine, diluant ainsi le potentiel complexe Mcl-1/USP14. Pour confirmer l'interaction entre Mcl-1 et USP14, plusieurs options restent cependant à notre disposition. Nous pourrions surexprimer les deux protéines dans les cellules HeLa à l'aide de plasmides que nous avons au laboratoire, puis réaliser une immunoprécipitation de l'une ou l'autre des deux protéines en utilisant leur étiquette, FLAG pour USP14 ou myc pour Mcl-1. Cette expérience, qui n'est pas idéale puisqu'elle pourrait induire une interaction « forcée » simplement due à la surexpression des 2 protéines, est très répandue dans la littérature et est donc acceptable. Une autre option pourrait être de bloquer l'activité du protéasome via un inhibiteur, le MG132 ou le bortezomib (Velcade®), associé ou non à la cycloheximide, pour augmenter le pool de Mcl-1 ubiquitiné et ainsi potentiellement augmenter la probabilité de mettre en évidence l'interaction entre Mcl-1 et USP14.

Il serait aussi intéressant de surexprimer une forme inactive de USP14, dont le site catalytique aurait été muté pour vérifier que la diminution de l'expression de Mcl-1 en son absence est bien dépendante de son activité de déubiquitinase.

Enfin des expériences de déubiquitination de Mcl-1 *in vitro,* permettraient de valider définitivement la déubiquitination de Mcl-1 par USP14. Ces expériences pourraient être réalisées sans USP14 ou avec la protéine recombinante USP14 mutée comme contrôles négatifs.

Bien que USP9X ne semble pas réguler l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 dans les cellules HeLa, son importance dans ce processus et dans le cancer à été rapporté dans différents types cellulaires (Schwickart et al., 2010; Trivigno, Essmann, Huber, & Rudner, 2012). Au même titre que USP9X, il serait donc intéressant d'analyser la capacité de USP14 à réguler l'expression de Mcl-1 dans d'autres types cellulaires, que ce soit des lignées ou des cellules primaires.

2) La contribution de USP14 à la stabilisation de Mcl-1 est-elle restreinte aux cellules HeLa ?

D'après nos résultats, USP14 est capable de réguler l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 dans les cellules HeLa. Cependant, nous avons aussi réalisé des transfections de siRNA dirigés contre USP14 ou non ciblés (en contrôle) dans les cellules BL41. L'analyse de l'expression de Mcl-1 48h après ces transfections a permis de montrer que l'absence de USP14 dans ces cellules était aussi associée à une diminution de l'expression de la protéine Mcl-1. Ce résultat, bien que limité à une seule autre lignée cellulaire, laisse supposé que la stabilisation de Mcl-1 par la DUB USP14 pourrait toucher une population plus large que simplement les cellules HeLa. Cette hypothèse reste néanmoins encore à confirmer dans d'autres types cellulaires.

La DUB USP14 est particulière. En effet, comme les DUB UCH37/UCH-L5 et POH1, elle est associée au protéasome et son activité dépend de cette association. Cette localisation stratégique de USP14, amène à se questionner sur la spécificité de la régulation de l'expression de Mcl-1 par USP14.

3) Cette stabilisation de Mcl-1 est-elle uniquement liée à l'association particulière de USP14 au protéasome ?

En plus de son association au protéasome et de la dépendance de son activité vis à vis de celle-ci, il a été montré que l'interaction de USP14 et son activation par les protéines ubiquitinées permettait l'ouverture de la porte du complexe 20S du protéasome et par conséquent, régulait l'entrée et la dégradation des protéines marquées de chaînes d'ubiquitine liées en K48 (Peth, Besche, & Goldberg, 2009). De plus, l'inhibition de cette protéine est associées à une augmentation de l'activité du protéasome (B. H. Lee et al., 2010), qui pourrait être liée à la perte du « videur » au niveau de la porte d'entrée du protéasome, permettant un accès permanent au complexe 20S. De cette façon, il a été montré que l'inhibition de la déubiquitinase USP14 via l'utilisation de 3 aptamères d'ARN spécifiques, facilitait la dégradation de Tau (J. H. Lee et al., 2015), une protéine qui est associée aux microtubules et qui peut être phosphorylée par la MAPKinase p38, impliquée dans la translocation de PUMA (voir plus haut) (Lauretti & Pratico, 2015; Reynolds, Nebreda, Gibb, Utton, & Anderton,

1997). USP14 est aussi impliquée dans la dégradation de CXCR4 stimulée par CXCL12, une protéine stimulant la migration des lymphocytes T CD4+ (Mines, Goodwin, Limbird, Cui, & Fan, 2009). A la lumière de ces données, il serait donc aisé de conclure que l'augmentation de la dégradation de Mcl-1 en absence de USP14 ne serait pas spécifique mais comme Tau, simplement facilitée par l'absence de « filtrage » au niveau du complexe 20S. Cependant, la stabilisation de Mcl-1 par USP14 semble spécifique. En effet, de manière importante, l'expression des autres membres de la famille Bcl-2, qu'ils soient anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-XL ou pro-apoptotiques à domaine BH3 seul, comme PUMA et Bim n'est pas affectée. Cette absence d'effet sur leur expression suite à la diminution de l'expression de USP14 pourrait être liée au fait que ces protéines ont une demi-vie beaucoup plus longue que Mcl-1. Nous nous sommes donc intéressé à l'impact que pourrait avoir l'absence de USP14 sur l'expression de l'inhibiteur de la caspase-8, cFLIP. cFLIP est une protéine dont la demi-vie est courte, à peu près 40 min pour la forme courte et 2h pour la forme longue (Poukkula et al., 2005). De façon intéressante, l'expression de cette protéine reste stable malgré la diminution de l'expression de USP14.

L'ensemble de ces résultats soutient l'idée que USP14 régule l'expression de Mcl-1 de façon spécifique.

Comme évoqué précédemment, USP14 est exprimée au niveau du protéasome avec deux autres DUB, UCH37/UCH-L5 et POH1. Contrairement à POH1, capable de cliver des chaînes entières au niveau de ses substrats dans un processus couplé à la dégradation protéique (Verma et al., 2002; Yao & Cohen, 2002), USP14 et UCH37/UCH-L5 coupe les chaînes d'ubiquitine à partir de la partie distale dans un processus qui ralentit ou inhibe la dégradation par le protéasome. Cette similarité dans le fonctionnement de ces 2 DUBs, nous a amené à étudier l'implication potentielle de UCH37/UCH-L5, aussi une cible de l'inhibiteur WP1130, dans la régulation de l'expression de Mcl-1.

De façon importante, la diminution de l'expression de cette DUB n'a aucun effet significatif sur l'expression de Mcl-1, étayant l'hypothèse que malgré sa localisation au niveau du protéasome et donc son interaction potentielle avec l'ensemble des protéines ubiquitinées et destinées à la dégradation, USP14 semble spécifique de Mcl-1. USP14 et UCH37/UCH-L5 pourraient ainsi avoir des substrats différents. Il serait d'ailleurs intéressant d'analyser l'impact de la diminution de l'expression de cette dernière sur l'expression de cFLIP pour en avoir la confirmation.

USP14 agit donc au niveau de l'ubiquitination et de la dégradation de Mcl-1. Ces 2 processus, condamnant la protéine qui les subit à être réduite à l'ensemble des unités qui la compose, les acides aminés, ensuite recyclés pour la synthèse de nouvelles protéines à moins d'être « secourue » par une DUB, ajuste la demi-vie des protéines cellulaires.

4) USP14 a-t-elle un impact sur la demi-vie de Mcl-1 ?

L'expression de Mcl-1 suit celle de USP14, elle diminue en même temps que celle de cette dernière. De la même façon, Mcl-1 s'accumule lorsque USP14 est surexprimée, mais un paramètre important que nous n'avons pas encore étudié et qui est intimement lié à l'ubiquitination de Mcl-1 est l'impact de la diminution (ou de l'augmentation) de l'expression de USP14 sur la demi-vie de Mcl-1. Pour analyser ce paramètre, nous pourrions transfecter les cellules HeLa avec des siRNA dirigés contre USP14 ou non ciblés puis traiter ces cellules avec un inhibiteur de la transcription, la cycloheximide. Les cellules seraient collectées à des temps différents s'échelonnant entre 0 et 4h, ce qui permettraient d'établir la demi-vie de Mcl-1 dans les cellules transfectées et de la comparer aux cellules contrôles. Une demi-vie écourtée confirmerait l'activité stabilisatrice de USP14 sur Mcl-1.

Mcl-1 est une protéine appartenant à la famille Bcl-2 et qui participe au maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe en inhibant l'activité des membres pro-apoptotiques de la même famille, notamment Bax et Bak, en les séquestrant, empêchant ainsi leur oligomérisation, la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale et la libération caractéristique du cytochrome c. Une inhibition de son expression ou de son activité contribue ainsi à sensibiliser les cellules à l'apoptose, et notamment à des agents thérapeutiques comme l'ABT qui est spécifique de Bcl-2/XL/w (van Delft et al., 2006). Nous nous sommes donc intéressé à l'impact que pourrait avoir l'inhibition de la DUB USP14 sur l'induction de l'apoptose dans les cellules HeLa.

5) L'inhibition de la fonction de USP14 de manière spécifique peut-elle permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose ?

Nous avons montré que la diminution de l'expression de USP14 était corrélée à celle de Mcl-1 mais n'affectait pas l'expression des pro-apoptotiques Bim et PUMA ni celle des autres

anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL qui reste stable. Nous envisageons d'ailleurs d'analyser aussi l'expression des pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak suite à la transfection de cellules HeLa avec des siRNA dirigés contre USP14. Dans ce contexte, la diminution de l'expression de Mcl-1 pourrait contribuer à créer un déséquilibre de la balance pro-/anti-apoptotique conduisant à la mort cellulaire. Malgré la diminution significative de l'expression de Mcl-1, les cellules HeLa ne présentaient pas un pourcentage d'apoptose supérieur lorsqu'elles étaient transfectées avec des siRNA dirigés contre USP14 par rapport au contrôle, suggérant que cette diminution pourrait ne pas être suffisante pour déclencher l'apoptose. Cependant, suite à l'inhibition de l'activité de USP14 à l'aide de l'inhibiteur b-AP15, peut être plus efficace que les siRNA, une induction importante de l'apoptose est observée au bout de 16h de traitement. De manière importante, l'inhibition des caspases à l'aide du QVD-OPh, inhibe bien l'induction de l'apoptose sans inhiber la diminution de l'expression de Mcl-1 indiquant que celle-ci est indépendante des caspases et se situe vraisemblablement en amont de leur activation. Un autre panel montrant l'expression de Mcl-1 suite au prétraitement des cellules HeLa avec un inhibiteur du protéasome suivi de leur traitement avec le b-AP15 pourrait être ajouter pour confirmer que cette diminution est due à la dégradation de Mcl-1 par le protéasome. Néanmoins, ces résultats suggèrent que USP14, en stabilisant Mcl-1, contribue à la survie des cellules HeLa. Il serait cependant pertinent d'utiliser un inhibiteur plus spécifique de USP14, comme IU1 (Nag & Finley, 2012) pour corroborer ces données. En effet, bien que USP14 soit la DUB la plus sensible à l'inhibition par le b-AP15, elle est aussi capable d'inhiber UCH37/UCH-L5 (D'Arcy et al., 2011). De plus, une surexpression de Mcl-1, préalable au traitement des cellules avec l'inhibiteur IU1 permettrait de confirmer l'importance du niveau d'expression et de la fonction de Mcl-1 dans l'induction de l'apoptose suite à l'inhibition de USP14. Pour aller plus loin dans l'analyse de l'impact de USP14 sur la survie des cellules HeLa, il serait intéressant, puisque la diminution de l'expression de USP14 ne suffit pas, d'analyser une éventuelle sensibilisation de ces cellules à l'apoptose lorsque les cellules sont transfectées. Pour cela, nous pourrions transfecter les cellules HeLa avec des siRNA dirigés contre USP14 ou non ciblés, puis soumettre les cellules à différents types de stress apoptotiques, comme les UV par exemple. Il a en effet été montré que la diminution de l'expression de Mcl-1 était un facteur important dans l'induction de l'apoptose suite à ce signal apoptotique (Nijhawan et al., 2003). La même expérience pourrait être réalisée mais suite à la surexpression de USP14, qui pourrait être associée à une protection des cellules HeLa.

Dans son ensemble, cette étude, bien que pouvant être approfondie, met en évidence un nouveau régulateur de l'expression de Mcl-1, USP14. Cette DUB est en effet capable d'inhiber l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1, soutenant ainsi la survie des cellules HeLa. Nos résultats permettent donc entre autre de mieux comprendre la régulation de l'expression de Mcl-1, une des protéines « *most wanted* » dans le traitement du cancer.

6) Qu'apportent ces résultats ?

Il a été montré qu'une expression élevée de USP14, comme celle de Mcl-1, est associée à certains cancers. Ainsi, une surexpression de USP14 est retrouvée dans le cancer colorectal (Shinji et al., 2006), le cholangiocarcinome hépatique (Chuensumran et al., 2011), le carcinome du poumon (Wu et al., 2013) et le cancer des ovaires (Y. Wang et al., 2015). Il a notamment été montré dans le cancer des ovaires que USP14 régulait la prolifération cellulaire et l'apoptose. A la lumière de nos résultats, il serait intéressant d'analyser l'expression de Mcl-1 dans ces cancers pour voir si comme dans notre étude, ces cellules tumorales expriment aussi une quantité anormalement élevée de Mcl-1, confirmant la liaison étroite entre ces 2 protéines.

Comme dans notre étude, l'inhibition de USP14 conduit à l'apoptose des cellules tumorales traitées, les cellules issues de myélome multiple notamment, dans lesquels on peut d'ailleurs parfois observer une surexpression de Mcl-1 (Feng, Holmlund, Zheng, & Fadeel, 2014; Tian et al., 2014). De manière intéressante, dans ces cellules, l'inhibition de USP14 permet de surmonter la résistance au bortezomib (Velcade®) qui constitue le traitement de première ligne pour lutter contre ce type de cancer. Inhiber l'activité de USP14 pour lutter contre le cancer est donc quelque chose de bien établi dans la littérature. Notre étude, au lieu d'ouvrir la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique, apporte donc plutôt une explication quant au mécanisme pouvant conduire à l'induction de l'apoptose dans ces cellules. En effet, la mort cellulaire pourrait passer par une diminution importante de l'expression de Mcl-1, permettant l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak et la libération du cytochrome c dans le cytosol.

ANNEXES

ANNEXE I

Exploiting the potential of autophagy in cisplatin therapy: A new strategy to overcome resistance.

Jesus Garcia-Cano et al.

Oncotarget, 2015 Jun 20;6(17):15551-65.

Exploiting the potential of autophagy in cisplatin therapy: A new strategy to overcome resistance

Jesús García-Cano[1], Gorbatchev Ambroise[2,*], Raquel Pascual-Serra[1,*], Maria Carmen Carrión[3,4], Leticia Serrano-Oviedo[1], Marta Ortega-Muelas[1], Francisco J. Cimas[1], Sebastià Sabater[5], María José Ruiz-Hidalgo[6,7], Isabel Sanchez Perez[8,7], Antonio Mas[1,7,9], Félix A. Jalón[3], Aimé Vazquez[2], Ricardo Sánchez-Prieto[1,4,7]

[1]Unidad de Medicina Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

[2]INSERM U.1197/Université Paris-Sud/Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

[3]Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, UCLM. Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas-IRICA, Ciudad Real, Spain

[4]Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

[5]Radiation Oncology Department, Complejo Hospitalario Universitario Albacete (CHUA), Spain

[6]Departamento de Química Orgánica, Inorgánica y Bioquímica, Facultad de Medicina, Albacete, Spain

[7]Unidad asociada de Biomedicina, UCLM-CSIC, Albacete, Spain

[8]Department of Biochemistry, School of Medicine, UAM/Biomedical Research Institute of Madrid, Madrid CSIC/UAM, Madrid, Spain

[9]Facultad de Farmacia, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

[*]These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:
Ricardo Sánchez-Prieto, **e-mail:** Ricardo.Sanchez@uclm.es

Keywords: *cisplatin*, *apoptosis*, *autophagy*, *synthetic lethality*, *monoplatin*

Received: *April 10, 2015* ***Accepted:*** *April 24, 2015* ***Published:*** *May 06, 2015*

ABSTRACT

Resistance to cisplatin is a major challenge in the current cancer therapy. In order to explore new therapeutic strategies to cisplatin resistance, we evaluated, in a model of lung cancer (H1299 and H460 cell lines), the nature of the pathways leading to cell death. We observed that H1299 displayed a natural resistance to cisplatin due to an inability to trigger an apoptotic response that correlates with the induction of autophagy. However, pharmacological and genetic approaches showed how autophagy was a mechanism associated to cell death rather than to resistance. Indeed, pro-autophagic stimuli such as mTOR or Akt inhibition mediate cell death in both cell lines to a similar extent. We next evaluated the response to a novel platinum compound, monoplatin, able to promote cell death in an exclusive autophagy-dependent manner. In this case, no differences were observed between both cell lines. Furthermore, in response to monoplatin, two molecular hallmarks of cisplatin response (p53 and MAPKs) were not implicated, indicating the ability of this pro-autophagic compound to overcome cisplatin resistance. In summary, our data highlight how induction of autophagy could be used in cisplatin resistant tumours and an alternative treatment for p53 mutated patient in a synthetic lethally approach.

INTRODUCTION

Cisplatin (CDDP) is one of the most widely used drugs in cancer therapy. [1] Its mechanism of action has been deeply investigated, being the DNA molecules the main target of this drug. [2, 3] Since early 90's, it is known that apoptosis is the main mechanism by which CDDP exerts its cytotoxic effect [4] (For an excellent review, see ref. [5]). Nonetheless, resistance to this drug is still a major challenge in cancer therapy due to its wide use in the treatment of different types of tumours as well as its use in combination with other therapies. [1] Therefore, the search of new therapeutic alternatives to solve this problem will have an impact in the daily clinical practice. In this regard, novel molecules based on platinum are currently developed and, some of them, under clinical investigation like satraplatin, which is known to promote apoptosis to execute its therapeutic effect. [6] Furthermore, it has been proposed the use of novel targets for CDDP, like mitochondrial DNA, to overcome CDDP resistance rendering compounds like Platin-M which is able to promote an apoptotic response. [7]

Autophagy is the main mechanism for recycling cellular components. The most commonly studied type of autophagy is macroautophagy and there is already a vast knowledge about its molecular machinery (For a review, see ref. [8]). Recently, a growing body of evidences is implicating autophagy in cancer and its therapy. [9] There are several ways of how autophagy is related to cancer therapy. On the one hand, compounds able to trigger this biological response are considered novel and promising therapeutic approaches, being the mTOR inhibitors the best example (For a review, see ref. [10]). On the other hand, there are numerous examples of how autophagy is related to a resistant response as in the case 5-Fluorouracil, Doxorrubicin or ionizing radiation among others. [11–13] Even, in response to non DNA-damaging agents like Tyr-kinase inhibitors (vg. Sorafenib), it has been observed the induction of autophagy, [14, 15] indicating the broad implication of this process in cancer therapy. In this sense, it is noteworthy how compounds able to block autophagy are considered therapeutic agents, especially in combination with DNA damaging agents, as in the case of chloroquine, but with side effects that should be considered in future therapies. [16] In summary, the role of autophagy in cancer therapy seems to be dual, with implications either in sensitivity and in resistance depending on the system and the therapeutic agent used. [17, 18]

In this context, we decided to study the basis of CDDP resistance in an experimental model of lung cancer. Our data indicate that resistance to CDDP is due to the lack of a functional apoptotic response. However, this resistance correlates with the appearance of autophagy, which seems to be a mechanism of cell death poorly triggered by CDDP. Interestingly, in response of pro-autophagic compounds such as mTOR or Akt inhibitors, no differences were detected between cell lines. Indeed, a novel platinum-based compound monoplatin (MonoPt), which specifically promotes autophagy, was able to kill CDDP-resistant and sensitive cells in a similar fashion. This effect was independent of key players of the cellular response to CDDP such as p53 or MAPKs. Therefore, our results suggest that a synthetic lethality approach based on autophagy could open a new therapeutic window for tumours with a deficient response to apoptotic stimuli like CDDP.

RESULTS

Resistance to CDDP correlates with lack of apoptosis

To gain further insight into the basis of CDDP resistance in lung cancer we used H1299 and H460 cells. First, we performed a dose-response assay to CDDP in both cell lines. As expected, H1299 showed a great resistance by crystal violet method as well as by MTT (Figure 1A and 1B), in agreement with previous reports [19]. Considering that apoptosis is the main mechanism for cell death associated to CDDP we evaluated it by different methods in both experimental models. While H460 cells displayed a consistent induction of apoptosis by means of flow cytometry assays (Figure 1C and 1D), western blotting and caspase enzymatic activity (Figure 1E and 1F), no effect was observed in H1299 cells (Figures 1C, 1D, 1E, 1F). In the case of H460, no activation on caspase 8 was observed (data not shown) thus leading us to conclude that apoptosis was triggered through the extrinsic pathway. To fully prove our observations, we challenged a pan-caspase inhibitor like Q-VD-OPh (Q-VD). [20] Q-VD was able to promote a decrease in the apoptotic response in H460 cells that correlates with an increase in their viability. Interestingly, the same compound did not modify the response in H1299 (Figures 1G and 1H). Furthermore, another DNA-damaging agent such as ionizing radiation, known to promote apoptosis, was challenged in this experimental system showing again a correlation between resistance and lack of apoptosis (Supplementary Figure S1). In summary, this set of experiments demonstrate that the lack of apoptosis is a key mechanism in the resistance observed in H1299 cells.

To fully understand CDDP resistance associated to H1299 cells we decided to analyse several anti- and pro-apoptotic proteins. As it is shown (Figure 2A), among the anti-apoptotic, Bcl-2 family proteins, Bcl-xL and Bcl-w showed a slight upregulation in H1299 cells while a marked downregulation was observed for Bcl-2. In the case of pro-apototic, BH3-only proteins, Noxa and Bax showed a marked downmodulation in H1299 cells, in agreement with a previous report that connects these proteins to CDDP response. [21] Indeed, the use of a BH3-mimetic compound such as ABT263, [22] showed no effect onto H460 cells, while in H1299, it was able to

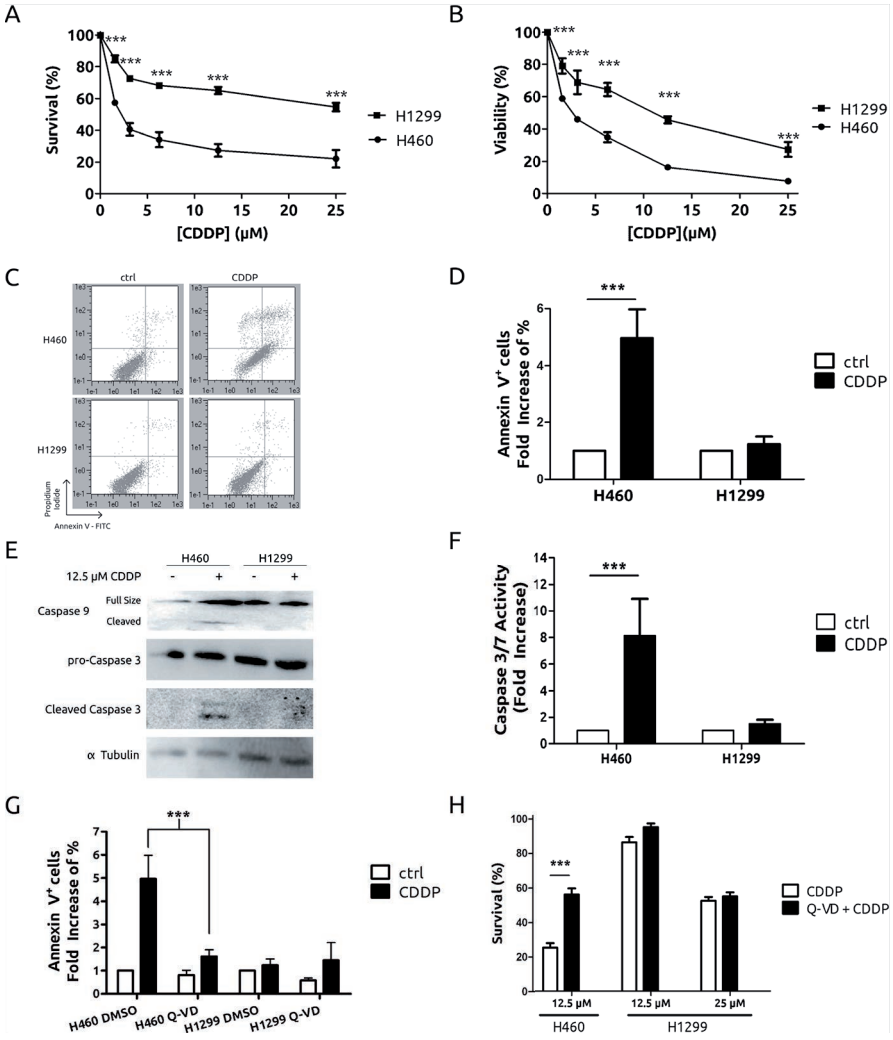


Figure 1: CDDP triggers cell death through the apoptotic pathway on H460 cells but not on H1299 cells. Cells were treated for 48 h at the indicated concentrations and survival and viability were assessed by crystal violet **A.** or MTT **B.** respectively. **C.** Cells were treated with 12.5 μM CDDP for 36 h and stained with Annexin V-FITC/Propidium Iodide for cytometric assay. **D.** Results from 3 independent experiments conducted as in (C). **E.** Cells were treated with CDDP at indicated concentrations for 36 h and protein extracts were blotted with the indicated antibodies **F.** Cells were treated with 12.5 μM CDDP for 24 h and caspase 3/7 activity was evaluated. **G.** Cells were treated and processed as in (C) in the presence or absence of 10 μM Q-VD caspase inhibitor and plotted as in (D). **H.** Survival upon treatment with CDDP, at the indicated concentrations, in the presence or absence of 10 μM Q-VD caspase inhibitor measured by crystal violet 48 h after co-treatment.

promote a discrete effect onto the apoptotic response with almost no effect on viability (Figures 2B and 2C). These last data suggest that a deregulated pattern in pro- and anti-apoptotic proteins could be a mechanism to partially explain the resistant phenotype observed in H1299 cells. However, it should coexist with other mechanisms to fully explain the acute resistance of these cells.

H1299 cells undergo autophagy in response to CDDP

A growing body of evidences support that autophagy is a putative mechanism of resistance to CDDP. [23–25] Therefore, we decided to challenge this hypothesis in our experimental model by evaluating lipidation of LC3 and degradation of p62/SQTSM1 following standard procedures. [26] As it is shown, H1299 cells showed an increase in the lipidated form of LC3 (LC3-II) as well as a decrease of p62/SQSTM1 in response to CDDP, which were not observed in H460 cells (Figure 3A). In fact, transfection of GFP-LC3 in H1299 renders a pattern consistent with the induction of autophagy (Supplementary Figure 2A). To fully support the role of autophagy in CDDP resistance, H1299 and H460 cells were incubated in the presence of a known autophagy inhibitor, 3-methyladenine (3MA), [27] and viability in response to CDDP was evaluated. As expected (Figure 3B), inhibition of autophagy by 3MA did not modify the viability of H460

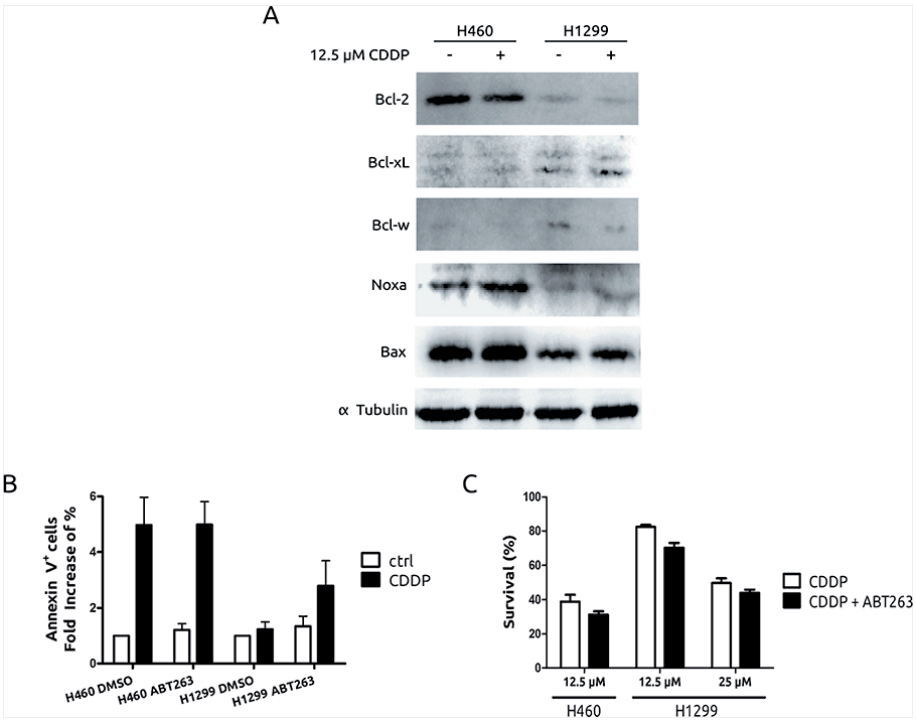


Figure 2: Pro- and anti- apoptotic protein expression pattern in H1299 and H460 cells. A. Presence of Bcl-2 superfamily members and BH3-only proteins was evaluated by western blot after 36 h of CDDP treatment. **B.** Cells were treated with CDDP in the presence or absence of 20 nM of ABT263 and Annexin V staining was observed 36 h after by cytometry. **C.** Viability was evaluated in the same conditions as in (B) 48 h after by crystal violet method.

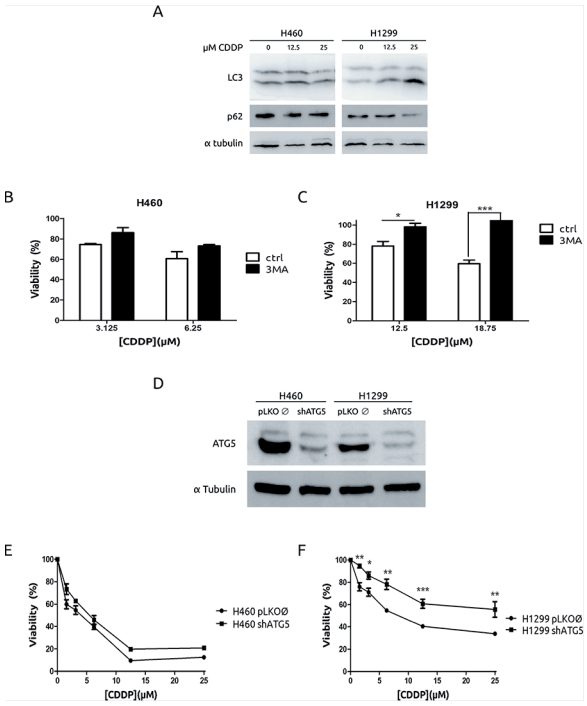


Figure 3: Autophagy is associated to cell-death in H1299 cells in response to CDDP. A. H460 cells were treated for 36 h and protein extracts were blotted with the indicated antibodies. **B.** and **C.** Cells were treated with CDDP at the indicated concentrations in the presence or absence of 2.5 mM 3MA. Viability was assessed by MTT. **D.** Extracts from H460 cells and H1299 cells infected either with lentivirus carrying an empty vector or shRNA against Atg5 were blotted against ATG5. **E.** H460 cells and H1299 cells **F.** were infected as described in D and treated with the indicated concentrations of CDDP and viability was measured by MTT.

cells. Surprisingly, in H1299 cells we observed an increase in the resistance (Figure 3C). These data prompted us to consider that autophagy was a mechanism to explain the low cell death observed in H1299 cells. Next, we used a genetic approach to fully establish the role of autophagy in CDDP resistance. To this end, *Atg5* gene, which is key player in the progression of autophagy, [8] was knocked-down by using shRNA. After achieving an effective abrogation of ATG5 at the protein level in both cell lines (Figure 3D), viability was evaluated, showing almost no effect in H460 cells, while an increase in viability was observed in H1299 cells (Figures 3E and 3F) correlating with a lack of autophagy (Supplementary Figure S2B).

Therefore, this set of experiments allows us to conclude that autophagy is not mediating the observed resistant phenotype. Furthermore, it suggests that autophagy is a plausible way to explain the cell death poorly triggered by CDDP in H1299 cells.

H1299 do not display resistance to compounds that promote autophagy

In light of our previous results, we considered the possibility of exploiting autophagy as a therapeutic mechanism in our experimental model of CDDP-resistant cells. A growing body of evidences is supporting the PI3K-Akt-mTOR axis as a potent therapy target in several types of cancers including lung cancer. [28] Hence, we challenged a potent promoter of autophagy such as rapamycin. As expected, both cell lines showed a marked induction of autophagy (Figure 4A) and a similar grade of toxicity in response to rapamicyn (Figure 4B). Next, treatment with the Akt inhibitor MK2206, known to promote autophagic cell death [29] was also evaluated. As it is shown in Figure 4C and 4D, both cell lines showed the same behaviour in terms of autophagy, Akt inhibition and viability upon MK2206 treatment. Therefore, these results indicate that autophagy induction is effective in both models to a similar extent and no resistance to autophagy-prone drugs was observed in this experimental system. In light of these findings we took advantage of the availability of a novel platinum derivate, monoplatin (MonoPt) able to promote specifically autophagic cell death. [30] Then, cells were exposed to MonoPt and viability was evaluated. As it is shown, H1299 and H460 cells showed similar sensitivity to this platinum compound as judged by crystal violet method (Figure 5A) or by MTT (Figure 5B). Next, we confirmed the induction of autophagy (Figure 5C and Supplementary Figure 3A) as well as the lack of apoptosis induction (Figure 5D). In this case, blockade of autophagy promotes a resistant phenotype in both cell systems by using either 3MA (Figures 5E and 5F) as well as the interference of *Atg5* (Figures 5G and 5H), correlating with an alteration in the onset of autophagy (Supplementary Figures 3B and 3C).

In summary, our data demonstrate how autophagy can be used as a novel synthetic lethally approach to overcome natural resistance to CDDP when apoptotic response is impaired.

MonoPt-triggered autophagy is p53- and MAPKs independent

In an attempt to fully validate our strategy, the use of an autophagy-provoking compound in CDDP-resistant cells, we challenged the role of two major determinants of CDDP resistance such as p53 and MAPKs signalling axis [31].

The role of the tumour suppressor p53 in CDDP resistance has been well established for more than 20 years. [32] In fact, in our experimental model, a strict correlation exists between lack of functional p53 and resistance. Therefore, to study the role of p53 in MonoPt-associated autophagy, we took advantage of the availability of the experimental model of HCT116 cells with both p53 alleles disrupted [33] (Figure 6A). Next, cells were exposed to CDDP or MonoPt and viability was evaluated. As expected, p53-null cells showed a clear resistance compared to p53-wt cells in response to CDDP (Figure 6B). However, in the case of MonoPt, the differences were undetectable (Figure 6C). Furthermore, apoptosis was analysed, showing a nice correlation with sensitivity to CDDP, while for MonoPt no effect was observed as judged by caspase 3/7 activity (Figure 6D). However, a marked induction of autophagy was observed in both experimental systems (Figure 6E). This set of experiments indicates that autophagy associated to MonoPt is independent of p53 activity, and could be a therapeutic alternative for patients with alterations in this tumour suppressor.

Next, MAPKs were challenged in response to MonoPt. Among the several members of this family, we decided to focus onto p38 and ERK1/2, which have been shown to be implicated in the response to CDDP. [34, 35] As it is shown in Figure 7A, H460 cells displayed a marked increase in the activation of p38 MAPK in response to MonoPt, while in the case of H1299, it almost remains unaffected, with exactly the same pattern than in response to CDDP (data not shown and ref. [19]). Therefore, to fully evaluate the role of this particular MAPK we used a specific inhibitor for all p38MAPK isoforms, such as BIRB796, [36] suggesting no role for this signalling pathway in response to MonoPt (Figure 7B). Regarding to ERK1/2, both cell lines showed a marked increase in the activation of this MAPK (Figure 7A). However, inhibition of this signalling pathway by means of U0126, [37] only promotes resistance in H460, correlating with the blockade of autophagy, with no effect onto H1299 (Figures 7B, and 7D). In summary, this set of experiments demonstrates a lack of implication for p38 MAPK in the response to MonoPt and suggests that the effect of ERK1/2 seems to be cell-type specific, indicating that this signalling pathway can be excluded as universal mediator for the therapeutic effect of MonoPt.

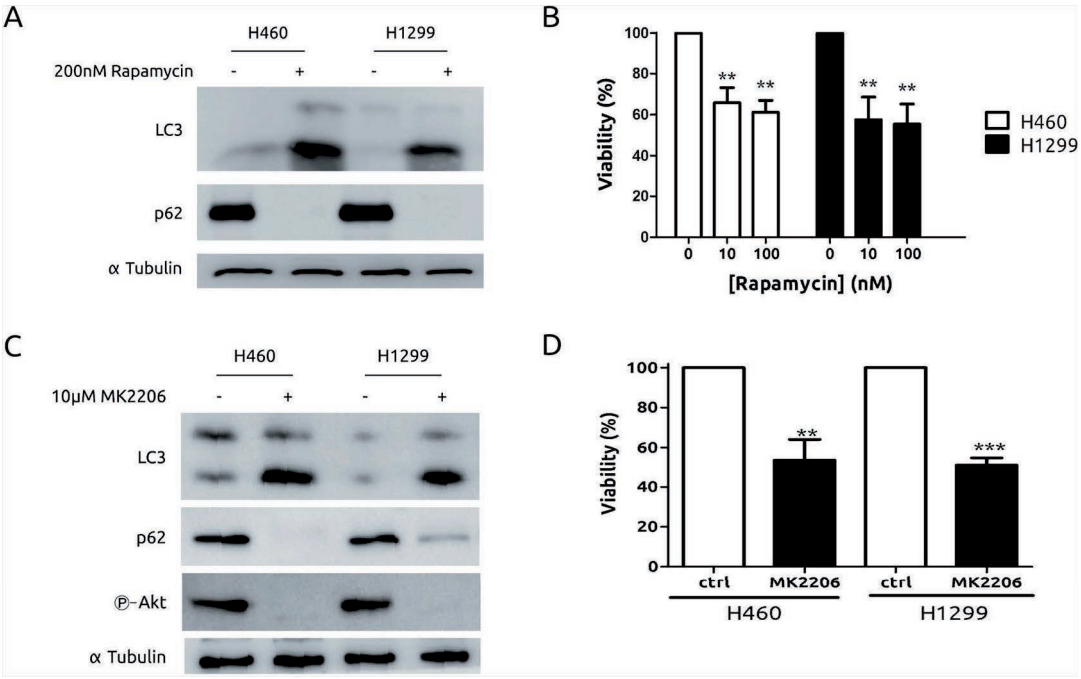


Figure 4: Both H460 and H1299 cells are sensitive to autophagy triggered by mTOR or Akt inhibition. A. Cells were exposed to rapamycin for 24 h. Protein extracts were blotted with the indicated antibodies **B.** Cells were incubated with the indicated concentrations of rapamycin for 6 days. Media were replaced with fresh rapamycin every 2 days. Viability was assessed by MTT. **C.** Cells were treated with MK2206 for 24 h. Protein extracts were blotted with the indicated antibodies. **D.** Cells were treated with 10 μM MK2206 for 48 h. Viability was assessed by MTT.

DISCUSSION

Several conclusions can be drawn from the present study. First, the lack of apoptosis is the main mechanism, at least in our experimental model of lung cancer, for CDDP resistance. This observation is inferred from the data obtained in H1299 cells, which were unable to trigger an apoptotic response. In this sense, promotion of apoptosis is a possible way to induce chemosensitivity in CDDP-based therapy. To this end, several approaches have been considered such as the effective abrogation of anti-apoptotic proteins, [38] the use of natural compounds, [39] modulation of specific genes [40] or the use of BH3 mimetic compounds [41, 42] among others. However, these interesting possibilities do not seem to be applicable to our current model of H1299 cells, in which, for example the use of ABT263, a BH3 mimetic, only induces a slight increase in the apoptotic response of this cell line towards CDDP with an almost undetectable shift in its sensitivity. Therefore, our data suggest that, at least in some cases (vg. H1299 cells), promotion of apoptosis is not a real therapeutic alternative.

Second, regarding to autophagy, it has been considered as a mechanism of resistance to CDDP in several pathologies including ovarian and lung cancer. [24, 43, 44] However, in addition to the data presented here, there are other evidences that do not support this idea as a general mechanism. For example, in several experimental models, this conclusion is based on a mere correlation rather than in a cause-effect demonstration (For example, refs. [45–49]). In some reports, the effect due to autophagic alterations seems to be discreet in terms of viability [43, 45, 50, 51] or the evidences presented are based only on the use of chemical inhibitors such as chloroquine or 3MA (vg. refs. [52–55]) which have been reported to also act trough an autophagy-independent mechanism even in response to CDDP. [56, 57] In addition, other evidences connecting autophagy and CDDP resistance are based onto resistant cell lines obtained by co-culturing [47, 50] or even CDDP plus other drugs. [58] In fact, in this context of acquired resistance, very different from natural resistance like in H1299 cells, previous evidences demonstrate how suppression of autophagy is a mechanism of resistance, [59] suggesting that autophagy is a potential mechanism of sensitivity. Furthermore, it is noteworthy that autophagy has been proposed as the mechanism to induce cell death in response to CDDP in the absence of key apoptotic proteins. [60] Therefore, our data demonstrate that when CDDP is unable to trigger an apoptotic response -the natural and effective mechanism of cell death associated to this drug, autophagy, -probably less effective than apoptosis in response to CDDP- is promoting cell death, indicating that both process cannot coexist. [25] Thus, our work excludes autophagy as mechanism of resistance to CDDP in our model, supporting the idea of a cytotoxic autophagy. [18, 61]

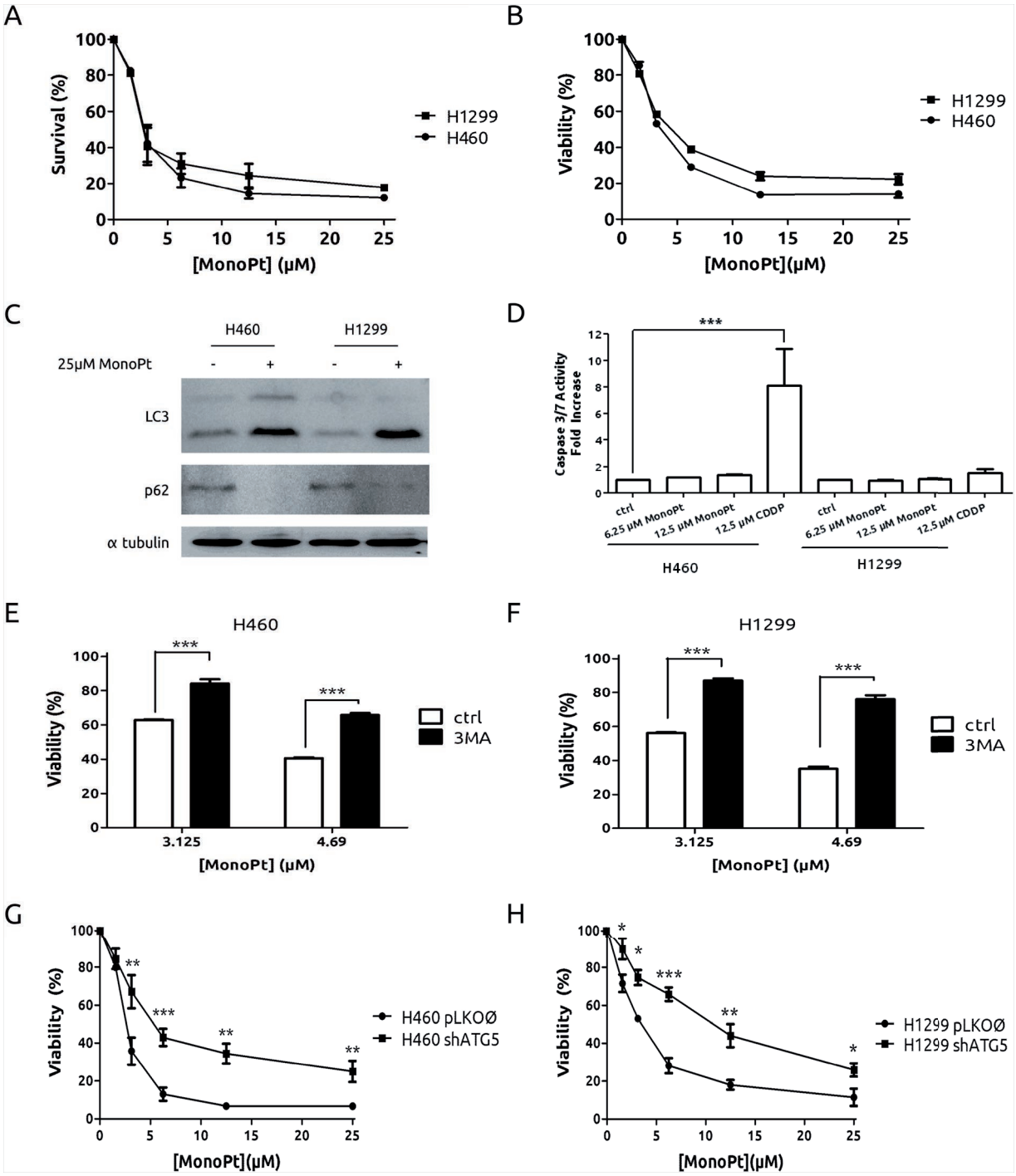


Figure 5: Lack of resistance to MonoPt in H1299 cells. Cells were treated with indicated concentrations of MonoPt. Survival and viability were assessed by crystal violet **A.** and by MTT **B.** respectively. **C.** Cells were treated with MonoPt for 36 h and protein extracts were blotted against LC3 and p62. **D.** Cells were treated as indicated for 24 h and caspases 3 and 7 activity was evaluated. H460 **E.** and H1299 cells **F.** were co-treated with 2.5 mM 3MA at the indicated concentrations of MonoPt. Viability was assessed by MTT. **G.** ATG5-knock-down and control H460 and H1299 **H.** cells were treated with the indicated concentrations of MonoPt. Viability was measured by MTT.

Third, our data support a lack of involvement of classical mediators of CDDP resistance (vg p53 and MAPK) in the response to MonoPt. Regarding to p53, the data obtained in H1299 as well as in HCT116 $p53^{-/-}$, support that this approach can also be used in mutant-p53 tumours. This issue is especially important considering that alterations in p53 (mutation, inactivation, etc.) are common events in different types cancers (For more information, see http://p53.free.fr/ and http://p53.bii.a-star.edu.sg/index.php) and are also major determinants in the therapeutic response

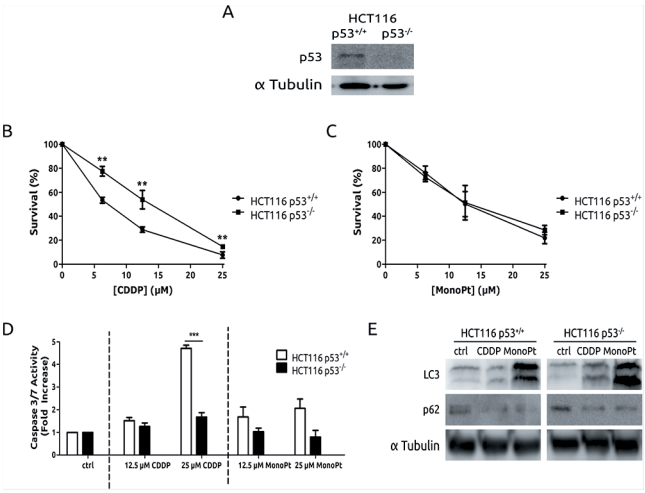


Figure 6: Autophagy triggered by MonoPt is p53 independent. A. Cells were blotted to check p53 knock-out. Cells were treated at the indicated concentrations of either CDDP **B.** or MonoPt **C.** for 48 h. Survival was measured by crystal violet. **D.** Cells were treated with the indicated concentrations of either CDDP or MonoPt for 24 h. Caspase3/7 enzymatic activity was measured. **E.** Cells were treated with 25 μM of either CDDP or MonoPt for 24 h. Protein extracts were blotted with the indicated antibodies.

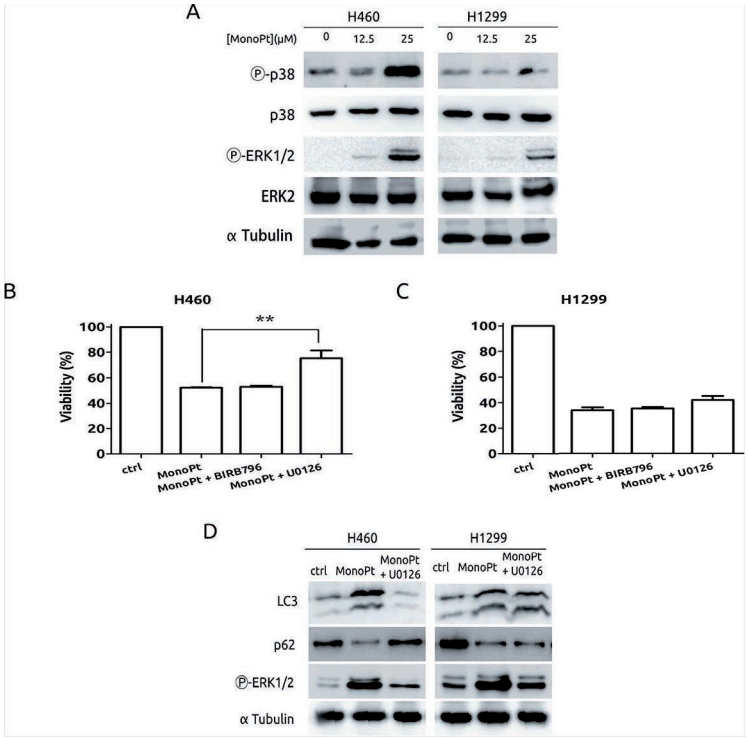


Figure 7: Role of MAPKs in the response to MonoPt. A. Cells were treated with the indicated concentrations of MonoPt for 8 h. Protein extracts were blotted with the indicated antibodies. **B.** and **C.** Cells were treated with 4.69 μM MonoPt either alone or in the presence of 10 μM BIRB796 or 10 μM U0126. Viability was measured by MTT. **D.** Cells were treated with 25 μM MonoPt in the presence or absence of 10 μM U0126 for 24 hours. Protein extracts were blotted with the indicated antibodies.

to CDDP. [32, 62, 63] Indeed, other determinants of chemo-resistance linked to p53 such as MNK2 and wee-1 [64, 65] could be overcome by MonoPt due to its p53 independent mechanism. Regarding to p38 MAPK, previous report did not detect any activation of p38 MAPK by MonoPt, [30] however our data show how p38 MAPK is activated with the same pattern than in response to CDDP (Data not shown and ref. [19]). In this regard, it is notorious that p38 MAPK, which has been proposed as a key mediator in the response to CDDP [19, 35, 66] is not likely to be extrapolated to MonoPt, probably due to the different cell death mechanism triggered. Finally, regarding to ERK1/2, previous report

considered this MAPK as determinant of MonoPt toxicity [30] in the same sense as in CDDP response. [34, 43] In our experimental model, we found out that autophagy triggered by MonoPt can be either ERK1/2 dependent and independent as it is shown by the use of U0126 in both cell lines, indicating that ERK1/2 are not universal mediators of MonoPt-associated autophagy. Therefore, the definitive role of ERK1/2 in MonoPt response needs to be more deeply investigated.

Finally, a synthetic lethality approach based on the balance of autophagy/apoptosis should be considered as a novel way to overcome chemoresistance to CDDP (Figure 8). Synthetic lethality means that a combination of mutations in two genes leads to cell death, while one single mutation has no effect (For a review, see ref. [67]). This genetic principle can be extrapolated to several biological processes including cancer therapy. [68, 69] It is noteworthy, that previous works proposed synthetic lethality approaches for platinum-based therapy by using PARP-inhibitors, [70] or the use of ATR inhibitors in XRCC1 deficient cells. [71] The idea of autophagy as an agent in cancer therapy has been previously considered (For a review, see ref. [72]). But, what is more recent, is the concept of autophagy in synthetic lethality approaches for cancer therapy as in the case of renal cell carcinoma (For a review, see ref. [73]). In this sense, our report is the first evidence showing the potential role of a synthetic lethality approach based on the use of two biological processes (autophagy and apoptosis) for platinum-based therapy. This possibility is extremely interesting in tumours with a compromised apoptotic response, one of the main mechanisms of resistance to CDDP, showing a new alternative to the classical approach based on potentiation of CDDP-associated apoptosis. [74, 75]. Furthermore, considering the tumour heterogeneity known to be implicated in the therapeutic response, [76] our approach could overcome this problem as in the case of clones with different status in key molecules as p53.

In summary, we present a novel therapeutic approach to target those tumours in which the apoptotic capability of a given stimulus (CDDP) is not triggered (vg p53-mutant). In this context, the use of compounds with a high potential to trigger autophagy (vg. MonoPt)

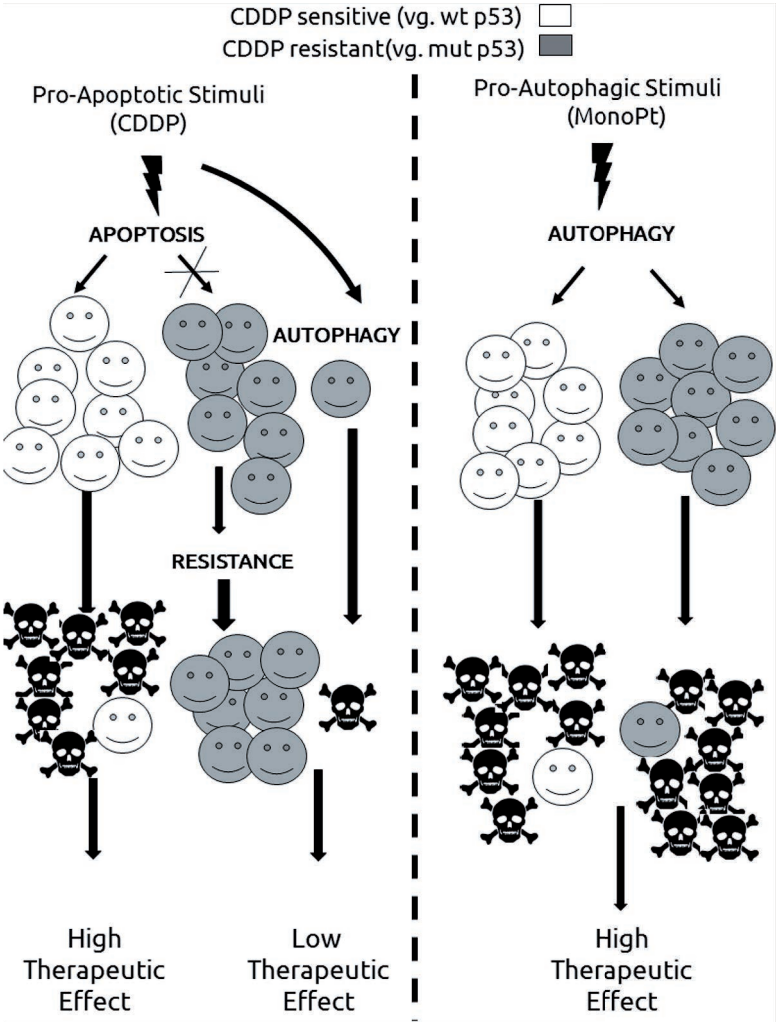


Figure 8: Proposed model for the use of autophagy in cisplatin-resistant tumours.

could induce cell death independently of major molecular determinants (vg p53, MAPKs). Whether our proposed mechanism could apply to other types of tumours, the putative implications in cancer therapy, as well as the role of the different components of this synthetic lethally approach, needs to be further investigated.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell culture

H460 and H1299 (non-small-cell lung carcinoma (NSCLC)) cells were purchased from ATCC and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (D6171, Sigma Aldrich), supplemented with 10% foetal bovine serum (F7524, Sigma Aldrich), plus antibiotics (Penicillin, Streptomycin and Amphotericin B) (A5955, Sigma Aldrich) and L-Glutamine (G7513, Sigma Aldrich) at 37ºC in a 5% CO_2 atmosphere.

Antibodies and chemicals

Antibodies against LC3 were purchased from Sigma Aldrich (L8918). Antibodies against p62/SQSTM1 (sc-28359), total p38α (sc-535), total ERK2 (sc-154), p53 (sc-126) and α-Tubulin (sc-32293) are from Santa Cruz Biotechnologies. Antibodies against phosphorylated forms of p38 MAPK (#9215) and ERK1/2 (#4377) and against ATG5 (#2630), Caspase 3 (#9662) and Caspase 9 (#9502) were purchased from Cell Signaling Technologies (CST). Antibodies against Bcl2-family members were the following ones: Bcl-2 (sc-7382, Santa Cruz), Bcl-xL (#2762, CST) and Bcl-w (sc-130701, Santa Cruz). Antobodies used against BH3-only proteins were the following: Noxa (IMG-349A, Imgenex) and Bax (sc-493, Santa Cruz).

Pan-p38 inhibitor BIRB796 (also known as Doramapimod) was purchased from Cayman Chemicals (10640). MEK1/2 inhibitor U0126 (S1102), Akt inhibitor MK2206 (S1078) and BH3 mimetic molecule ABT-263 (S1001) were from Selleckchem. Rapamycin (553210) and 3-methyladenine (3MA) (189490) were purchased from Calbiochem/Merck–Millipore and pan-caspase inhibitor Q-VD was from R&D Systems (OPH001-01M). These chemicals were diluted in DMSO and stored at –20ºC (–80ºC for U0126 and MK2206) until they were used.

Cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin, CDDP) was purchased from Sigma Aldrich (P4394) and diluted in bidistilled water, aliquoted and stored at –20ºC until used.

Monoplatin (MonoPt) was synthesized under an inert atmosphere of dry oxygen-free nitrogen using standard Schlenk techniques. Solvents were dried from the appropriate drying agents before use, [77] and stored in presence of 4 Å molecular sieves. FAB+ mass spectrometry measurements were obtained in a Thermo MAT95XP mass spectrophotometer with magnetic sector. ^{1}H NMR spectra were recorded at 298K on Varian Gemini FT-400 and Inova FT-500 spectrometers. Chemical shifts (ppm) are relative to tetramethylsilane (^{1}H NMR). Coupling constants (J) are in Hertz. ^{1}H–^{1}H COSY spectra: standard pulse sequence with an acquisition time of 0.214s, pulse width of 10 ms, relaxation delay of 1s, 16 scans, 512 increments. In the NMR analysis, s, d, t, m, and bs denote singlet, doublet, triplet, multiplet, and broad signal, respectively. For the molar conductimetry measurements, the Λ_M values are given in $S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$ and were obtained at room temperature for 10^{-3} M solutions of the corresponding complexes in CH_3CN, using a CRISON 522 conductimeter equipped with a CRISON 5292 platinum conductivity cell. [78] The ligand N-(tert-butoxycarbonyl)-L-methionine-N'-8-quinolylamide was prepared according to literature procedures. [79]. Although the synthesis of the MonoPt complex was described previously, [30] different attempts to follow the reported procedure in our laboratory have resulted in a mixture of products, containing a platinum complex with an unprotected -NH_2 group due, probably, to the Boc cleavage. In order to avoid these problems, and thereby the formation of by-products, the reaction was carried out at 60 ºC in the presence of two equivalents of K_2CO_3, resulting in a new dimeric platinum complex (Di-Pt) that was obtained as pure in good yield. In a second step, the hydrolysis of Di-Pt with HCl leads to MonoPt as a pure compound. Synthesis of Di-Pt is explained in Supplementary Figure 4. [79] MonoPt was diluted in DMSO and stored at -20ºC as previously described. [30]

Survival and viability assays

An initial population of $2 \cdot 10^4$ cells/well was seeded in 24-well plates. 24 hours after, media were discarded and replaced by media containing either drugs, inhibitors or both of them at the concentrations indicated in each case. After treatment (48 hours unless otherwise is indicated), survival or viability were assessed either by crystal violet method or by MTT respectively. For crystal violet, cells were washed with PBS and incubated with crystal violet reactant (C3886, Sigma Aldrich) (10 mg/ml in a distilled water-0.5% glutaraldehyde solution) for 20 min at room temperature in mild rocking. The dye was washed in running water and colorant was recovered with 10% acetic acid and transferred to transparent 96-well plates for optical density evaluation at 595 nm. MTT assays were carried out as follows: MTT reactant (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, M2128, Sigma Aldrich), at 5mg/ml in a PBS solution, was added to the cells in a 1:10 ratio (MTT solution:culture medium) and left for incubation during 1 h at 37ºC. Then, media were discarded and formazan crystals adhered to the plate bottom were recovered with DMSO and transferred to a transparent 96-well plate for optical density evaluation at 570 nm.

Apoptosis assays

For caspase activation assays, cells were plated at a density of 10^4 cells/well in opaque 96-well plates 24 hours prior to treatment. 24 hours after treatment, activation of effector caspases 3 and 7 was evaluated with Promega's CaspaseGlo kit (G8090) following manufacturer's instructions. Resulting mixtures were quantified after 30 minutes of incubation at room temperature in a Beckton Dickinson BD 3096 luminometer.

For Annexin V/Propidium Iodide citometry assays, cells were seeded in 60-mm culture plates for a final population of 70% confluence. After treatments, cells were collected by trypsinization at the indicated times, pelleted and washed twice with ice-cold PBS. A kit form Immunostep (ANXVF-200T, BB10X-50ML and "PI") was used for FITC-AnnexinV and Propidium Iodide staining following manufacturer's instructions. Experiments were checked for fluorescence in both green and red channels in a MACSQuant Analyzer 10 cytometer from MACS/ Miltenyi Biotec. Dot plot corresponds to data obtained from a representative experiment out of three. Grouped column charts are the average of, at least, 3 independent experiments.

Irradiation

Cells were irradiated in a Clinac Low Energy 600C linear electron accelerator from Varian by the technical staff of the University Hospital Complex of Albacete according to the indications described elsewhere. [80] For dose-response assays, $3 \cdot 10^3$ cells/well were seeded in 24-well plates 24 hours prior to irradiation. Culture medium was replaced 24 hours after IR and refreshed every 2 days until the end of the experiment (6 days). Viability was evaluated by the crystal violet method.

Western blotting

Western blot assays were performed following standard procedures. [26, 80] Briefly, cells were collected in lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 20 mM β-glycerophosphate) plus protease and phosphatase inhibitors (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF and 0.1 mM Na_3VO_4) by using 40 µg of total cell lysates. α-Tubulin was used as a loading controls. Images show a representative experiment out of 3 with nearly identical results.

shRNA knock-down assays, lentiviral production and infections

Plasmids codifying for short hairpin RNA (shRNA) against Atg5 were purchased from Sigma-Aldrich (SHCLNG-NM_004849). Prior to the experiments, the best performing shRNA clone was selected as judged by western blot against endogenous ATG5.

Lentiviral production and infections were as follows: HEK 293T cells were cotransfected with pSAXS (helper plasmid) and pVSV-G (envelope plasmid) lentiviral vectors along with either pLKO-puro-shATG5 or pLKO-puro empty vector (SHC001, Sigma-Aldrich) plasmids. Host cells were infected by adding packaging cells' media in the presence of 4 µg/ml polybrene from Sigma-Aldrich (H9268). 48 hours after infection cells were exposed to puromycin (ant-pr-1, Invivogene): 2 µg/ml for H460 and 3 µg/ml for H1299 cells, for at least 3 days before any assay. Infected cells were routinely maintained at the appropriate concentrations of puromycin.

Tranfections

H1299 cells were transfected with pEX-GFP-hLC3wt or pEX-GFP-hLC3ΔG120 previously described, by using Lipofectamine LTX from Invitrogene (#15338500) following manufacturer's instructions. 48 hours later, cells were selected by using G-418 from Sigma-Aldrich (A1720) at 800 µg/ml for at least 10 days. Then, selected pools were treated and analysed as indicated in Zeiss LSM-710 confocal microscope. Images were acquired and processed using Zen 2009 Light Edition software. Images show a representative fields out of 8. The scale bars represent 25 µm.

Data analysis

Results are represented as mean ± SEM (Standard Error of the Mean) of, at least, three independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was performed using the Prism 5.00 software (GraphPad) and Office Excel 2013 (Microsoft). Significance was determined using a *t*-test. The statistical significance of differences is indicated in Figures by asterisks as follows:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the comment and suggestions of Drs FX Pimentel and E Knetch.

Abbreviations

Cisplatin (CDDP); Monoplatin (MonoPt); Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK); dimethyl sulfoxide (DMSO); 3-Methyladenine (3MA); wild type (wt).

FUNDING

This work was supported by grants from Fundación Leticia Castillejo Castillo and Ministerio de Economía y

Competitividad (grant SAF2012-30862 to RSP and grant CTQ2011-24434 to FAJ). RSP Research Institute, and the work carried out in his laboratory receive support from the European Community through the regional development funding program (FEDER). JGC received funding from the Regional Ministry of Education and Science of Castilla–La Mancha (FPI-JCCM) and from Fundación Leticia Castillejo Castillo. MCC and RSP have a contract from the INCRECYT program.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors declare that there are no competing interests in conflict with this paper.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

1. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014; 740:364–378.
2. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 2003; 22:7265–7279.
3. O'Grady S, Finn SP, Cuffe S, Richard DJ, O'Byrne KJ, Barr MP. The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer. Cancer Treat Rev. 2014; 40:1161–1170.
4. Evans DL, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and non-proliferating immature thymocytes. Cancer Res. 1993; 53:2133–2139.
5. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene. 2012; 31:1869–1883.
6. Kalimutho M, Minutolo A, Grelli S, Formosa A, Sancesario G, Valentini A, Federici G, Bernardini S. Satraplatin (JM-216) mediates G2/M cell cycle arrest and potentiates apoptosis via multiple death pathways in colorectal cancer cells thus overcoming platinum chemo-resistance. Cancer Chemother Pharmacol. 2011; 67:1299–1312.
7. Marrache S, Pathak RK, Dhar S. Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111:10444–10449.
8. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. Cell Res. 2014; 24:24–41.
9. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. Mol Pharmacol. 2014; 85:830–838.
10. Santulli G, Totary-Jain H. Tailoring mTOR-based therapy: molecular evidence and clinical challenges. Pharmacogenomics. 2013; 14:1517–1526.
11. De la Cruz-Morcillo MA, Valero MLL, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, García-Gil E, García-Cano J, Sánchez-Prieto R. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. Oncogene. 2012; 31:1073–1085.
12. Huang J, Ni J, Liu K, Yu Y, Xie M, Kang R, Vernon P, Cao L, Tang D. HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma. Cancer Res. 2012; 72:230–238.
13. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. Cancer Res. 2008; 68:1485–1494.
14. Shi Y-H, Ding Z-B, Zhou J, Hui B, Shi G-M, Ke A-W, Wang X-Y, Dai Z, Peng Y-F, Gu C-Y, Qiu S-J, Fan J. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. Autophagy. 2011; 7:1159–1172.
15. Tai W-T, Shiau C-W, Chen H-L, Liu C-Y, Lin C-S, Cheng A-L, Chen P-J, Chen K-F. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. Cell Death Dis. 2013; 4:e485.
16. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. Cancer Res. 2013; 73:3–7.
17. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both?. Cancer Res. 2006; 66:9349–9351.
18. Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. Cancer Res. 2014; 74:647–651.
19. Galan-Moya EM, de la Cruz-Morcillo MA, Llanos Valero M, Callejas-Valera JL, Melgar-Rojas P, Hernadez Losa J, Salcedo M, Fernández-Aramburo A, Ramon y Cajal S, Sánchez-Prieto R. Balance between MKK6 and MKK3 mediates p38 MAPK associated resistance to cisplatin in NSCLC. PloS One. 2011; 6:e28406.
20. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis Int J Program Cell Death. 2003; 8:345–352.
21. Rogers PM, Beale PJ, Al-Moundhri M, Boxall F, Patterson L, Valenti M, Raynaud F, Hobbs S, Johnston S, Kelland LR. Overexpression of BclXL in a human ovarian carcinoma cell line: paradoxic effects on chemosensitivity *in vitro* versus *in vivo*. Int J Cancer J Int Cancer. 2002; 97:858–863.
22. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. Cancer Res. 2008; 68:3421–3428.

23. O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. Autophagy. 2011; 7:509–524.
24. Zhang Y, Cheng Y, Ren X, Zhang L, Yap KL, Wu H, Patel R, Liu D, Qin Z-H, Shih I-M. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response. Oncogene. 2012; 31:1055–1064.
25. Claerhout S, Verschooten L, Van Kelst S, De Vos R, Proby C, Agostinis P, Garmyn M. Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. Int J Cancer J Int Cancer. 2010; 127:2790–2803.
26. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 2012; 8:445–544.
27. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982; 79:1889–1892.
28. Beck JT, Ismail A, Tolomeo C. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma. Cancer Treat Rev. 2014; 40:980–989.
29. Cheng Y, Ren X, Zhang Y, Patel R, Sharma A, Wu H, Robertson GP, Yan L, Rubin E, Yang J-M. eEF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt Inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206. Cancer Res. 2011; 71:2654–2663.
30. Guo W-J, Zhang Y-M, Zhang L, Huang B, Tao F-F, Chen W, Guo Z-J, Xu Q, Sun Y. Novel monofunctional platinum (II) complex Mono-Pt induces apoptosis-independent autophagic cell death in human ovarian carcinoma cells, distinct from cisplatin. Autophagy. 2013; 9:996–1008.
31. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-acitvated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. Cancer Res. 2000; 60:2464–2472.
32. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Oliver J, Martini N, Gralla R, Kris M, Dmitrovsky E. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. Cancer Res. 1995; 55:5038–5042.
33. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science. 1998; 282:1497–1501.
34. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem. 2000; 275:39435–39443.
35. Hernández Losa J, Parada Cobo C, Guinea Viniegra J, Sánchez-Arevalo Lobo VJ, Ramón y Cajal S, Sánchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. Oncogene. 2003; 22:3998–4006.
36. Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Márquez R, Cuenda A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem. 2005; 280:19472–19479.
37. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem. 1998; 273:18623–18632.
38. Hopkins-Donaldson S, Cathomas R, Simões-Wüst AP, Kurtz S, Belyanskaya L, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U, Belyanskya L. Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl-xL antisense treatment. Int J Cancer J Int Cancer. 2003; 106:160–166.
39. Farrand L, Oh S-W, Song YS, Tsang BK. Phytochemicals: a multitargeted approach to gynecologic cancer therapy. BioMed Res Int. 2014; 2014:890141.
40. Tufo G, Jones AWE, Wang Z, Hamelin J, Tajeddine N, Esposti DD, Martel C, Boursier C, Gallerne C, Migdal C, Lemaire C, Szabadkai G, et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. Cell Death Differ. 2014; 21:685–695.
41. Bauer JA, Trask DK, Kumar B, Los G, Castro J, Lee JS-J, Chen J, Wang S, Bradford CR, Carey TE. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. Mol Cancer Ther. 2005; 4:1096–1104.
42. Michels J, Obrist F, Vitale I, Lissa D, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Castedo M, Kroemer G. MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. Biochem Pharmacol. 2014; 92:55–61.
43. Wang J, Wu GS. Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. J Biol Chem. 2014; 289:17163–17173.
44. Kaminskyy VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. Autophagy. 2012; 8:1032–1044.
45. Bao L, Jaramillo MC, Zhang Z, Zheng Y, Yao M, Zhang DD, Yi X. Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. Mol Med Rep. 2015; 11:91–98.
46. Pennati M, Lopergolo A, Profumo V, De Cesare M, Sbarra S, Valdagni R, Zaffaroni N, Gandellini P, Folini M. miR-205 impairs the autophagic flux and enhances cisplatin cytotoxicity in castration-resistant prostate cancer cells. Biochem Pharmacol. 2014; 87:579–597.
47. Li N, Li X, Li S, Zhou S, Zhou Q. Cisplatin-induced down-regulation of SOX1 increases drug resistance by activating

autophagy in non-small cell lung cancer cell. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 439:187–190.

48. Ren J-H, He W-S, Nong L, Zhu Q-Y, Hu K, Zhang R-G, Huang L-L, Zhu F, Wu G. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. Cancer Biother Radiopharm. 2010; 25:75–80.
49. Liu M, Ma S, Liu M, Hou Y, Liang B, Su X, Liu X. Synergistic killing of lung cancer cells by cisplatin and radiation via autophagy and apoptosis. Oncol Lett. 2014; 7:1903–1910.
50. Yu L, Gu C, Zhong D, Shi L, Kong Y, Zhou Z, Liu S. Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance. Cancer Lett. 2014; 355:34–45.
51. Ge J, Chen Z, Huang J, Chen J, Yuan W, Deng Z, Chen Z. Upregulation of autophagy-related gene-5 (ATG-5) is associated with chemoresistance in human gastric cancer. PloS One. 2014; 9:e110293.
52. Toulany M, Mihatsch J, Holler M, Chaachouay H, Rodemann HP. Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol. 2014; 111:228–236.
53. Zhang H-Q, He B, Fang N, Lu S, Liao Y-Q, Wan Y-Y. Autophagy inhibition sensitizes cisplatin cytotoxicity in human gastric cancer cell line SGC7901. Asian Pac J Cancer Prev APJCP. 2013; 14:4685–4688.
54. Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, Su J, Li H, Sun L. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. Cancer Lett. 2012; 314:232–243.
55. Guo X-L, Li D, Sun K, Wang J, Liu Y, Song J-R, Zhao Q-D, Zhang S-S, Deng W-J, Zhao X, Wu M-C, Wei L-X. Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of bevacizumab in hepatocarcinoma. J Mol Med Berl Ger. 2013; 91:473–483.
56. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. Autophagy. 2012; 8:200–212.
57. Sheng Y, Sun B, Guo W-T, Zhang Y-H, Liu X, Xing Y, Dong D-L. 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 432:5–9.
58. Pan H, Shen K, Wang X, Meng H, Wang C, Jin B. Protective effect of metalloporphyrins against cisplatin-induced kidney injury in mice. PloS One. 2014; 9:e86057.
59. Sirichanchuen B, Pengsuparp T, Chanvorachote P. Long-term cisplatin exposure impairs autophagy and causes cisplatin resistance in human lung cancer cells. Mol Cell Biochem. 2012; 364:11–18.
60. Andreu-Fernández V, Genovés A, Messeguer A, Orzáez M, Sancho M, Pérez-Payá E. BH3-mimetics- and cisplatin-induced cell death proceeds through different pathways depending on the availability of death-related cellular components. PloS One. 2013; 8:e56881.
61. Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA. Cytotoxic autophagy in cancer therapy. Int J Mol Sci. 2014; 15:10034–10051.
62. Mandic R, Schamberger CJ, Müller JF, Geyer M, Zhu L, Carey TE, Grénman R, Dünne AA, Werner JA. Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2005; 11:6845–6852.
63. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, Locati L, Quattrone P, Pierotti MA, Pilotti S, Licitra L. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010; 28:761–766.
64. Morandell S, Reinhardt HC, Cannell IG, Kim JS, Ruf DM, Mitra T, Couvillon AD, Jacks T, Yaffe MB. A reversible gene-targeting strategy identifies synthetic lethal interactions between MK2 and p53 in the DNA damage response *in vivo*. Cell Rep. 2013; 5:868–877.
65. Osman AA, Monroe MM, Ortega Alves MV, Patel AA, Katsonis P, Fitzgerald AL, Neskey DM, Frederick MJ, Woo SH, Caulin C, Hsu T-K, McDonald TO, et al. Wee-1 Kinase Inhibition Overcomes Cisplatin Resistance Associated with High-Risk TP53 Mutations in Head and Neck Cancer through Mitotic Arrest Followed by Senescence. Mol Cancer Ther. 2015; 14:608–619.
66. Pereira L, Igea A, Canovas B, Dolado I, Nebreda AR. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. EMBO Mol Med. 2013; 5:1759–1774.
67. Nijman SMB. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. FEBS Lett. 2011; 585:1–6.
68. McLornan DP, List A, Mufti GJ. Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. N Engl J Med. 2014; 371:1725–1735.
69. Fece de la Cruz F, Gapp BV, Nijman SMB. Synthetic lethal vulnerabilities of cancer. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2015; 55:513–531.
70. Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR. Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin *in vitro* and *in vivo* using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. Mol Cancer Ther. 2012; 11:1948–1958.
71. Sultana R, Abdel-Fatah T, Perry C, Moseley P, Albarakti N, Mohan V, Seedhouse C, Chan S, Madhusudan S. Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase inhibition is synthetically lethal in XRCC1 deficient ovarian cancer cells. PloS One. 2013; 8:e57098.
72. Turcotte S, Giaccia AJ. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. Curr Opin Cell Biol. 2010; 22:246–251.

73. Reyjal J, Cormier K, Turcotte S. Autophagy and cell death to target cancer cells: exploiting synthetic lethality as cancer therapies. Adv Exp Med Biol. 2014; 772:167–188.

74. Gambi N, Tramontano F, Quesada P. Poly(ADPR)polymerase inhibition and apoptosis induction in cDDP-treated human carcinoma cell lines. Biochem Pharmacol. 2008; 75:2356–2363.

75. Tsai WS, Yeow W-S, Chua A, Reddy RM, Nguyen DM, Schrump DS, Nguyen DM. Enhancement of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity in esophageal cancer cells by cisplatin. Mol Cancer Ther. 2006; 5:2977–2990.

76. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature. 2013; 501:328–337.

77. Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. Purification of Laboratory Chemicals. 5th Edition. Butterworth-Heinemann-Elsevier; 2013.

78. Geary WJ. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. Coord Chem Rev. 1971; 7:81–122.

79. Zhang J, Wang X, Tu C, Lin J, Ding J, Lin L, Wang Z, He C, Yan C, You X, Guo Z. Monofunctional platinum complexes showing potent cytotoxicity against human liver carcinoma cell line BEL-7402. J Med Chem. 2003; 46:3502–3507.

80. De la Cruz-Morcillo MA, García-Cano J, Arias-González L, García-Gil E, Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Valero ML, Cimas FJ, Serrano-Oviedo L, Villas MV, Romero-Fernández J, Núñez MI, et al. Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. Cancer Lett. 2013; 335:66–74.

ANNEXE II

Mitochondrial hyperfusion promotes NF-jB activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN.

Naima Zemirli, Marie Pourcelot, Gorbatchev Ambroise, Emeline Hatchi, Aimé Vazquez and Damien Arnoult

FEBS J. 2014 Jul;281(14):3095-112.

the FEBS Journal

EDITOR'S CHOICE

Mitochondrial hyperfusion promotes NF-κB activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN

Naima Zemirli[1,2,3,*], Marie Pourcelot[1,2,3,*], Gorbatchev Ambroise[1,2,3], Emeline Hatchi[1,2,3], Aimé Vazquez[1,2,3] and Damien Arnoult[1,2,3]

1 INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France
2 Université Paris-Sud P11, Orsay, France
3 Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France

Keywords
mitochondrial dynamics; MULAN; NF-κB; SIMH; TRAF2

Correspondence
D. Arnoult, INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France
Fax: + 33 (0)1 45 59 53 43
Tel: + 33 (0)1 45 59 60 38
E-mail: damien.arnoult@inserm.fr

*These authors contributed equally to this work

(Received 28 March 2014, revised 25 April 2014, accepted 13 May 2014)

doi:10.1111/febs.12846

Mitochondria are dynamic organelles with a morphology resulting from the balance between two opposing processes: fusion and fission. Little is known about the function of mitochondrial fusion, beside its role in the maintenance of mitochondrial DNA. We report here that enforced mitochondrial hyperfusion, due to the expression of a dominant-negative mutant of Drp1 or of MARCH5, promotes NF-κB activation in a TAK1- and IKK-dependent manner, through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. The capability of MULAN to activate NF-κB depends on its RING domain and on the E3 ubiquitin ligase TRAF2. Under physiological conditions, stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) is also accompanied by NF-κB activation, and the prevention of SIMH or the knockdown of MULAN impairs NF-κB activation. During SIMH, MULAN forms a complex with TRAF2 and modulates its ubiquitylation, signifying that TRAF2 may serve as an ubiquitylated transmitter of NF-κB signaling in this pathway. Our results suggest that mitochondria, through their dynamics, convert stress signals into a cell response leading to NF-κB activation.

Structured digital abstract

- TRAF2 physically interacts with MULAN by anti bait coip (View interaction)

Introduction

Mitochondria are dynamic organelles that continually move, fuse and divide [1]. Mammalian cells maintain the shape of their mitochondria through a balance between the opposing processes of mitochondrial fusion and fission. This dynamic behavior is essential for normal mitochondrial function and contributes to fundamental processes, such as development, cell death and aging [2]. The protein machinery regulating mitochondrial fission and fusion is now well characterized [1]. In mammalian cells, dynamin-related protein 1 (Drp1), hFis, mitochondrial fission factor, MiD49 and MiD51 are required for mitochondrial fission [3–6]. Mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2) and optic atrophy 1 (OPA1) are essential for the fusion of mitochondria [7,8]. Drp1, MFN1, MFN2 and OPA1 are dynamin-related GTPases [1].

Mitochondrial fission and fusion seem to be essential for mouse development and for neuronal survival and function in mice and humans, but little is known about the physiological role of mitochondrial

Abbreviations
ActD, actinomycin D; CHX, cycloheximide; Drp1, dynamin-related protein 1; IFN, interferon; IKK, inhibitor of NF-κB kinase; IκB, inhibitor of NF-κB; MEF, mouse embryonic fibroblast; MFN1, mitofusin 1; MFN2, mitofusin 2; mtDNA, mitochondrial DNA; OPA1, optic atrophy 1; SIMH, stress-induced mitochondrial hyperfusion; siRNA, short interfering RNA; TNF, tumor necrosis factor.

dynamics in cell function and survival [1,2]. Mitochondrial fission is required for the selective elimination of depolarized mitochondria [9] and it occurs during apoptosis [10]. Fission of the mitochondrial network due to impaired mitochondrial fusion is often associated with bioenergetic defects due to a loss of mitochondrial DNA (mtDNA) [2]. Mitochondrial fusion is therefore required for mtDNA maintenance, probably because it allows mtDNA exchange between mitochondria. It has also been reported that mitochondria hyperfuse in cells exposed to stresses inhibiting protein synthesis, and this stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) has been proposed to constitute an adaptive response to stress [11].

The transcription factor NF-κB is activated by many inducers, including moderate stresses [12,13]. Each inducer is recognized by a receptor at the cell surface or within the cell, and its binding triggers a specific signaling pathway leading to NF-κB activation. Each pathway involves the organization of signaling protein complexes, the formation of polyubiquitin chains acting as binding agents on specific transmitters and the action of kinases [12–14]. Nevertheless, all these complexes have a point in common: they recruit and activate, through specific ubiquitylated transmitters, the inhibitor of NF-κB (IκB) kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic kinases, IKKα and IKKβ, and the regulatory subunit NEMO (also known as IKKγ). IKK then phosphorylates the inhibitory IκB proteins, promoting their Lys48 (K48)-linked ubiquitylation and proteasomal degradation [12–14]. NF-κB dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes, including genes encoding antiapoptotic proteins or proinflammatory cytokines.

Here, we report that hyperfusion of the mitochondrial network (e.g. due to the expression of a dominant-negative form of Drp1 or of MARCH5, or stresses inhibiting protein synthesis) promotes NF-κB activation through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. Thus, mitochondrial dynamics convert stress signals into a prosurvival response via NF-κB activation.

Results

Enforced mitochondrial hyperfusion promotes NF-κB activation

We searched for new signals emanating from the mitochondrion and leading to NF-κB activation. We unexpectedly found that the expression of a dominant-negative form of Drp1 ($Drp1^{K38A}$), a mediator of mitochondrial fission [2], not only promoted a highly interconnected mitochondrial network (referred to here as mitochondrial hyperfusion), as reported in previous studies [15,16], but also triggered NF-κB activation, as shown by assessing NF-κB-driven luciferase reporter activity (Fig. 1A). By contrast, Drp1 expression had no effect on mitochondrial morphology or NF-κB. For confirmation that mitochondrial hyperfusion did indeed lead to NF-κB activation, we also expressed a mutant form of the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 ($MARCH5^{H43W}$), which has also been reported to promote mitochondrial hyperfusion by altering the subcellular trafficking of Drp1 [17]. MARCH5 overexpression had no effect on the overall organization of the mitochondrial network, but the cells expressing $MARCH5^{H43W}$ had a highly interconnected mitochondrial network and displayed NF-κB activation (Fig. 1A). Mitochondrial hyperfusion seems to promote NF-κB activation selectively, because the expression of $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ did not stimulate the expression of interferon (IFN)β-, interferon-stimulated response element-, NFAT-, AP1- or p53-dependent reporter genes (Fig. 1A and data not shown). As a control, expression of the mitochondrial adaptor MAVS, which is involved in antiviral innate immunity [18], promoted both NF-κB activation and IFNβ promoter activity (Fig. 1A) although it triggered aggregation of the mitochondrial network (data not shown) [19]. Finally, confirming the activation of NF-κB in response to mitochondrial hyperfusion, nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit was observed in cells with a highly interconnected mitochondrial network after their transfection with constructs encoding $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ (Fig. 1B).

We then explored the signaling pathway involved in NF-κB activation in response to mitochondrial hyperfusion, by knocking down the expression of several key proteins of the NF-κB pathway with specific short interfering RNAs (siRNAs) (Fig. 2). Knocking down the expression of different members of the IKK complex (the catalytic kinases IKKα and IKKβ and the regulatory subunit NEMO [20]) inhibited mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation (Fig. 1C). The IKK complex is activated by phosphorylation of the IKKβ subunit by the kinase TAK1 [14]. Thus, in the absence of TAK1, but not of RIP1, NIK, IKKε or TBK1, other kinases reportedly involved in some NF-κB signaling pathways [13], NF-κB activation was hampered following transfection with constructs encoding mutant forms of Drp1 and MARCH5 (Fig. 1D).

NF-κB activation requires the nondegradative K63-linked polyubiquitylation of key transmitters. These

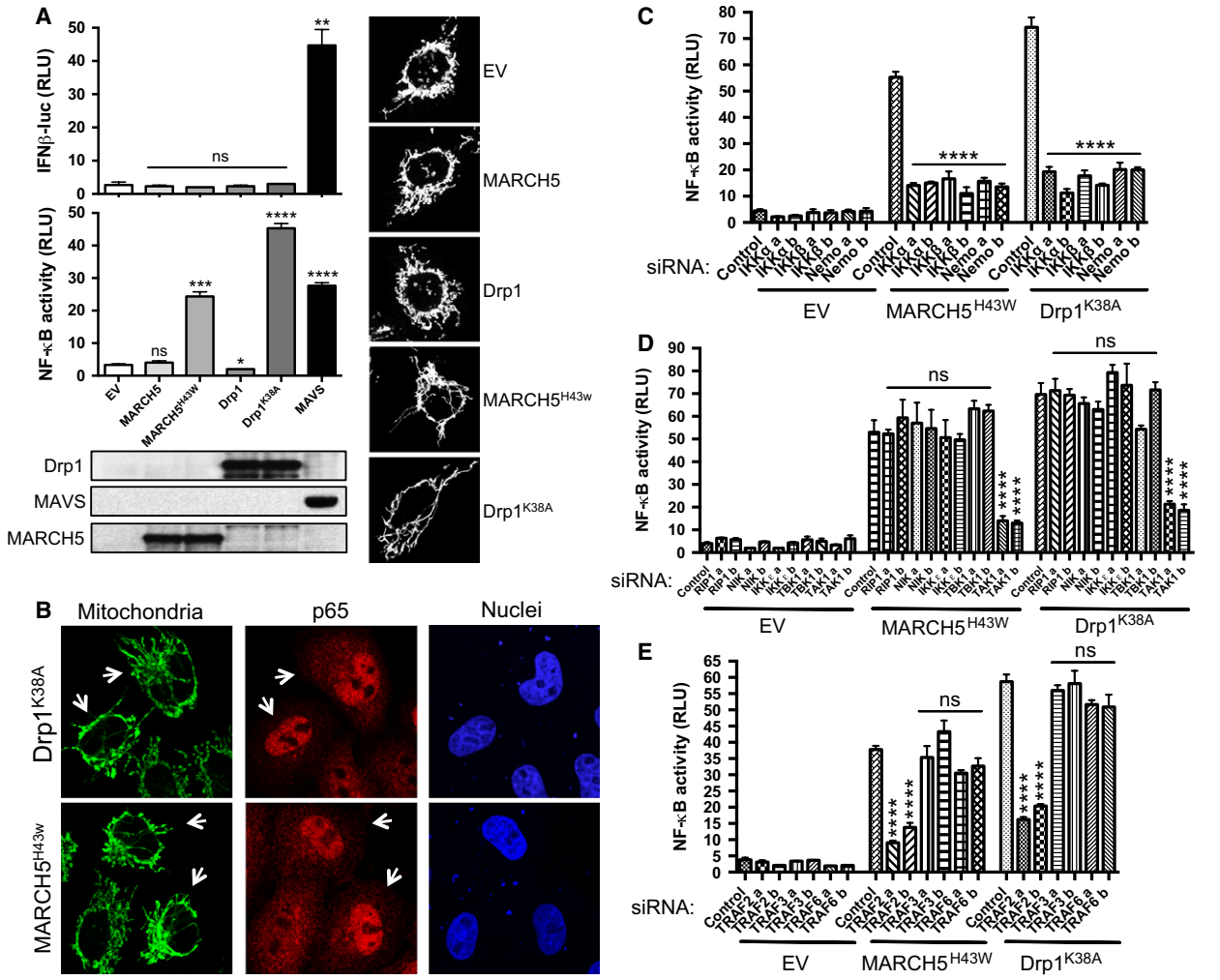


Fig. 1. NF-κB activation triggered by mitochondrial hyperfusion. (A) HEK 293T cells were transfected with either an IFNβ promoter reporter or with an NF-κB reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5, MARCH5^{H43W}, Drp1, Drp1^{K38A} or MAVS. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments (analysis of variance by Student's *t*-tests). ns, not significant; RLU, relative luminescence units. Mitochondrial morphology is shown, together with the levels of the protein encoded by the genes used for transfection. (B) HeLa cells were transfected with a plasmid encoding Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W}. Mitochondrial morphology and the nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit were assessed by immunofluorescence methods, 16 h later. Arrows indicate the transfected cells. (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs, were also transfected 48 h later with an NF-κB reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A}, to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are the means ± SD from three independent experiments. ****$P < 0.0001$ with respect to cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns: not significant.

stimulus-specific ubiquitylated transmitters of NF-κB signaling serve as a platform for the recruitment and activation of the IKK complex [13,14]. Several E3 ubiquitin ligases are involved in their ubiquitylation. In several pathways leading to NF-κB activation, TRAF2, TRAF3 or TRAF6 is responsible for catalyzing the polyubiquitylation of the transmitters of NF-κB signaling [13,14]. In our model, we found that TRAF2 was mainly required for a proper mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation (Fig. 1E).

We recently reported that a relay through metadherin, an endoplasmic reticulum-anchored protein, was required for an optimal NF-κB activation during innate and adaptive immunity [21]. Interestingly, this endoplasmic reticulum relay also seems to be involved in mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation,

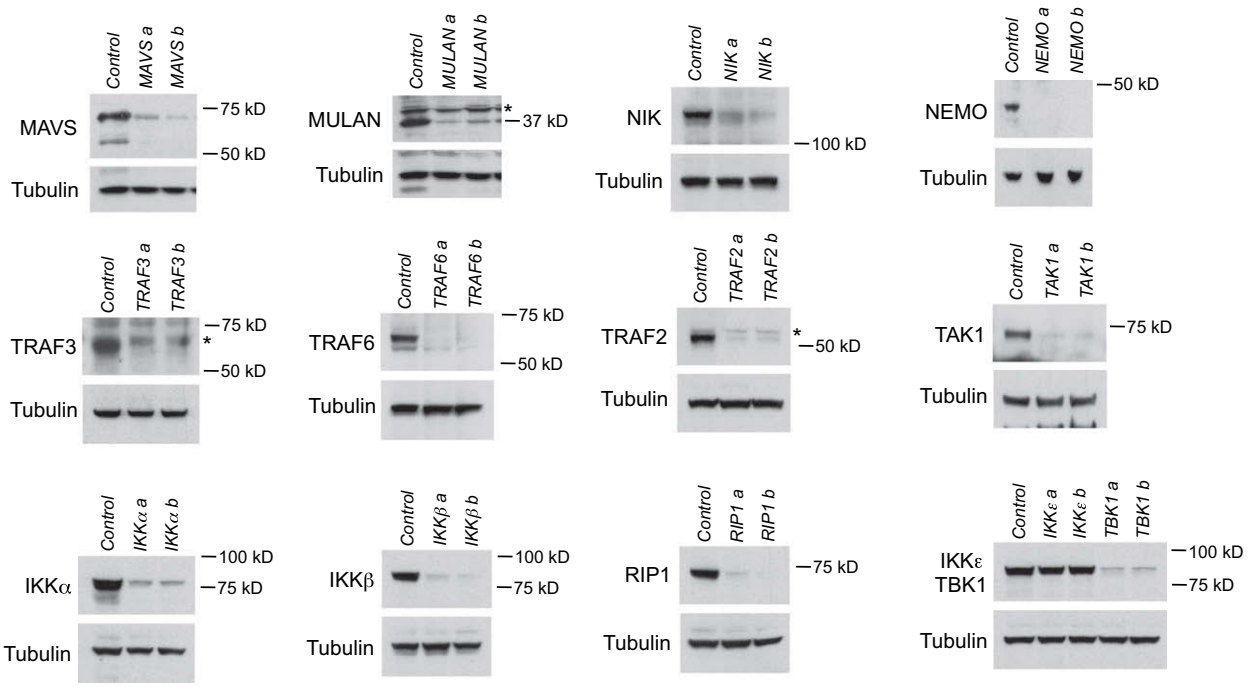


Fig. 2. Efficiency of the used siRNAs. HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs. Knockdown of the targeted protein was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. Tubulin was used as a loading control.

because metadherin knockdown hampered NF-κB activation after the transfection of cells with constructs encoding the mutant forms of Drp1 and MARCH5 (data not shown).

Mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation is dependent on MULAN

As mentioned above, some E3 ubiquitin ligases are involved in the polyubiquitylation of the transmitters of NF-κB signaling, transducing the information leading to NF-κB activation. We therefore hypothesized that mitochondrial dynamics might be linked to NF-κB via the involvement of a mitochondrial E3 ubiquitin ligase in this process. There are 46 genes encoding for E3 ubiquitin ligases with at least one transmembrane domain in the human genome [22], but only four of these enzymes are localized at the mitochondria in normal conditions: MARCH5, TRIM59, MULAN and RNF144b [23]. We assessed whether knocking down the expression of any of these E3 ligases inhibited NF-κB activation after the induction of mitochondrial hyperfusion. Only the absence of MULAN decreased NF-κB activation in response to the expression of $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ (Fig. 3A and data not shown), suggesting that this E3 ubiquitin ligase is involved in mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation. Interestingly, MULAN (mitochondrial ubiquitin ligase activating NF-κB, also called MAPL [24]) has been reported to promote NF-κB activation after transfection [22,25]. MULAN consists of two predicted transmembrane domains and a C-terminal RING finger domain exposed to the cytosol, which is critical for ubiquitin transfer activity [22]. It has been suggested that MULAN regulates mitochondrial dynamics [22], but, in our hands, the loss of MULAN resulted in no obvious changes to the morphology of the mitochondrial network (Fig. 4). The RING domain of MULAN resembles those of c-IAPs [26], and c-IAPs are known to participate in the polyubiquitylation of the transmitter RIP1, to propagate NF-κB activation following TNFR1 stimulation [27,28]. As previously reported [22,25], MULAN specifically triggered NF-κB activation (Fig. 3B) and the ability of MULAN to activate this transcription factor was dependent on the catalytic activity of its RING domain, because the $MULAN^{C339A}$ mutant gave significantly lower levels of NF-κB activation (Fig. 3B). Indeed, based on the available RING finger protein structure [29,30], replacement of the Cys339 residue with an alanine was predicted to prevent Zn^{2+} coordination, thereby impeding the overall function of the RING domain.

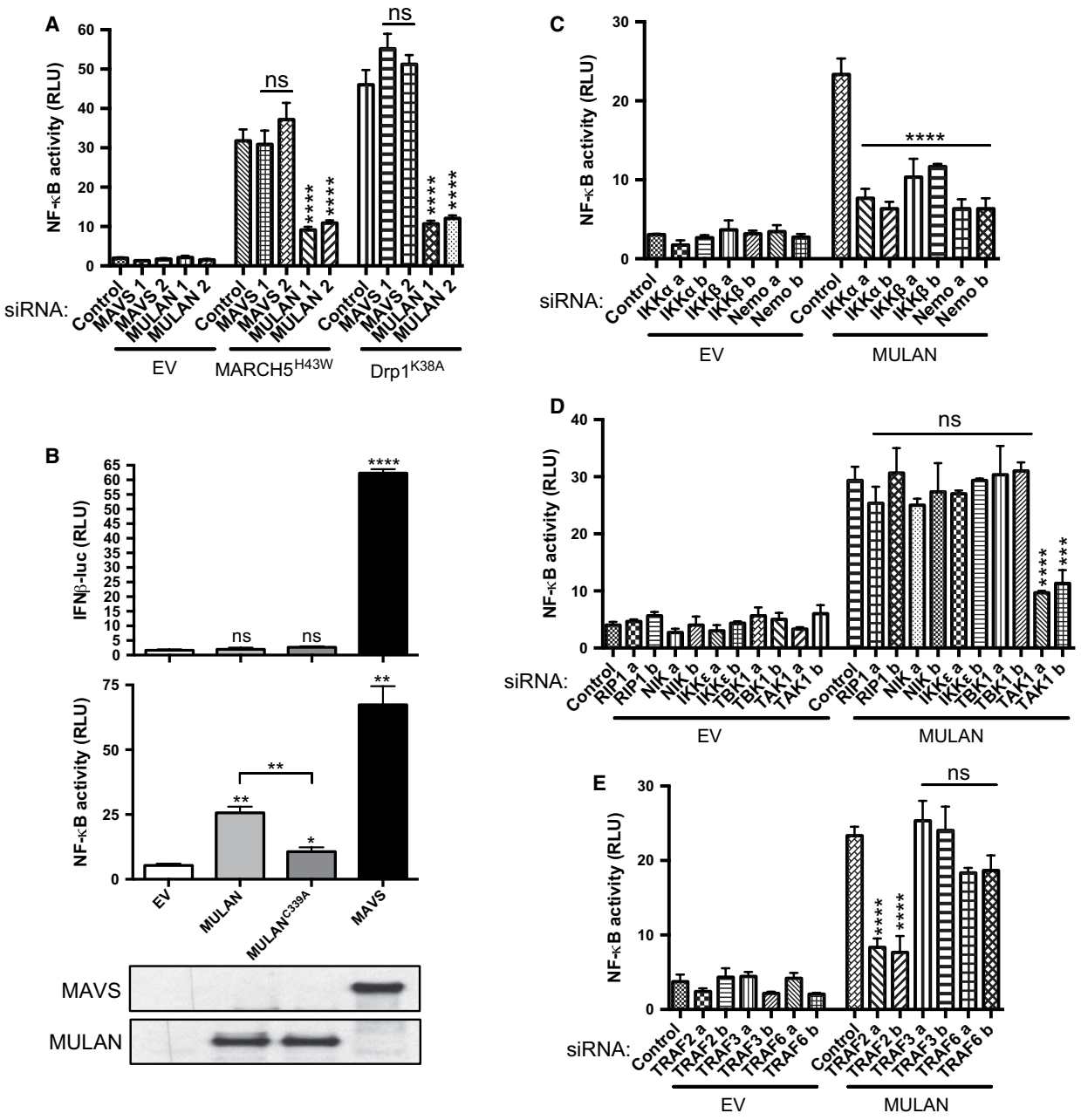


Fig. 3. Involvement of MULAN in mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation. (A) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MAVS or MULAN. The cells were then transfected, 48 h later, with a NF-κB reporter and with the *Renilla* luciferase gene as an internal control, and with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A} to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments. RLU, relative luminescence units. ****$P < 0.0001$ versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (B) HEK 293T cells were transfected with either an IFNβ promoter reporter or with an NF-κB reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN or MULAN^{C339A}. Luciferase assays was performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments (Student's *t*-test). (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs were also transfected 48 h later with an NF-κB reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments. ****$P < 0.0001$, ***$P < 0.001$ versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant.

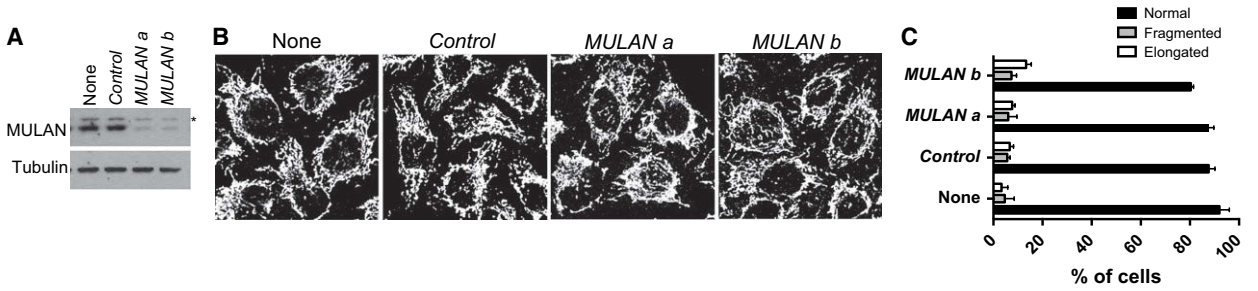


Fig. 4. The knockdown of MULAN does not affect mitochondrial morphology. (A) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. MULAN knockdown was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. (B, C) mitochondrial morphology was then evaluated on the basis of immunofluorescence.

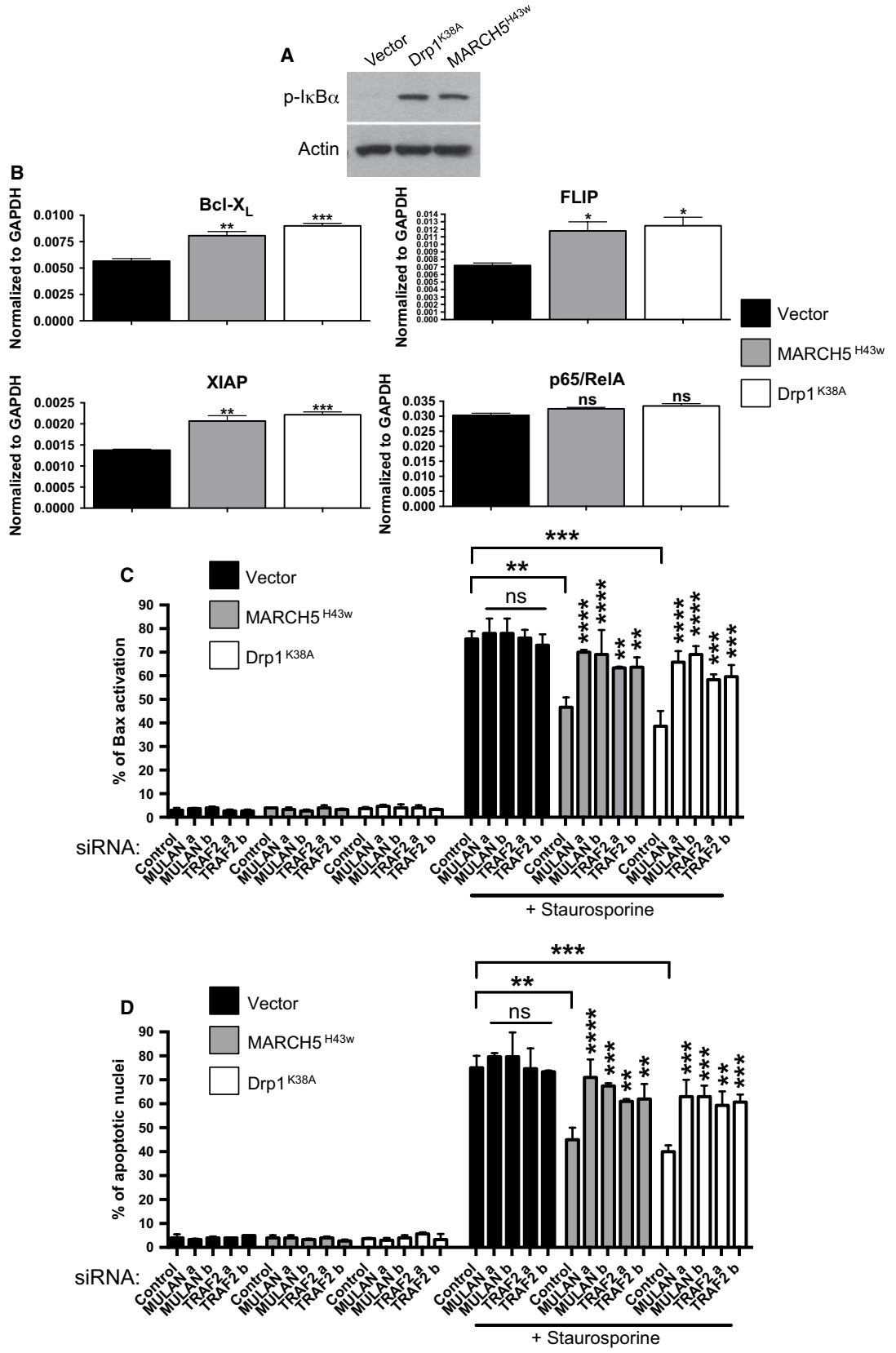
We explored the signaling involved in the NF-κB activation triggered by MULAN, by knocking down the expression of genes encoding several proteins of the NF-κB pathway with specific siRNAs. MULAN appeared to require the E3 ubiquitin ligase TRAF2, TAK1 and IKK to induce NF-κB activation (Fig. 3C–E), as observed after expression of the $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ mutant to promote mitochondrial hyperfusion (Fig. 1C–E). Together, our results suggest that enforced mitochondrial hyperfusion triggers NF-κB activation through the E3 ubiquitin ligases MULAN and TRAF2, and through the canonical pathway involving the TAK1–IKK axis [13].

MULAN and TRAF2 are required for the antiapoptotic function of $Drp1^{K38A}$ and $MARCH5^{H43W}$

The expression of $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ prevents mitochondrial fission after an apoptotic signal, but it also inhibits cytochrome *c* release and cell death [15,31]. Although it is hotly debated [32], it has been proposed that mitochondrial fission is essential for mitochondrial outer membrane permeabilization and downstream cytochrome *c* release [10,15]. Moreover, expression of the dominant-negative form of Drp1 has been reported to prevent Bax activation in response to nitric oxide in neurons [33]. Importantly, the expression of $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ promoted NF-κB activation (Figs 1 and 5A), and this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP (Fig. 5B) [34]. This suggests that $Drp1^{K38A}$ and $MARCH5^{H43W}$ may prevent apoptosis through NF-κB activation and the downstream expression of antiapoptotic genes.

We then assessed the antiapoptotic activity of $Drp1^{K38A}$ or $MARCH5^{H43W}$ in control nonspecific, MULAN- or TRAF2-specific siRNA-transfected cells, because the knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents NF-κB activation after transfection with the mutant constructs (Figs 1E and 3A). In $Drp1^{K38A}$- or $MARCH5^{H43W}$-transfected cells, the inhibition of Bax activation and the apoptosis following treatment with staurosporine were significantly impaired when the expression of MULAN or TRAF2 was knocked down (Fig. 5C,D). These observations suggest that the capability of $Drp1^{K38A}$ and $MARCH5^{H43W}$ to prevent apoptosis is linked at least partly to their roles in activating NF-κB due to the mitochondrial hyperfusion that they induce.

Fig. 5. The knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents the anti-apoptotic effects of $Drp1^{K38A}$ and $MARCH5^{H43W}$. (A) HeLa cells were transfected with vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged $MARCH5^{H43W}$ or YFP-tagged $Drp1^{K38A}$ to promote mitochondrial hyperfusion. Twenty-four hours later, NF-κB activation was assessed with the detection of p-IκBα by immunoblotting cell extracts. Actin was used as a loading control. (B) HeLa were transfected as in (A). Twenty-four hours later, the expressions of Bcl-X_L, FLIP, XIAP and p65/RelA were assessed by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means ± SD from three independent experiments. ***$P < 0.001$, **$0.001 < P < 0.01$, *$0.01 < P < 0.05$ versus cells transfected with the empty vector (Student's *t*-test). ns, not significant. (C) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MULAN or TRAF2. The cells were transfected 48 h later, with a vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged $MARCH5^{H43W}$ or YFP-tagged $Drp1^{K38A}$. Then, 24 h later, cells were left untreated or were treated with staurosporine (2 μM) for 8 h in the presence of zVAD–fmk to prevent apoptosis. The percentage of the YFP-positive cells displaying Bax activation was then assessed on the basis of immunofluorescence using a Bax antibody (clone 6A7) that only recognizes the active form of Bax [42]. The data shown are the means ± SD from three independent experiments, with 300 cells per condition. ****$P < 0.0001$, ***$P < 0.001$, **$0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (D) As in (C) but with the percentage of apoptotic nuclei in the YFP-positive cells determined by Hoechst staining.


A
Vector
Drp1K38A
MARCH5H43w
p-IκBα
Actin
B
Bcl-XL
FLIP
XIAP
p65/RelA
Normalized to GAPDH
Vector
MARCH5 H43w
Drp1 K38A
C
% of Bax activation
siRNA:
Control
MULAN a
MULAN b
TRAF2 a
TRAF2 b
+ Staurosporine
D
% of apoptotic nuclei
ns

NF-κB activation is associated with stress-induced mitochondrial hyperfusion

It has been reported that mitochondria hyperfuse and form a highly interconnected network in cells exposed to a number of stress stimuli preventing protein synthesis, such as cycloheximide (CHX), actinomycin D (ActD) and UV irradiation (UV-C); this process was named 'stress-induced mitochondrial hyperfusion' (SIMH) [11]. We investigated whether this SIMH was accompanied by NF-κB activation. UV-C is known to promote NF-κB activation [35]. We investigated whether treatment with ActD or CHX could promote both SIMH and NF-κB activation. As initially reported [11], treatment with ActD or CHX induced SIMH, and this mitochondrial hyperfusion was also associated with NF-κB activation, as indicated by the nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit (Fig. 6A). As previously described [11], morphological changes in the mitochondria were first detected 2–3 h after the induction of stress, and this process became stronger with time, peaking at 6–9 h with the formation of highly interconnected mitochondria (Fig. 6B). The nuclear translocation of p65 occurred concomitantly with mitochondrial hyperfusion (Fig. 6B). Similar results were obtained for cells treated with ActD (data not shown). The occurrence of mitochondrial hyperfusion in the absence of protein synthesis (CHX is a reversible inhibitor of translation, whereas ActD prevents transcription) ruled out the possibility of the highly interconnected mitochondrial network being formed as a consequence of the transcriptional activity of NF-κB. Finally, the slow degradation of the NF-κB inhibitor IκBα after treatment with CHX confirmed that mitochondrial hyperfusion was associated with NF-κB activation (Fig. 6C).

We then investigated the possible role of SIMH in the observed activation of NF-κB. For this purpose, we investigated NF-κB activation in OPA1-deficient cells, comparing the results obtained with those for wild-type cells, because OPA1 has been shown to be required for SIMH [11]. As previously described [11], SIMH did not occur in OPA1−/− mouse embryonic fibroblasts (MEFs) after treatment with CHX for few hours (Fig. 7A), but nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit was also found to be partially inhibited, as demonstrated by comparison with wild-type MEFs (Fig. 7A,B). Moreover, the slower degradation of IκBα in OPA1−/− than in wild-type MEFs confirmed the requirement of SIMH for an optimal NF-κB activation (Fig. 7C). The lack of OPA1 had no effect on the rapid activation of NF-κB after tumor necrosis factor (TNF)α treatment (Fig. 8), suggesting that the molecular machinery responsible for NF-κB activation was not affected in these cells. Finally, confirming that NF-κB activation was decreased in SIMH incompetent cells after CHX treatment, the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis (after a period of recovery to get rid of the inhibitory effect of CHX on the protein synthesis) and the secretion of the NF-κB target gene TNFα were reduced in the OPA1−/− MEFs in comparison with wild-type MEFs (Fig. 7D–F).

MULAN is involved in NF-κB activation during SIMH

Because mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation is dependent on MULAN (Fig. 3), we hypothesized that this E3 ubiquitin ligase might be required for the NF-κB activation detected during SIMH (Fig. 6). The antibody directed against MULAN that we obtained did not cross-react with murine MULAN. We therefore knocked down MULAN levels by transfecting HEK 293T cells with specific siRNAs. We then assessed the impact of MULAN loss on NF-κB activation following CHX treatment. As in MEFs, CHX treatment in HEK 293T cells promoted a slow activation of NF-κB, as demonstrated by monitoring the degradation of IκBα (Fig. 9A). This degradation was delayed in MULAN siRNA-transfected cells (Fig. 9B). The impact of MULAN silencing on NF-κB activation was also assessed by investigating the nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit. MULAN siRNA-transfected cells displayed lower levels of nuclear translocation for p65 than control cells (Fig. 9C–E). SIMH took place after CHX treatment in cells displaying MULAN knockdown, whereas NF-κB activation was impaired (Fig. 9C,D), suggesting that MULAN plays a role downstream from SIMH in NF-κB activation. Finally, to confirm a role of MULAN in NF-κB activation during SIMH, we observed that the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis and the secretion of TNFα were diminished in MULAN siRNA-transfected cells after CHX treatment (Fig. 9F–H).

Because TRAF2 was found to be required for the activation of NF-κB by MULAN (Fig. 3E), we hypothesized that these two E3 ubiquitin ligases are part of the same complex, promoting NF-κB activation, during SIMH. We then immunoprecipitated TRAF2 and demonstrated a time-dependent recruitment of MULAN after the induction of SIMH (Fig. 10A) suggesting that these two proteins integrate the same complex after SIMH induction. When OPA1 expression was knocked down to suppress SIMH, the

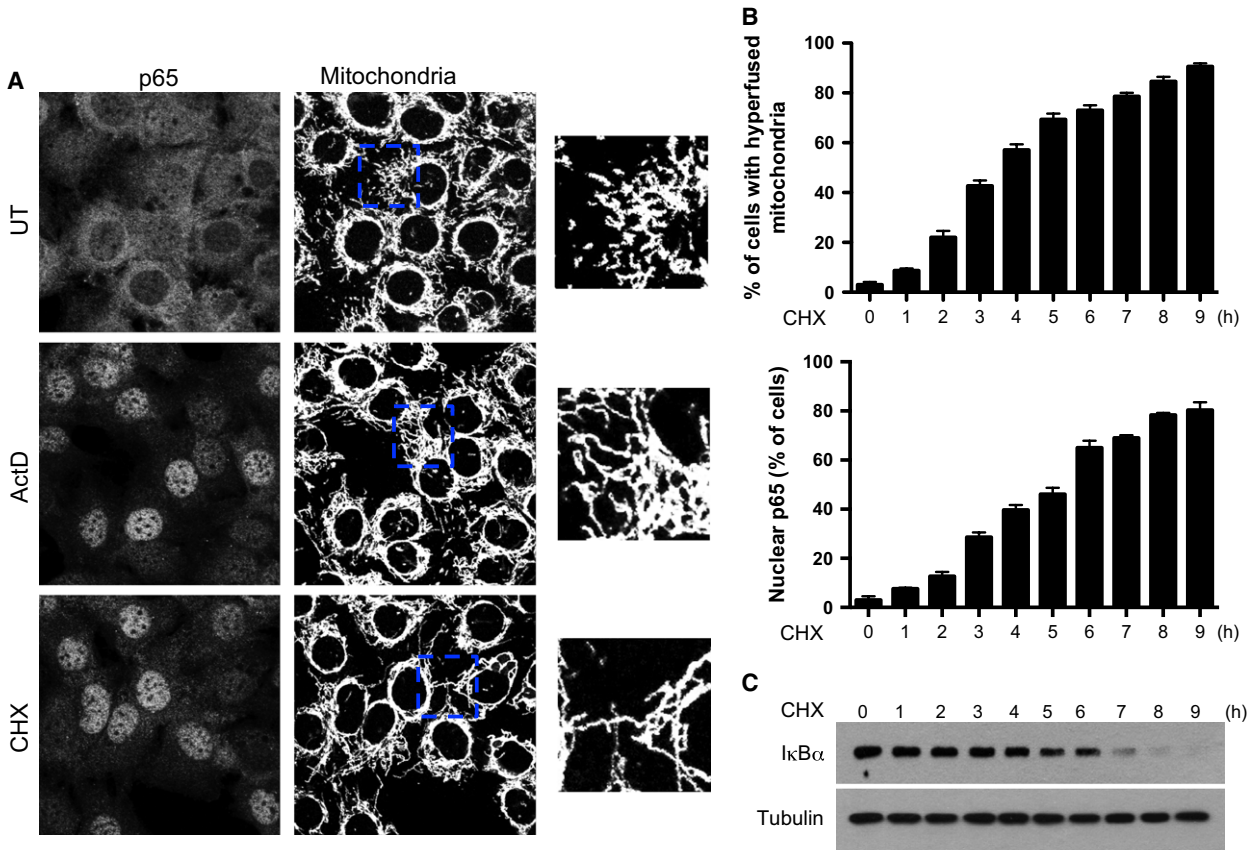


Fig. 6. Stress-induced mitochondrial hyperfusion is accompanied by an activation of NF-κB. (A) Wild-type MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to 3 $\mu g \cdot mL^{-1}$ actinomycin D (ActD) or 10 μM cycloheximide (CHX) for 9 h. The nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit and mitochondrial morphology [mitochondria stained with anti-(cytochrome *c*)Ig] were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) Quantification, over time, of MEFs exposed to 10 μM CHX and with very long, connected, tubular (hyperfused) mitochondria (upper histogram) or with nuclear p65 (lower histogram). (C) Wild-type MEFs were exposed to 10 μM CHX. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, to assess the degradation of IκBα at various time points. Tubulin was used as a loading control.

association between TRAF2 and MULAN was impaired (Fig. 10B), indicating a requirement for mitochondrial network fusion for the formation of a TRAF2-MULAN complex to ensure NF-κB activation. Finally, the level of ubiquitylation of TRAF2 was investigated during SIMH, in the presence and the absence of MULAN. In cells transfected with MULAN siRNA, TRAF2 was significantly less ubiquitylated than in control cells after the induction of SIMH, suggesting a role for MULAN in the polyubiquitylation of TRAF2 in this pathway (Fig. 10C).

Discussion

The activation of pro-apoptotic Bcl-2 members, such as Bax or Bak, in response to strong stress signals promotes mitochondrial outer membrane permeabilization. This leads to the release into the cytosol of mitochondrial apoptogenic factors, such as cytochrome *c*, which triggers caspase activation, leading to apoptosis [36]. By contrast, following moderate stress responses of various types, leading to protein synthesis inhibition, cells undergo SIMH and become more resistant to apoptosis [11]. It has been suggested that the increase in mitochondrial ATP production that accompanies SIMH constitutes an adaptive prosurvival response to stress [11], but our findings suggest that SIMH also stimulates an antiapoptotic pathway involving NF-κB activation, because this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes, such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP [34]. Indeed, we found that SIMH was associated with NF-κB activation, and that mitochondrial dynamics and NF-κB were linked via the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN, for which a knockdown of expression was shown to inhibit SIMH-induced NF-κB activation.

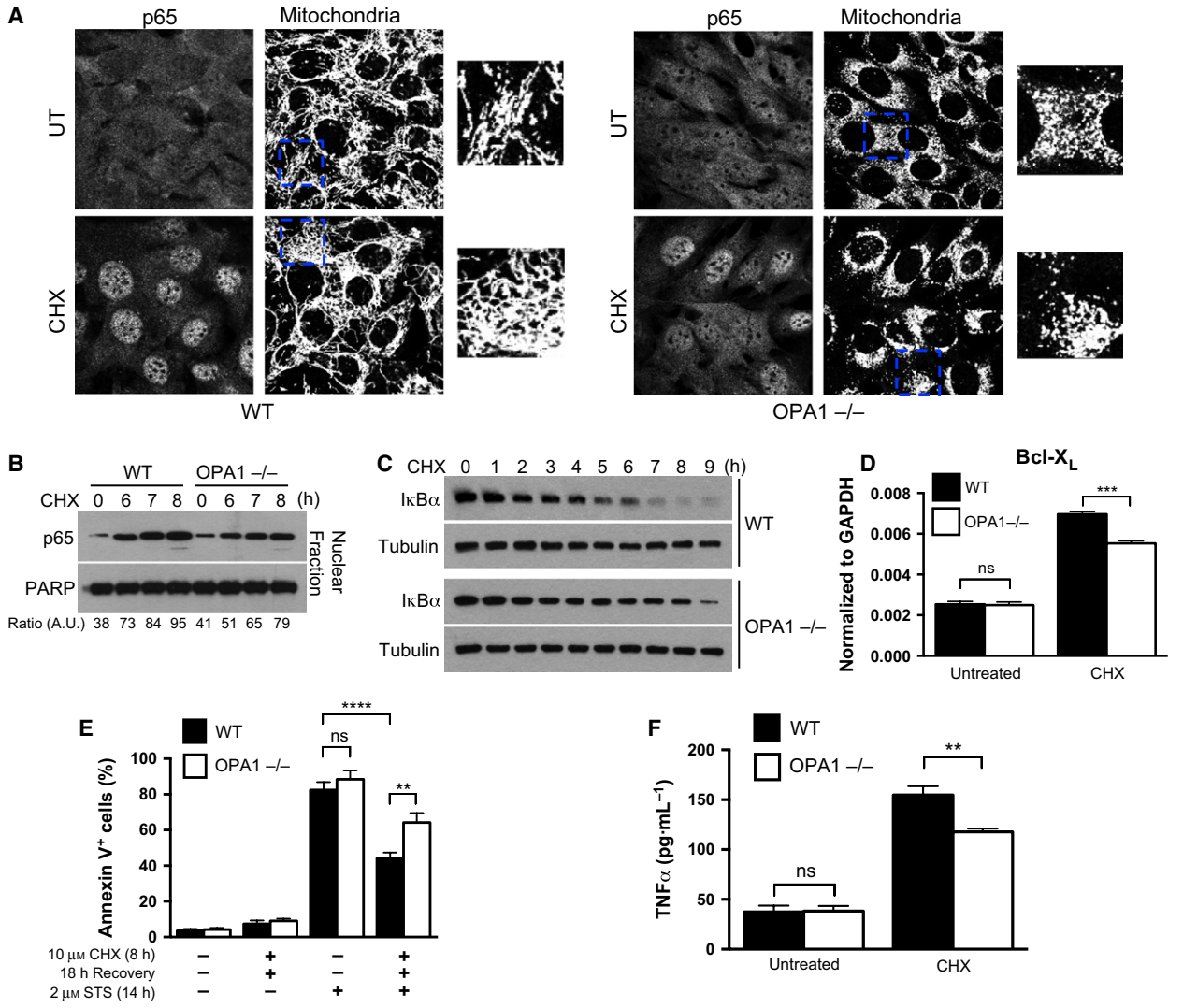


Fig. 7. The inhibition of SIMH impairs NF-κB activation. (A) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to 10 μM CHX for 9 h. Nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit and mitochondrial morphology were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 6, 7 or 8 h. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (C) WT or OPA1−/− MEFs were exposed to 10 μM CHX. The degradation of IκBα was then assessed in cell extracts, by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (D) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means ± SD from three independent experiments. ***$P < 0.001$ versus the WT cells (Student's *t*-test). ns, not significant. (E) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 8 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μM staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow cytometric analysis. The data shown are means ± SD from three independent experiments. ****$P < 0.0001$, **$0.001 < P < 0.01$ versus WT cells (Student's *t*-test). ns, not significant. (F) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNFα was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means ± SD from three independent experiments. **$0.001 < P < 0.01$ versus WT cells (Student's *t*-test). ns, not significant.

Nevertheless, although we have determined that NF-κB activation is linked to SIMH, the overall NF-κB activation as a consequence of stress stimuli preventing protein synthesis is likely not only dependent of the SIMH. For instance, UV treatment has been reported to promote SIMH [11] and NF-κB activation in part

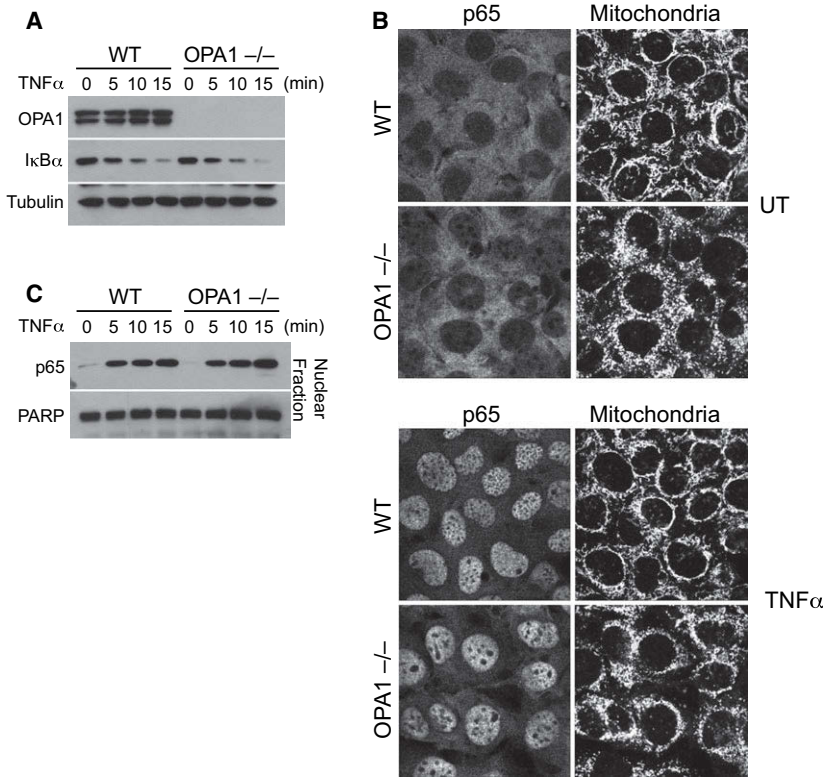


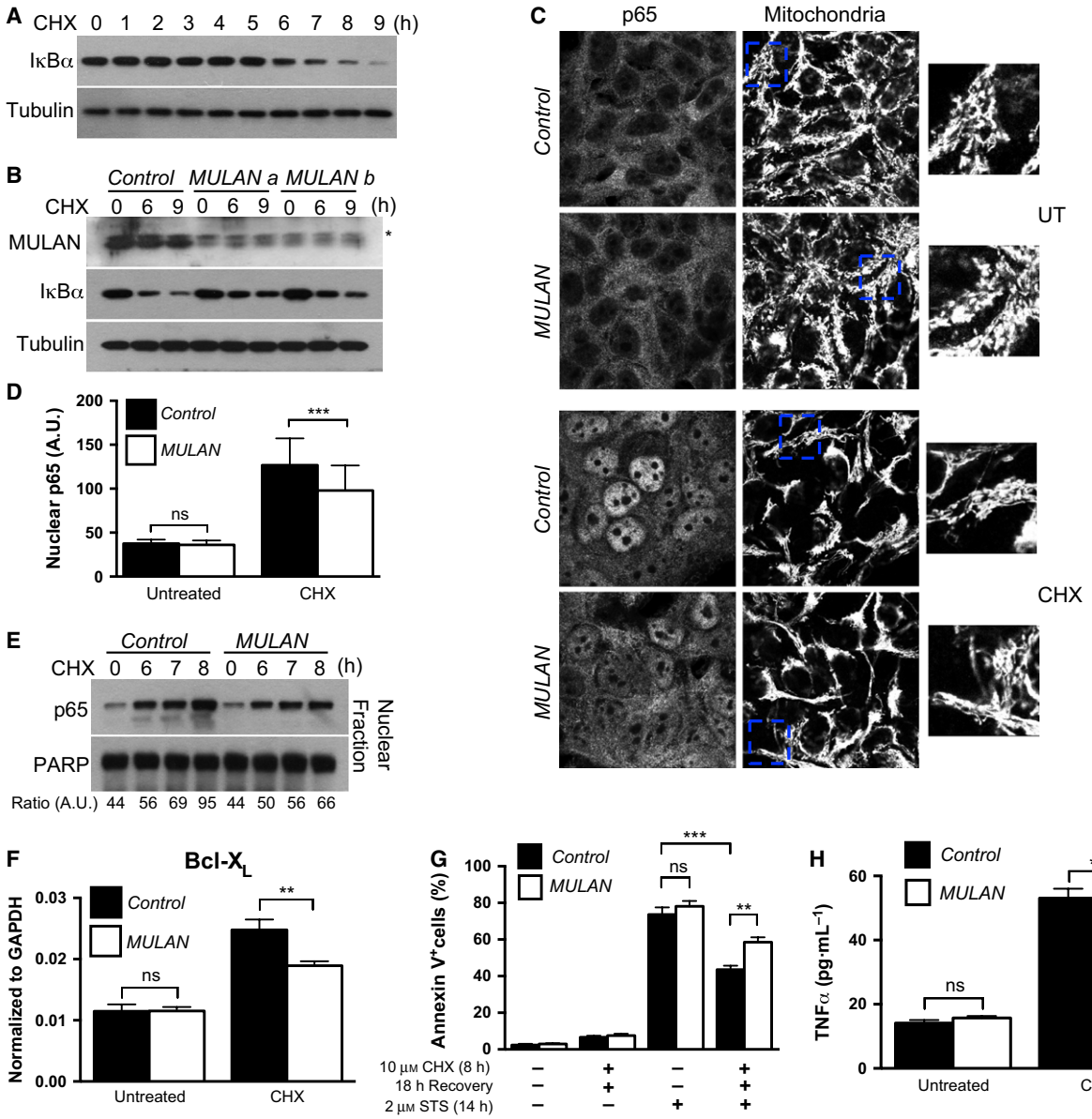
Fig. 8. The loss of OPA1 does not affect NF-κB activation upon TNFR stimulation. (A) WT and OPA1−/− MEFs were treated with TNFα (10 ng·mL^{-1}) for 0, 5, 10 or 15 min. The cell extracts were analyzed by immunoblotting, as indicated. (B) WT or OPA1−/− MEFs were treated with TNFα (10 ng·mL^{-1}) for 0 or 15 min. Nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit and mitochondrial morphology were then assessed by immunofluorescence. (C) WT or OPA1−/− MEFs were either left untreated or exposed to TNFα (10 ng·mL^{-1}) for 0, 5, 10 or 15 min. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit. The nuclear protein PARP served as a loading control.

through MULAN (our unpublished data), but DNA damage is also well known to promote NF-κB activation through ATM and a post-translational modification of NEMO [37]. Similarly, ActD or CHX treatment that triggers SIMH probably also promotes NF-κB activation independently of the mitochondrial dynamics and MULAN, explaining therefore the fact that, in OPA1−/− cells or after MULAN knockdown, the modulation in NF-κB activation is modest.

MULAN is anchored in the mitochondrial outer membrane [22,26] and has been reported to promote NF-κB activation when overexpressed [22,25]. We show here that the ability of this protein to promote NF-κB activation is dependent on its RING domain. Because the RING domain of MULAN resembles those of IAPs [26] and c-IAPs are important effectors of NF-κB activation through the promotion of polyubiquitylation for the transmitters of the NF-κB pathway [27,28], MULAN probably regulates the activation of this transcription factor in a similar way. Following TNFR1 activation, c-IAPs and TRAF2/5 induce the polyubiquitylation of RIP1, and the ubiquitin chains linked to RIP1 play a key role in IKK activation by the kinase TAK1 [13,14]. In our hands, MULAN required TRAF2 to activate NF-κB in a TAK1- and IKK-dependent manner. However, whereas TRAF2 co-immunoprecipitated with MULAN during SIMH, it remains unclear whether MULAN binds directly to TRAF2 or whether MULAN and TRAF2 form a complex with a transmitter of the NF-κB pathway, as for the RIP1/c-IAPs/TRAF2 complex, following TNFR1 stimulation [13,14].

SIMH and the ensuing activation of NF-κB result from stress signals inhibiting protein synthesis (UV-C, CHX, ActD, etc.). The transcriptional activity of NF-κB is thus impaired in these conditions. Nevertheless, cells exposed to this stress signal for prolonged periods eventually die by apoptosis (indeed, UV-C, CHX and ActD are known to be good inducers of apoptosis). This implies that the prosurvival effect of SIMH, due to increases in ATP production [11] or NF-κB activation (this study), is effective only for brief periods of stress. More prolonged periods of exposure to stress instead result in apoptosis. Finally, one interesting question that remains unanswered concerns the way in which the inhibition of protein synthesis is 'sensed' within the mitochondria to promote SIMH.

Based on our results, we propose the following working model (Fig. 10D). After a moderate stress leading to protein synthesis inhibition (UV, CHX, ActD, etc.), SIMH takes place, promoting MULAN activation. The resulting hyperfusion of the mitochondrial network involves OPA1 and the mitochondrial inner membrane protein SLP-2, a member of the



SPFH family (prohibitin/stomatin/flotillin/Hflk) of putative scaffolding proteins, as previously reported [11]. It remains unclear how SIMH activates MULAN, and this aspect merits further exploration. MULAN then triggers the polyubiquitylation of a transmitter of the NF-κB pathway. The TAK1/TABs and IKK complexes are recruited to the polyubiquitin chains. TAK1 phosphorylates IKKβ, which in turn, promotes NF-κB activation by inducing the phosphorylation and proteasome degradation of IκBα. Free NF-κB dimers then migrate into the nucleus to exert their transcriptional effects. The ubiquitylated transmitter of this NF-κB signaling pathway may be TRAF2, which we found to interact with MULAN and to be less ubiquitylated in the absence of MULAN during SIMH. TRAF2 functions as a polyubiquitylated transmitter of the NF-κB pathway in B cells, following engagement of the TNFR family member CD40 [38], providing support for the idea that TRAF2 may act as a polyubiquitylated transmitter during SIMH.

It was recently shown that, during autophagy, mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability [39]. The reported mitochondrial elongation during autophagy seems to be similar to the mitochondrial hyperfusion observed when protein synthesis is blocked, suggesting that MULAN may be activated during autophagy. Interestingly, there seems to be a link between the NF-κB signaling pathway and

Fig. 9. Involvement of MULAN in NF-κB activation during SIMH. (A) HEK 293T cells were exposed to 10 μM CHX. The degradation of IκBα was then assessed in cell extracts by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (B) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or treated with 10 μM CHX for 6 or 9 h. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, as indicated. Tubulin was used as a loading control. * indicates a probable nonspecific band. (C) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated (UT) or exposed to 10 μM CHX for 9 h. Mitochondrial morphology and nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. The pixel intensity of the nuclear signal of p65 in 50 cells in each condition was quantified using IMAGEJ software in (D). ***$P < 0.001$, versus cells transfected with the control siRNA. ns, not significant; AU, arbitrary unit. (E) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit after exposure to 10 μM CHX for 6, 7 and 8 h. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (F) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Seventy-two hour later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means ± SD from three independent experiments. **$0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns, not significant. (G) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 8 h. Then the cells were washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μM staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow-cytometric analysis. The data shown are means ± SD from three independent experiments. ***$P < 0.001$, **$0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns: not significant. (H) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNFα was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means ± SD from three independent experiments. **$0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns, not significant.

the induction of autophagy, because constitutively active IKK subunits have been shown to stimulate autophagy and to transduce multiple signals operating in starvation-induced autophagy, including the phosphorylation of AMPK and JNK [40]. The involvement of MULAN in autophagy, through its capability to activate NF-κB, should thus be explored further.

In conclusion, our results shed light on a new function of mitochondria in the activation of the transcription factor NF-κB, as a result of SIMH, via the E3 ubiquitin ligase MULAN. Our findings demonstrate that, over and above their role in bioenergetics and cell death, mitochondria are also organelles responsible for the sensing of stress signals and their conversion into biological responses.

Experimental procedures

Cell culture and reagents

MEFs and HEK 293T cells were cultured in standard conditions. HEK 293T cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). OPA1−/− and the corresponding wild-type MEFs [41] were provided by D.C. Chan (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA). CHX, ActD and staurosporine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Protein extraction and immunoblot analysis

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). After incubation on ice for 10 min, a soluble extract was obtained by centrifugation at 11 000 ***g*** for 10 min at 4 °C. The lysate (20 μg) was boiled in SDS sample buffer and resolved by SDS/PAGE. Immunoblot analysis was performed with specific antibodies and the antigen–antibody complexes were visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Subcellular fractionation

For immunoblot analysis of the nuclear translocation of p65, 5–10 × 10^6 cells were washed with 1× NaCl/P_i and incubated for 5 min at 4 °C in 200 μL buffer A (10 mM Hepes pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF and Complete protease inhibitor cocktail). Plasma membranes were solubilized by incubation with 12.5 μL of 10% Igepal (Sigma) for 5 min at 4 °C. Nuclei were collected by centrifugation at 600 ***g*** and washed twice with buffer A. Nuclear proteins were then extracted by incubation with 30 μL buffer B (20 mM Hepes pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM

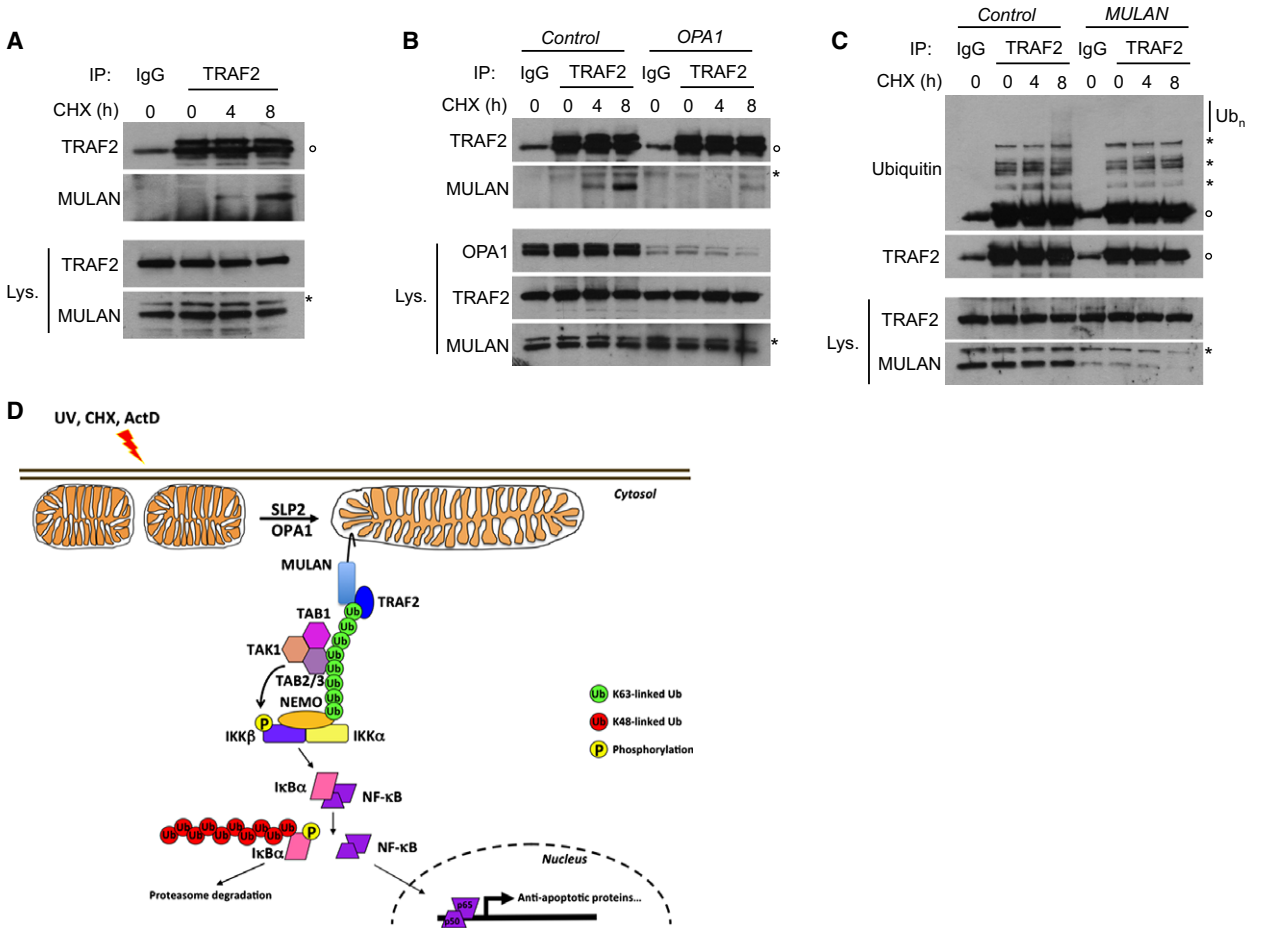


Fig. 10. MULAN and TRAF2 integrate the same complex during SIMH. (A) HEK 293T cells were either left untreated or exposed to 10 μM CHX for 4 or 8 h. Cell lysates (Lys) were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody raised against TRAF2 or with a control IgG. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. ° IgG heavy chains. * probable non specific band. (B) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against OPA1. Cells were then treated as in (A). ° IgG heavy chains. * probable non specific band. C, HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN, then treated and analyzed as in (A). ° IgG heavy chains. * probable non specific band. Ub_n, polyubiquitylation; D, working model, see discussion for description.

NaF, and Complete protease inhibitor cocktail), with shaking. Nuclear extracts were cleared by centrifugation at 13 000 ***g*** and analyzed by immunoblotting.

Antibodies

The primary antibodies used for immunoblotting were as follows: mouse monoclonal anti-(Drp1/Dlp1) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA, clone 8; 1 : 4000 dilution), mouse monoclonal anti-(Cardif/MAVS) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA, clone Adri-1; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-(MULAN/MAPL) (kindly provided by Dr H.M. McBride, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-MARCH5 (kindly provided by Dr R.J. Youle, NIH/NINDS, Bethesda, MD, USA; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, clone 10D8; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-IκBα (Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-PARP (BD Biosciences, clone C2-10; 1 : 4000), mouse monoclonal anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-OPA1 (BD Biosciences, clone 18; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Santa Cruz Biotechnology, clone P4D1; 1 : 1000), rabbit polyclonal anti-NIK (Santa Cruz Biotechnology, H-248; 1 : 1000), mouse monoclonal anti-(IKKγ/NEMO) (BD Biosciences, clone C73-764; 1 : 2000), rabbit polyclonal anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, H-122; 1 : 1000),

mouse monoclonal anti-TRAF6 (Santa Cruz Biotechnology, clone D—10; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-TAK1 (Cell Signaling Technology; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-IKKα (BD Biosciences, clone B78-1; 1 2000), mouse monoclonal anti-IKKβ (BD Biosciences, clone F18-1875; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-RIP1 (BD Biosciences, clone 38/RIP; 1 : 4000). The antibody used for the immunoprecipitation of endogenous TRAF2 was a mouse monoclonal anti-TRAF2 Ig (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2). The primary antibodies used for immunofluorescence microscopy were rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 500), mouse monoclonal anti-cytochrome *c* (BD Biosciences, clone 6H2.B4; 1 : 800) and mouse monoclonal anti-Bax (clone 6A7; 1 : 200; Sigma-Aldrich).

Transfections and plasmids

HEK 293T and HeLa cells were transfected using Fugene 6 (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The various plasmids used, encoding Drp1, Drp1^{K38A}, MARCH5, MARCH5^{H43W}, MULAN or MULAN^{C339A}, were kindly provided by R.J. Youle.

Luciferase assays

Cells were plated in 24-well plates. On the second day, cells were cotransfected with 200 ng of the plasmid of interest and 50 ng of a construct encoding firefly luciferase under the control of the IFNβ promoter or driven by three copies of an NF-κB enhancer, and 10 ng of the *Renilla* luciferase pRL–TK plasmid (Promega). Transfected cells were collected and luciferase activity was assessed in the Dual-luciferase reporter assay (Promega), on a Fluorostar Optima machine (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Each experiment was carried out in triplicate. For each sample, the number of firefly luciferase luminescence units was divided by the number of *Renilla* luciferase luminescence units to obtain the number of relative luminescence units (RLU).

Immunoprecipitation

Cell lysates were prepared in lysis buffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 1% Triton X-100, and 1% Nonidet P-40) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail and incubated on ice for 20 min. Soluble proteins were subjected to immunoprecipitation with an anti-TRAF2 (2 $\mu g \cdot mL^{-1}$), or mouse anti-IgG serum as a control. An aliquot of the total lysate was included as a control. After incubation for 1 h, 20 μL of equilibrated protein G–agarose beads (Roche Molecular Biochemicals) were added. The mixture was incubated for 1 h to allow immunoprecipitation to occur. The beads were then washed three times with buffer C. Immune complexes were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown in LabTek (Fisher Scientific, Illkirch, France) chambers were fixed by incubation for 10 min in 4% paraformaldehyde, and then permeabilized by incubation with 0.15% Triton X-100 in NaCl/P_i for 15 min. The cells were then incubated for 1 h in blocking buffer (2% BSA in NaCl/P_i) and then with the primary antibodies. The cells were washed three times, for 10 min each, in NaCl/P_i, then incubated for 1 h with Alexa Fluor secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a ×63 oil immersion fluorescence objective.

Small interfering RNA (siRNA)

For the downregulation of proteins, we transfected HEK 293T cells for 72 h, with siRNA oligomers at a final concentration of 20 nM, by the calcium phosphate precipitation method. HeLa cells were transfected with siRNAs (20 nM) using oligofectamine (Life Technologies). We purchased the specific siRNAs and the control nonspecific siRNA from Sigma Aldrich. The references of the siRNA oligomers used are as follows: MULAN a (SASI_Hs01_00083230), MULAN b (SASI_Hs01_00083231), MAVS a (SASI_Hs01_00128708), MAVS b (SASI_Hs01_00128711), NIK a (SASI_Hs01_00141408), NIK b (SASI_Hs01_00141410), IKKγ/NEMO a (SASI_Hs02_00321554), IKKγ/NEMO b (SASI_Hs02_00321555), IKKα a (SASI_Hs01_00206922), IKKα b (SASI_Hs01_00206923), IKKβ a (SASI_Hs01_00156170), IKKβ b (SASI_Hs01_00156172), TRAF2 a (SASI_Hs01_00095954), TRAF2 b (SASI_Hs01_00095956), TRAF3 a (SASI_Hs02_00335396), TRAF3 b (SASI_Hs02_00335397), TRAF6 a (SASI_Hs01_00116390), TRAF6 b (SASI_Hs01_00116391), RIP1 a (SASI_Hs01_00071803), RIP1 b (SASI_Hs01_00071805), TAK1 a (SASI_Hs01_00234777), TAK1 b (SASI_Hs01_00234778), IKKε a (SASI_Hs01_00107520), IKKε b (SASI_Hs01_00107521), TBK1 a (SASI_Hs01_00062066), TBK1 b (SASI_Hs01_00062067) and OPA1 (SASI_Hs01_00152069).

Real-time quantitative PCR

RNA was extracted from cells using RLT lysis buffer and purified using a QIAGEN RNeasy Mini kit according to the manufacturer's protocol. RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. A total of 1 μg of total RNA was used for cDNA synthesis using a Revert Aid H minus First Strand DNA Synthesis kit (Fermentas, Villebon-sur-Yvette, France). cDNA was amplified by PCR with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) using SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR-Green I; Roche Applied Science, Roche Diagnostics).

Specific primers were used for Bcl-X_L, XIAP, FLIP, p65/RelA, or the mean value GAPDH as housekeeping gene, under the following conditions: 95 °C for 15 min, 40 cycles at 94 °C for 15 s and at 55 °C for 30 s, then 72 °C for 30 s. Specific primers were designed by Universal Probe Library System (Roche Applied Science). The sequences of the primers used are as follows: hBcl-X_L (Forward: AG CCTTGGATCCAGGAGAA, reverse: AGCGGTTGAA GCGTTCCT); mBcl-X_L (CTGGCTAGGAGCCCTTCAG, AGGGATGAGACAGGCCAAG); hFLIP (TCCTGAA CAGTACTATTTCGTGTGA, AGCATGAGATATAAAA TGAAAAGAAGG); hXIAP (TTTTGGGACATGGATA TACTCAGTT, AGCACTTTACTTTATCACCTTCACC), p65/RelA (TCATGAAGAAGAGTCCTTTCAGC, GGAT GACGTAAAGGGATAGGG); hGAPDH (AGCCACATC GCTCAGACAC, AATACGACCAAATCCGTTGACT); mGAPDH (AGCTTGTCATCAACGGGAAG, TTTGAT GTTAGTGGGGTCTCG).

Results were expressed as $2^{-\Delta Cp}$, where Cp is the cycle threshold number. Dissociation curves were analyzed after each run for each amplicon to assess the specificity of the quantification when using SYBR Green.

Assessment of apoptosis by flow cytometry

Phosphatidylserine exposure was detected using Annexin V FITC kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After apoptosis induction, Annexin V labeling was measured using an Accuri flow cytometer.

ELISA

Cells were plated in 24-well plates at a cell density of 2×10^5 cells per well. Eighteen hours after CHX treatment, supernatants of cells were collected and ELISA assay was performed following the manufacturer's protocol (Quantikine ELISA, mouse or human TNFα, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analysis

Two-way ANOVA tests with *post hoc* Tukey's analysis were used to assess the statistical significance of differences (GRAPHPAD PRISM software), and *P*-values are indicated in the figure legends. In some cases, as indicated data were compared in Student's *t*-tests. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$. ****$P < 0.0001$, ***$P < 0.001$, **$0.001 < P < 0.01$, *$0.01 < P < 0.05$. ns, not significant.

Acknowledgements

We would like to thank Drs R.J. Youle and H.M. McBride for kindly providing plasmids and antibodies. We also thank Dr N. Bidere for his advices and comments on our manuscript. We are also very grateful to Lola Lecru for her assistance in RT-qPCR. This work was supported by grants from La Ligue contre le cancer (Equipe Labellisée), l'association pour la recherche contre le cancer (ARC) and Université Paris Sud XI.

Author contributions

Planned the experiments: NZ, MP, DA. Performed the experiments: NZ, MP, GA, EH, DA. Analyzed data: AV, DA. Wrote the paper: DA.

References

1 McBride H & Scorrano L (2013) Mitochondrial dynamics and physiology. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 148–149.
2 Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252.
3 James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373–36379.
4 Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ & Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* **191**, 1141–1158.
5 Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE & Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* **12**, 565–573.
6 Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245–2256.
7 Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15927–15932.
8 Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM & Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858–862.
9 Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G *et al.* (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433–446.
10 Martinou JC & Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* **21**, 92–101.
11 Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P,

Raschke I, Merkwirth C *et al.* (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* **28**, 1589–1600.
12 Baltimore D (2011) NF-kappaB is 25. *Nat Immunol* **12**, 683–685.
13 Napetschnig J & Wu H (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* **42**, 443–468.
14 Skaug B, Jiang X & Chen ZJ (2009) The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**, 769–796.
15 Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL & Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515–525.
16 Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN & van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351–358.
17 Karbowski M, Neutzner A & Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* **178**, 71–84.
18 Seth RB, Sun L, Ea CK & Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682.
19 Castanier C, Garcin D, Vazquez A & Arnoult D (2010) Mitochondrial dynamics regulate the RIG—I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**, 133–138.
20 Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000158.
21 Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C *et al.* (2013) The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling. *Sci Signal* **6**, ra79.
22 Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S & Joazeiro CA (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487.
23 Neutzner A, Benard G, Youle RJ & Karbowski M (2008) Role of the ubiquitin conjugation system in the maintenance of mitochondrial homeostasis. *Ann NY Acad Sci* **1147**, 242–253.
24 Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA & McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* **18**, 102–108.
25 Bae S, Kim SY, Jung JH, Yoon Y, Cha HJ, Lee H, Kim K, Kim J, An IS, Um HD *et al.* (2012) Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. *Cell Res* **22**, 873–885.
26 Zhang B, Huang J, Li HL, Liu T, Wang YY, Waterman P, Mao AP, Xu LG, Zhai Z, Liu D *et al.* (2008) GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth. *Cell Res* **18**, 900–910.
27 Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ & Barker PA (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* **30**, 689–700.
28 Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G & Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**, 245–257.
29 Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M & Musco G (2005) NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* **280**, 11505–11512.
30 Katoh S, Hong C, Tsunoda Y, Murata K, Takai R, Minami E, Yamazaki T & Katoh E (2003) High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **278**, 15341–15348.
31 Fang L, Hemion C, Goldblum D, Meyer P, Orgul S, Frank S, Flammer J & Neutzner A (2012) Inactivation of MARCH5 prevents mitochondrial fragmentation and interferes with cell death in a neuronal cell model. *PLoS One* **7**, e52637.
32 Sheridan C & Martin SJ (2010) Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**, 640–648.
33 Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA & Bossy-Wetzel E (2007) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* **14**, 462–471.
34 Ben-Neriah Y & Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* **12**, 715–723.
35 Devary Y, Rosette C, DiDonato JA & Karin M (1993) NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**, 1442–1445.
36 Youle RJ & Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59.
37 McCool KW & Miyamoto S (2012) DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* **246**, 311–326.

38 Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E & Karin M (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **321**, 663–668.

39 Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**, 589–598.

40 Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Tasdemir E, Galluzzi L, Shen S *et al.* (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* **29**, 619–631.

41 Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749–755.

42 Hsu YT & Youle RJ (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **272**, 13829–13834.

ANNEXE III

Aristolochia longa aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells.

Bachir Banarba, Gorbatchev Ambroise, Abdelkader Aoues, Boumedienne Meddah, Aimé Vazquez

Int J Green Pharm. 2012.

[PDF Purchased from http://www.greenpharmacy.info on Monday, July 02, 2012]abce

ORIGINAL ARTICLE

Aristolochia longa aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells

Bachir Benarba[1], Gorbatchev Ambroise[2,3], Abdelkader Aoues[4], Boumedienne Meddah[1,5], Aimé Vazquez [2,3]

[1]Department of Biology, Laboratory for Research on Biological Systems and Geomatics, [5]Department of Biology, Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologie et Sécurité Sanitaire, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara, Algeria, [2]Regulation of Cell Survival and Allograft, INSERM UMR-S 1014, Lavoisier Building, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France, [3]Department of Medicine, Faculty of Medicine, Paris-Sud University, France, [4]Department of Biology, Laboratory of Experimental Biotoxicology, Biodepollution and Phytoremediation, Es-Senia University, Oran, Algeria

Aristolochia longa (from the family Aristolochiaceae) is widely used for cancer treatment in Algerian traditional medicine. The aim of the present study was to investigate the cytotoxic and apoptogenic activities. The phytochemical composition and acute toxicity of aqueous extracts of the roots of *A. longa* from Algeria. An aqueous extract (decoction) of dried *A. longa* roots was prepared. The cytotoxic effects of this aqueous extract were then evaluated in Burkitt's lymphoma BL41 cells, by flow cytometry. The induction of apoptosis was assessed in two corroborative assays: The propidium iodide staining of cell DNA and flow cytometry analyses of light scattering. Mitochondrial membrane potential was investigated with the fluorescent dye DIOC6. The expression and activation of capases-3, -8 and -9 were assessed by Western blotting. Acute oral toxicity was evaluated with a test dose limited to 5000 mg/kg. Phytochemical screening of *A. longa* roots was performed with standard qualitative procedures. The aqueous extract of *A. longa* induced cell death in a dose-dependent manner. The IC_{50} of *A. longa* aqueous extract was estimated at about 15,63 µg/ml. The extract-induced apoptosis, a loss of mitochondrial membrane potential and the activation of caspases-9 and -3 followed by PARP cleavage. *A. longa* could therefore be considered a promising source of novel treatments for Burkitt's and other lymphomas.

Key words: Apoptosis, *Aristolochia longa*, Burkitt's lymphoma BL41 cell lines, caspase, mitochondrial pathway

INTRODUCTION

Plants are the reservoirs of a large number of imperative organic compounds and they have long been used as the sources of medicines.[1] More than 3000 plants world wide have been reported to possess anticancer properties.[2] The search for anti-cancer agents from plant sources started in earnest in the 1950s with the discovery and development of the vinca alkaloids, vinblastine and vincristine, and the isolation of the cytotoxic podophyllotoxins.[3] Today, almost 60% of drugs approved for cancer treatment are of natural origin.[4]

A. longa belongs to the genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae), which has up to 500 species, most of which are found in tropical, subtropical and Mediterranean regions of the world.[5,6] Anticancer activities have been reported for some species of *Aristolochia,* such as *A. mollissima*,[7] *A. acuminate*,[8] *A. constricta*,[9] *A. rotunda*[10] and *A. clematitis*.[11] *Aristolochia longa*, commonly known as 'Berrostom' to the local population in Algeria, is widely used in traditional medicine. It has been reported that the most widely uses of *A. longa* in Algeria are in cancer treatment.[12-14] The use of this plant as an anti-cancer has been also reported in Morocco.[15]

The aim of this study was to evaluate scientifically the traditional uses of *A. longa,* by studying its effects on the *in vitro* viability of tumour cells. We investigated the cytotoxic and apoptogenic activities of an aqueous extract of *A. longa* in the Burkitt's lymphoma BL41 cell line.

Access this article online	
Quick Response Code:	Website: www.greenpharmacy.info
	DOI: 10.4103/0973-8258.97128

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Anti-Puma (4976), anti-caspase-3 (9662) and anti-caspase-9 (9502) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-caspase-8 (5F7) antibody from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), anti-PARP-1 antibody from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA), anti-tubulin (TU-02) antibody from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Propidium iodide was obtained from

Address for correspondence: Dr. Bachir Benarba, Laboratory for Research on Biological Systems and Geomatics, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara, Algeria. E-mail: bachirsb@yahoo.fr
Received: 22-11-2011; **Accepted:** 21-02-2012

[PDF Purchased from http://www.greenpharmacy.info on Monday, July 02, 2012]abce

Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA) and DIOC6 from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands).

Preparation of *Aristolochia longa* Aqueous Extract

Roots of *A. longa* were collected in March 2009; in "Tissemssilet" (western Algeria). Dr. Kada Righi (Department of Agriculture, Mascara University, Algeria) was responsible for botanic identification and authentication. The collected roots were dried at room temperature, pulverized and finely sieved. The aqueous extract of *A. longa* was prepared as follows: The dried roots were boiled for 20 min at 100°C, cooled to room temperature and then filtered. The solution passing through the filter was collected, concentrated, lyophilized and stored in a desiccator at +4°C until use.

Cells and Culture Conditions

The Burkitt's lymphoma BL41 cells, provided by Dr. S. Sharma (Brown University, RI) were cultured in RPMI 1640 medium with Glutamax supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, sodium pyruvate and 1% nonessential amino acids, under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in air, at 37°C.

Detection of Apoptotic Cells

Analysis of dot-blot light scatter profiles

Cells were used to seed 96-well plates at a density of 1×10^5 cells/ml and were incubated with *Aristolochia longa* aqueous extract (0–500 µg/ml) for 24 h. Apoptotic cells were detected by flow cytometry, as previously described.[16] Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), pelleted and resuspended in PBS. Their dotblot light scatter profiles were analyzed by flow cytometry, with a FACScan flow cytometer (Accuri C6, Accuri Cytometers Inc, Ann Arbor MI, USA). Shrunken cells with relatively high side-scatter and low forward-scatter properties were considered to be apoptotic and were counted. Apoptotic cell counts are expressed as a percentage of the total population.

Hypodiploid DNA

Following exposure to *A. longa* aqueous extract for 24 hours, BL 41 cells (10^6 cells) were washed in PBS and re-suspended in 1 ml of hypotonic fluorochrome solution (50 µg/ml propidium iodide in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100), as previously described.[17] Samples were placed at room temperature for 1 h before flow cytometry analysis of the propidium iodide fluorescence of individual nuclei in a FACScan flow cytometer (Accuri C6, Accuri Cytometers Inc, Ann Arbor MI, USA). The DNA content of the intact nuclei was recorded on a logarithmic scale. Apoptotic cells were identified on the basis of their nuclei having hypodiploid DNA.

Analysis of Mitochondrial Membrane Potential (ΔΨm)

The loss of mitochondrial membrane potential was assessed by flow cytometry, as described by.[18] ΔΨm was evaluated by staining cells (10^6 cells) with DIOC6 at a final concentration of 40 nM (stock solution, 40 mM in ethanol) for 15 min at 37°C in the dark. The fluorescence emitted by cells was analyzed with a FACScan flow cytometer (Accuri C6), using the fluorescence signal 1 channel. Cells with low ΔΨm were counted and their number is expressed as a percentage of the total population.

Western Blot Analysis

Treated and untreated cells were collected by centrifugation at 300×*g* for 5 min at 4°C, washed twice with ice-cold PBS and lysed by incubation with RIPA lysis buffer (1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and 1 mM Protease Inhibitor Cocktail in 20 mM Tris HCl buffer, p 7.5) for 30 min on ice. The debris was removed by centrifugation at 10,000×*g* for 10 min. Aliquots of the supernatants were used for protein determination by the Bradford method. Equal amounts of protein (30 µg) were subjected to SDS-PAGE, and the proteins were then electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 hour by incubation with 5% nonfat milk powder in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20. The membranes were then incubated overnight at 4°C with specific antibodies. Blots were washed three times, for 10 min each, in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20, and were then incubated for 1 h with peroxidase-labeled anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins. They were washed a further three times in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 and images were then acquired with a DDC camera (LAS-1000; Fuji).

RESULTS

We investigated the effects of an aqueous extract of *A. longa* roots on cell viability *in vitro*, by incubating BL 41 cells with various concentrations of *A. longa* aqueous extract or control extract. After 24 h, cell viability was determined by flow cytometry. We determined survival as a percentage of that

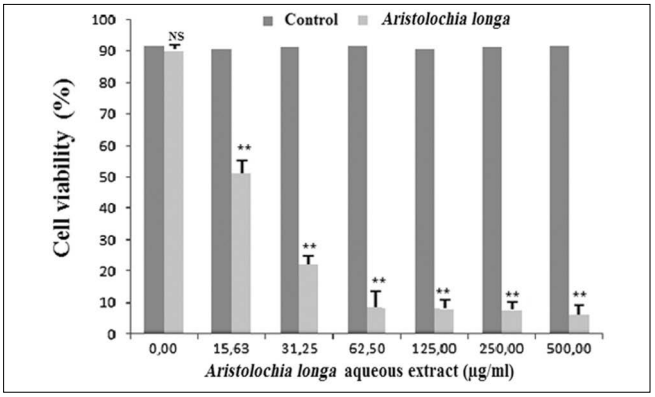


Figure 1: Effect of *Aristolochia longa* aqueous extract on the viability of BL 41 cells. **The difference in cell viability between untreated cells and cells treated with *Aristolochia longa* aqueous extract was highly significant (P<0.001)

[PDF Purchased from http://www.greenpharmacy.info on Monday, July 02, 2012]abce

for untreated cells. *A. longa* aqueous extract induced cell death in a dose-dependent manner [Figure 1]. By contrast, no decrease in cell viability was observed with the control extract. The IC_{50} of *A. longa* aqueous extract was estimated at 15.63 µg/ml. We then investigated whether this decrease in cell viability was associated with the induction of apoptosis. We used a flow cytometry-based approach to quantify apoptotic cells as shrunken cells with high side-scatter (SSC) and low forward-scatter (FSC) properties.[16] The proportion of apoptotic cells, as determined on the basis of cell dot-blot light scatter profiles, increased in a dose-dependent manner in the presence of *A. longa* aqueous extract. Stimulation with *A. longa* extract also promoted the appearance of nuclear features of apoptosis, such as hypodyploidy, as revealed by propidium iodide (PI) staining. Indeed, 20.7% of the BL41 cell exposed to 125 µg/ml *A. longa* extract for 24 hours had hypodiploid nuclei, versus only 2.7% of control cells [Figure 2]. We investigated the involvement of mitochondria in *A. longa*-induced apoptosis, by evaluating changes in mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye DIOC6(3).[19] *A. longa* stimulation was associated with a loss of ΔΨm, (53 *vs*. 11.6% in control cells), indicating an ability of *A. longa* extract to induce mitochondrial dysfunctions in BL41 cells [Figure 3].

We further investigated the molecular mechanism responsible for the induction by *A. longa* aqueous extract of apoptosis in BL41 cells, by studying the activation of various caspases involved in the intrinsic (caspase-9) and extrinsic (caspase-8) pathways of apoptosis. The treatment of BL41 cells with *A. longa* aqueous extract at a concentration of 125 µg/ml for 24 hours led to the activation of caspases-9 and -3, as shown by the disappearance of the inactive proforms and the appearance of active cleaved forms [Figure 4]. By contrast, no activation of caspase-8 was observed in this context. Activated caspase-3 cleaves various cellular proteins, including PARP, this cleavage being one of the most distinctive features of apoptotic cell death.[20] For confirmation of the ability of *A. longa* extract to activate caspase-3, we investigated PARP cleavage in untreated and treated cells, by Western blot analysis of the 116 kDa-intact and 89 kDa cleaved PARP proteins. Activation by incubation with *A. longa* aqueous extract resulted in PARP cleavage [Figure 5], confirming the involvement of caspase-3 in this process.

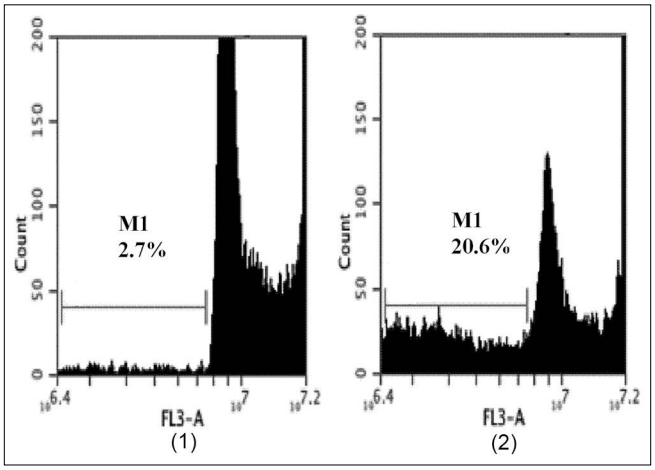


Figure 2: *Aristolochia longa* aqueous extract induces the apoptosis of BL 41 cells

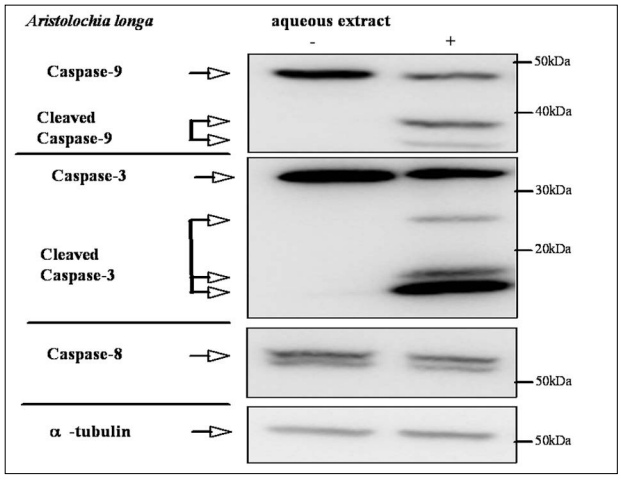


Figure 4: *Aristolochia longa* aqueous extract induces activation of the intrinsic/ mitochondrial apoptotic pathway

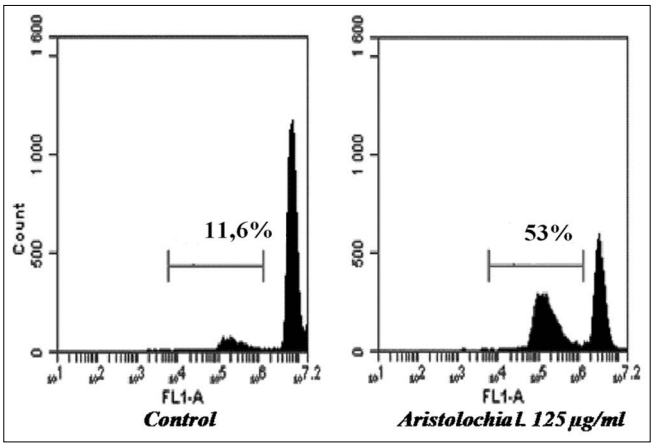


Figure 3: *Aristolochia longa* aqueous extract induces a loss of ΔΨm BL41 cells were incubated with *Aristolochia longa* aqueous extract

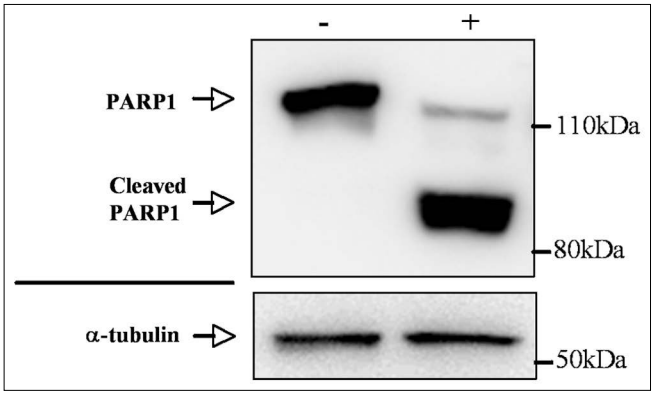


Figure 5: *Aristolochia longa* aqueous extract induced PARP cleavage

[PDF Purchased from http://www.greenpharmacy.info on Monday, July 02, 2012]abce

DISCUSSION

Searching for new biologically active compounds, novel chemotherapeutic agents derived from active phytochemicals, could be used to improve the anti-carcinogenicity of standard drug treatment.[21] According to the WHO, about 60% of anti-tumoral medicines are thought to have been derived, either directly or indirectly, from medicinal plants.[22] *A. longa* is widely used in traditional medicine in Algeria.[12-14] In this study, we investigated the cytotoxic and apoptogenic effects of *A. longa* aqueous extract in BL 41 cells. No previous study has investigated the cytotoxic and apoptogenic effects of this plant. We observed that *A. longa* aqueous extract caused marked cell growth inhibition of BL 41 cells in a dose-dependent manner. The administration of 62.50 µg/ml *A. longa* aqueous extract almost abolished the proliferation of BL 41 cells (91.2% inhibition of proliferation), and the use of this extract at a concentration of 500 µg/ml, the maximal dose used, resulted in 93.5% inhibition of the proliferation of BL 41 cells. We subsequently showed that the induction of apoptosis was responsible for the inhibition of tumor cell growth. The induction of apoptosis in tumor cells has been shown to be the most common anti-cancer mechanism conjoint by many cancer therapies.[23] We assessed apoptosis induction in two corroborative assays: The PI staining of cellular DNA after the incubation of cells with *A. longa* aqueous extract and flow cytometric light scatter analysis. In the PI staining assay, the percentage of apoptotic nuclei detected by PI staining and flow cytometry after 24 hours in culture was only 2.7% for control cells, but 20.7% for treated cells. Similar results were obtained in flow cytometric light scatter analyses.

Apoptosis pathways can generally be divided into signaling via the death receptors (extrinsic) or the mitochondria (intrinsic) pathways.[24] The extrinsic pathway is characterised by the activation of cell surface death receptors following binding of their specific ligands. It is mediated by death receptors, a subgroup of the tumour necrosis factor (TNF) receptor superfamily, including CD95 (also known as Fas), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF-R1.[25] The activation of procaspase-8 results in the formation of the death-inducing signaling complex (DISC), which attaches to procaspase-8, leading to autoproteolytic cleavage and the release of active caspase-8.[26] Active caspase-8 then activates effector caspase-3 and/or -7.[27] The intrinsic pathway centers on mitochondria as initiators of cell death. Multiple signals converge on mitochondria, including DNA damage, microtubule disruption, and growth-factor deprivation, causing these organelles to release cytochrome c (cyt c) and other apoptogenic proteins (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF and endonuclease G) into cytosol.[28,29] Released cytochrome c together with cytoplasmic protein Apaf-1 form a complex called APOPTOSOME, where procaspase 9 undergoes activation, which is the main initiator caspase of mitochondrial pathway.[30] Activated caspase-9 can then cleave and activate downstream executioner caspases such as caspase-3. At the onset of apoptosis, activated caspase-3 cleaves PARP, resulting in the formation of PARP cleavage products, a hallmark of apoptosis.[31]

We investigated the molecular mechanism involved in the apoptosis induced by *A. longa* aqueous extract, by assessing the levels of apoptosis-related proteins — caspase-3, caspase-8, caspase-9, and PARP— in BL 41 cells. We found that the apoptosis induced by *A. longa* aqueous extract was accompanied by the activation of caspase-3 and caspase-9 with the cleavage of PARP, suggesting that the aqueous extract-induced apoptosis involves a caspase-dependent mitochondria pathway. The activation of caspases-9 and -3 implies a role for the mitochondrial pathway.[25] *A. longa* aqueous extract also induced the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$), implicating the mitochondrial signaling pathway in the apoptosis induction. We show here that *A. longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis.

However, caspase-8 was not activated. Caspase-8 is considered to be a key caspase involved in signaling in the extrinsic pathway;[32] we can thus rule out death receptor-induced apoptosis as a cause of the mitochondrial activation observed in this study. We propose below a mechanism by which *A. longa* aqueous extract induces apoptosis in BL 41 cells, based on the findings of this study [Figure 6]. In the acute toxicity study (data not shown), in which doses of up to 5000 mg/kg (body weight) were administered, the *A. longa* aqueous extract was found to be safe.

The present evidence suggests that *A. longa* aqueous extract can induce apoptosis in Burkitt's lymphoma BL41 cells, by

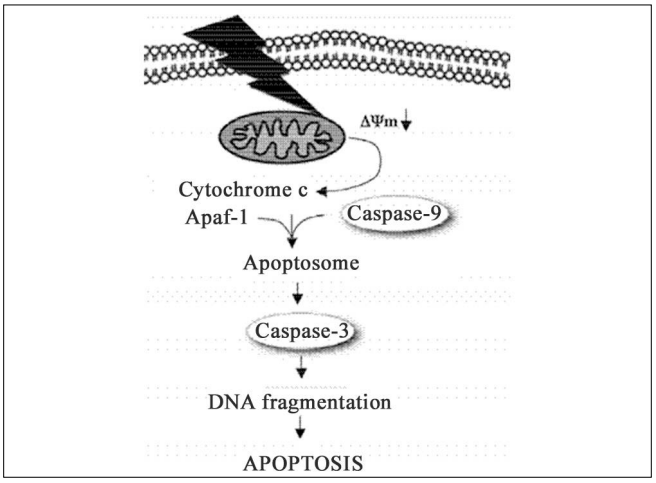


Figure 6: Proposed model for the apoptogenic activity of *Aristolochia longa* aqueous extract on the Burkitt's lymphoma cell lines BL41

[PDF Purchased from http://www.greenpharmacy.info on Monday, July 02, 2012]abce

triggering the mitochondrial pathway (disruption of $\Delta\Psi m$, activation of caspases-9 and -3 and PARP cleavage). Thus, *A. longa* may be considered a promising source of new drugs for treating Burkitt's lymphoma and other lymphomas.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Kada Righi (Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara, Algeria) for plant identification.

REFERENCES

1. Sharma H, Parihar L, Parihar P. Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. J Med Plants Res 2011;5:1818-35.
2. Nawab A, Yunus M, Ali Mahdi A, Gupta S. Evaluation of Anticancer Properties of Medicinal Plants from the Indian Sub-Continent. Mol Cell Pharmacol 2011;3:21-9.
3. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol 2005;100:72-9.
4. Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer drugs from marine flora: An overview. J Oncol 2010;2010:214186.
5. Neinhuis C, Wanke S, Hilu KW, Müller K, Borsch T. Phylogeny of Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood and Bayesian analyses of *trnL-trnF* sequences. Plant Syst Evol 2005;250:7-26.
6. González F, Esquivel HE, Murcia GA and Pabón-Mora N. *Aristolochia pentandra* (Aristolochiaceae) in Colombia: Biogeographic implications and proposed synapomorphies between the pentandrous species of *Aristolochia* and its South American sister group. Rev Aca Colom Cien 2010;34:467-78.
7. Yu JQ, Liao ZX, Cai XQ, Lei JC, Zouc GL. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from Aristolochia mollissima. Environ Toxicol Pharmacol 2007;23:162-7.
8. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Ethnopharmacol 2000;73:347-77.
9. De Tommasi N, Rastrelli L, De Simone F. New Aristoclam glycosides from *Aristolochia constricta*. Nat Prod Lett 1998;11:263-70.
10. Pistelli L, Nieri E, Bilia AR, Marsili A, Morelli I. Further phenantrene derivatives from *Aristolochia rotunda*. Int J Pharmacognosy 1995;33:362-6.
11. Kostalova D, Hrochova V, Pronayova N, Lesko J. Constituents of *Aristolochia-clematitis* L. Chem Pap 1991;45:713-6.
12. Cherif HS, Saidi F, Boutoumi H, Rouibi A, Chaouia C. Identification and characterization of some chemicals from *Aristolochia longa L.* Agricultura 2009;3:76-82.
13. Saidi F, Cherif HS, Metidji H, Rouibia A, Chaouia C, Abdulhussain MS, *et al*. *In vitro* multiplication by direct organogenesis of a medicinal plant *Aristolochia longa L.* Agricultura 2009;3:53-66.
14. Saidi F, Cherif HS, Lazouri H, Aid K, Rouibi A, Bele C, Matea C. Determination of the lipid compounds of *Aristolochia Longa* L. from Algeria. Bull U Agr 2009;66:17-23.
15. Benzakour G, Benkirane N, Amrani M, Oudghiri M. Immunostimulatory potential of *Aristolochia longa* L. induced toxicity on liver, intestine and kidney in mice. J Toxicol Environ Health Sci 2011;3:214-22.
16. Schrantz N, Bourgeade MF, Mouhamad S, Leca G, Sharma S Vazquez A. p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. Mol Biol Cell 2001;12:3139-51.
17. Clybouw C, Mchichi B, Mouhamad S, Auffredou MT, Bourgeade MF, Sharma S, *et al*. Down-regulation of Bim expression: Relationship to resistance to apoptosis. J Immunol 2005;175:2968-73.
18. El Mchichi B, Hadji A, Vazquez A and Leca G. p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. Cell Death Differ 2007;14:1826-36.
19. Li J, Xia X, Ke Y, Nie H, Smith MA and Zhu X. Trichosanthin induced apoptosis in HL-60 cells via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress signaling pathways. Biochim Biophys Acta 2007;1770:1169-80.
20. Karlsson J, Øra I, Pörn-Ares I, Pahlman S. Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53. Clin Cancer Res 2004;10:3179-88.
21. Watanapokasin R, Jarinthanan F, Nakamura Y, Sawasjirakij N, Jaratrungtawee A, Suksamrarn S. Effects of α-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. World J Gastroenterol 2011;17:2086-95.
22. Robinson MM, Zhang X. The world medicines situation 2011, traditional medicines: Global situation, issues and challenges. Geneva: World Health Organization Press; 2011.
23. Huang ST, Yang RC, Yang LJ, Lee PN, Pang JH. *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Lewis lung carcinoma cells. Life Sci 2003;72:1705-16.
24. Hamsa TP, Kuttan J. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. Chin Med 2011;6:11.
25. Liu Z, Cheng M, Cao MZ. Potential targets for molecular imaging of apoptosis resistance in hepatocellular carcinoma. Biomed Imaging Interv J 2011;7:e5.
26. Samm N, Werner K, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C. The role of apoptosis in the pathology of pancreatic cancer. Cancer 2011;3:1-16.
27. Dai Y, Lawrence TS, Xu L. Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor kappa B. Am J Transl Res 2009;1:1-15.
28. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. Int J Cell Biol 2010;2010:370835.
29. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood 2005;106:408-18.
30. Cichorek M. Mechanisms of tumor cell's ability to avoid apoptosis. Dermatologia 2008;10:1-9.
31. Wu J, Liu T, Xie J, Xin F, Guo L. Mitochondria and calpains mediate caspase-dependent apoptosis induced by doxycycline in HeLa cells. Cell Mol Life Sci 2006;63:949-57.
32. Yang HL, Chen SC, Chen CS, Wang SY, Hseu YC. *Alpinia pricei* rhizome extracts induce apoptosis of human carcinoma KB cells via a mitochondria-dependent apoptotic pathway. Food Chem Toxicol 2008;46:3318-24.

How to cite this article: Benarba B, Ambroise G, Aoues A, Meddah B, Vazquez A. *Aristolochia longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 *Burkitt's lymphoma* cells. Int J Green Pharm 2012;6:45-9.

Source of Support: This work was supported by fellowships and grants from CNEPRU 037/2008 (Algeria), INSERM, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), Cancéropole IdF (ERABL project). GA holds fellowships from the Nouvelles Recherches Biomédicale pour vaincre le Cancer (NRB) association., **Conflict of Interest:** None declared.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell, 9*(2), 423-432. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864614

Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science, 281*(5381), 1322-1326. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735050

Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene, 26*(9), 1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220

Aderem A, U. D. (1999). <MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES.pdf>. *Annu Rev Immunol*.

Aichberger, K. J., Mayerhofer, M., Krauth, M. T., Skvara, H., Florian, S., Sonneck, K., . . . Sillaber, C. (2005). Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood, 105*(8), 3303-3311. doi:10.1182/blood-2004-02-0749

Akgul, C., Moulding, D. A., White, M. R., & Edwards, S. W. (2000). In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett, 478*(1-2), 72-76. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922472

Akhoondi, S., Sun, D., von der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., . . . Spruck, C. (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res, 67*(19), 9006-9012. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1320

Al-Hakim, A. K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M., & Alessi, D. R. (2008). Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J, 411*(2), 249-260. doi:10.1042/BJ20080067

Altmann, M., & Hammerschmidt, W. (2005). Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol, 3*(12), e404. doi:10.1371/journal.pbio.0030404

Altmeyer, A., Simmons, R. C., Krajewski, S., Reed, J. C., Bornkamm, G. W., & Chen-Kiang, S. (1997). Reversal of EBV immortalization precedes apoptosis in IL-6-induced human B cell terminal differentiation. *Immunity, 7*(5), 667-677. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390690

Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med, 3*(8), 917-921. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256286

Amerik, A. Y., & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta, 1695*(1-3), 189-207. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., . . . Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol, 12*(1), 25-31. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046040

Antecol, M. H., Darveau, A., Sonenberg, N., & Mukherjee, B. B. (1986). Altered biochemical properties of actin in normal skin fibroblasts from individuals predisposed to dominantly inherited cancers. *Cancer Res, 46*(4 Pt 1), 1867-1873. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3948169

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., . . . Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science, 277*(5324), 370-372. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219694

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., & 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*(15), 11615-11623. doi:10.1074/jbc.M010810200

Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A. E., Stec, B., Reed, J. C., & Liddington, R. C. (2007). Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci, 16*(1), 118-124. doi:10.1110/ps.062454707

Arbour, N., Vanderluit, J. L., Le Grand, J. N., Jahani-Asl, A., Ruzhynsky, V. A., Cheung, E. C., . . . Slack, R. S. (2008). Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage. *J Neurosci, 28*(24), 6068-6078. doi:10.1523/JNEUROSCI.4940-07.2008

Arya, R., Mallik, M., & Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci, 32*(3), 595-610. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536179

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer, 2*(6), 420-430. doi:10.1038/nrc821

Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., & Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol, 9*(5), 550-555. doi:10.1038/ncb1575

Balakirev, M. Y., Tcherniuk, S. O., Jaquinod, M., & Chroboczek, J. (2003). Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep, 4*(5), 517-522. doi:10.1038/sj.embor.embor824

Barboule, N., Truchet, I., & Valette, A. (2005). Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis: co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. *Cell Cycle, 4*(4), 590-596. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15876860

Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., . . . Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature, 463*(7283), 899-905. doi:10.1038/nature08822

Besbes, S., Mirshahi, M., Pocard, M., & Billard, C. (2015). New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins. *Oncotarget, 6*(15), 12862-12871. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25970783

Bhattacharya, S., Ray, R. M., & Johnson, L. R. (2005). STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J, 392*(Pt 2), 335-344. doi:10.1042/BJ20050465

Bicknell, G. R., & Cohen, G. M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun, 207*(1), 40-47. doi:10.1006/bbrc.1995.1150

Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B., & Andrews, D. W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol, 6*(6), e147. doi:10.1371/journal.pbio.0060147

Birnbaum, M. J., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol, 68*(4), 2521-2528. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139034

Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology, 15*(6), 725-731. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.009

Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., . . . Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell, 74*(4), 597-608. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358789

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., . . . Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science, 286*(5445), 1735-1738. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576740

Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., . . . Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature, 415*(6874), 922-926. doi:10.1038/415922a

Breitenbuecher, F., Markova, B., Kasper, S., Carius, B., Stauder, T., Bohmer, F. D., . . . Fischer, T. (2009). A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood, 113*(17), 4063-4073. doi:10.1182/blood-2007-11-126664

Brenner, C., & Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene, 25*(34), 4744-4756. doi:10.1038/sj.onc.1209609

Brown, D. M., Warner, G. L., Ales-Martinez, J. E., Scott, D. W., & Phipps, R. P. (1992). Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol, 63*(3), 221-229. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1623642

Brune, W., Nevels, M., & Shenk, T. (2003). Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein. *J Virol, 77*(21), 11633-11643. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557649

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., . . . et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science, 269*(5232), 1885-1888. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569933

Burns, T. F., Bernhard, E. J., & El-Deiry, W. S. (2001). Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene, 20*(34), 4601-4612. doi:10.1038/sj.onc.1204484

Burroughs, A. M., Jaffee, M., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2008). Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ub-like protein conjugation. *J Struct Biol, 162*(2), 205-218. doi:10.1016/j.jsb.2007.12.006

Callus, B. A., Moujallad, D. M., Silke, J., Gerl, R., Jabbour, A. M., Ekert, P. G., & Vaux, D. L. (2008). Triggering of apoptosis by Puma is determined by the threshold set by prosurvival Bcl-2 family proteins. *J Mol Biol, 384*(2), 313-323. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.041

Carpio, M. A., Michaud, M., Zhou, W., Fisher, J. K., Walensky, L. D., & Katz, S. G. (2015). BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A, 112*(23), 7201-7206. doi:10.1073/pnas.1421063112

Carrillo-Infante, C., Abbadessa, G., Bagella, L., & Giordano, A. (2007). Viral infections as a cause of cancer (review). *Int J Oncol, 30*(6), 1521-1528. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487374

Carroll, R. G., Hollville, E., & Martin, S. J. (2014). Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep, 9*(4), 1538-1553. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.046

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 72*(9), 3666-3670. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1103152

Cartron, P. F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., . . . Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell, 16*(5), 807-818. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.028

Cartron, P. F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., & Vallette, F. M. (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol, 23*(13), 4701-4712. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808108

Casiano, C. A., Martin, S. J., Green, D. R., & Tan, E. M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med, 184*(2), 765-770. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760832

Casimiro, M. C., Crosariol, M., Loro, E., Li, Z., & Pestell, R. G. (2012). Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer, 3*(11-12), 649-657. doi:10.1177/1947601913479022

Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell, 9*(5), 351-365. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027

Chan, W. H., Yu, J. S., & Yang, S. D. (1999). PAK2 is cleaved and activated during hyperosmotic shock-induced apoptosis via a caspase-dependent mechanism: evidence for the involvement of oxidative stress. *J Cell Physiol, 178*(3), 397-408. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199903)178:3<397::AID-JCP14>3.0.CO;2-2

Chao, J. R., Wang, J. M., Lee, S. F., Peng, H. W., Lin, Y. H., Chou, C. H., . . . Yang-Yen, H. F. (1998). mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol, 18*(8), 4883-4898. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671497

Chen, D., Wang, M., Zhou, S., & Zhou, Q. (2002). HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J, 21*(24), 6801-6810. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486001

Chen, H. C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H. C., Huang, Y., Ren, D., . . . Cheng, E. H. (2015). An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol*. doi:10.1038/ncb3236

Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., . . . Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell, 17*(3), 393-403. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030

Chen, Z. J., & Sun, L. J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell, 33*(3), 275-286. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.014

Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., . . . Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science, 278*(5345), 1966-1968. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395403

Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell, 8*(3), 705-711. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583631

Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Dillon, C. P., Kriwacki, R. W., Kuwana, T., & Green, D. R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(51), 20327-20332. doi:10.1073/pnas.0808036105

Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol, 6*(3), 268-275. doi:10.1038/nrm1573

Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell, 37*(3), 299-310. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025

Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., & Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature, 374*(6524), 733-736. doi:10.1038/374733a0

Choi, Y. B., & Harhaj, E. W. (2014). HTLV-1 tax stabilizes MCL-1 via TRAF6-dependent K63-linked polyubiquitination to promote cell survival and transformation. *PLoS Pathog, 10*(10), e1004458. doi:10.1371/journal.ppat.1004458

Christensen, D. E., Brzovic, P. S., & Klevit, R. E. (2007). E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol, 14*(10), 941-948. doi:10.1038/nsmb1295

Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., & Ballard, D. W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*(19), 10057-10062. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9294162

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S., & Hershko, A. (1980). Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem, 255*(16), 7525-7528. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6249802

Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L., & Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 77*(3), 1365-1368. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6769112

Clague, M. J., Barsukov, I., Coulson, J. M., Liu, H., Rigden, D. J., & Urbe, S. (2013). Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev, 93*(3), 1289-1315. doi:10.1152/physrev.00002.2013

Clague, M. J., & Urbe, S. (2006). Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol, 16*(11), 551-559. doi:10.1016/j.tcb.2006.09.002

Clarke, P. G., & Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl), 193*(2), 81-99. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742050

Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., . . . Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc*

Natl Acad Sci U S A, 95(2), 554-559. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435230

Clem, R. J., Fechheimer, M., & Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science, 254*(5036), 1388-1390. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1962198

Clohessy, J. G., Zhuang, J., & Brady, H. J. (2004). Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol, 125*(5), 655-665. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04949.x

Clohessy, J. G., Zhuang, J., de Boer, J., Gil-Gomez, G., & Brady, H. J. (2006). Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem, 281*(9), 5750-5759. doi:10.1074/jbc.M505688200

Clybouw, C., Fischer, S., Auffredou, M. T., Hugues, P., Alexia, C., Bouillet, P., . . . Vazquez, A. (2011). Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma. *Blood, 118*(15), 4120-4128. doi:10.1182/blood-2011-04-347096

Conze, D. B., Wu, C. J., Thomas, J. A., Landstrom, A., & Ashwell, J. D. (2008). Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol, 28*(10), 3538-3547. doi:10.1128/MCB.02098-07

Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G., McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. A., . . . Smith, G. L. (2007). Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol, 88*(Pt 6), 1656-1666. doi:10.1099/vir.0.82772-0

Cosulich, S. C., Savory, P. J., & Clarke, P. R. (1999). Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol, 9*(3), 147-150. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10021389

Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol, 67*(4), 2168-2174. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445726

Cryns, V. L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H., & Yuan, J. (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem, 271*(49), 31277-31282. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940132

Cuconati, A., & White, E. (2002). Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev, 16*(19), 2465-2478. doi:10.1101/gad.1012702

Dabrowska, A., Kim, N., & Aldovini, A. (2008). Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol, 181*(12), 8460-8477. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050264

Dai, H., Smith, A., Meng, X. W., Schneider, P. A., Pang, Y. P., & Kaufmann, S. H. (2011). Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J Cell Biol, 194*(1), 39-48. doi:10.1083/jcb.201102027

Danial, N. N. (2008). BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene, 27 Suppl 1*, S53-70. doi:10.1038/onc.2009.44

Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., . . . Korsmeyer, S. J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex

that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature, 424*(6951), 952-956. doi:10.1038/nature01825

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell, 116*(2), 205-219. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432

De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol, 28*, 435-492. doi:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251

Debatin, K. M., & Krammer, P. H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene, 23*(16), 2950-2966. doi:10.1038/sj.onc.1207558

Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., . . . Kinnally, K. W. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell, 16*(5), 2424-2432. doi:10.1091/mbc.E04-12-1111

Deng, S., Zhou, H., Xiong, R., Lu, Y., Yan, D., Xing, T., . . . Yang, H. (2007). Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat, 104*(1), 21-30. doi:10.1007/s10549-006-9393-7

Deng, X., Gao, F., & May, W. S., Jr. (2003). Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood, 102*(9), 3179-3185. doi:10.1182/blood-2003-04-1027

Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol, 10*(9), 369-377. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932094

Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., . . . Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell, 8*(3), 601-611. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583622

Deshaies, R. J., & Joazeiro, C. A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem, 78*, 399-434. doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., . . . Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J, 17*(8), 2215-2223. doi:10.1093/emboj/17.8.2215

Dewson, G., & Kluck, R. M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci, 122*(Pt 16), 2801-2808. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795525

Dijkers, P. F., Birkenkamp, K. U., Lam, E. W., Thomas, N. S., Lammers, J. W., Koenderman, L., & Coffer, P. J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol, 156*(3), 531-542. doi:10.1083/jcb.200108084

Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L., & Coffer, P. J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol, 10*(19), 1201-1204. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050388

Ding, Q., He, X., Hsu, J. M., Xia, W., Chen, C. T., Li, L. Y., . . . Hung, M. C. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol, 27*(11), 4006-4017. doi:10.1128/MCB.00620-06

Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., & Wyllie, A. H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta, 1133*(3), 275-285. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1737061

Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., . . . Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature, 505*(7484), 509-514. doi:10.1038/nature12940

Douglas, A. E., Corbett, K. D., Berger, J. M., McFadden, G., & Handel, T. M. (2007). Structure of M11L: A myxoma virus structural homolog of the apoptosis inhibitor, Bcl-2. *Protein Sci, 16*(4), 695-703. doi:10.1110/ps.062720107

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell, 102*(1), 33-42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929711

Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J. E., & Kuwana, T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem, 286*(1), 491-501. doi:10.1074/jbc.M110.167148

Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., . . . Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J, 15*(11), 2685-2694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654366

Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., . . . Piccolo, S. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell, 136*(1), 123-135. doi:10.1016/j.cell.2008.10.051

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem, 68*, 383-424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383

Eckelman, B. P., & Salvesen, G. S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem, 281*(6), 3254-3260. doi:10.1074/jbc.M510863200

Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P., & Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(16), 6164-6169. doi:10.1073/pnas.0401471101

Eichhorn, J. M., Sakurikar, N., Alford, S. E., Chu, R., & Chambers, T. C. (2013). Critical role of anti-apoptotic Bcl-2 protein phosphorylation in mitotic death. *Cell Death Dis, 4*, e834. doi:10.1038/cddis.2013.360

Ekholm-Reed, S., Goldberg, M. S., Schlossmacher, M. G., & Reed, S. I. (2013). Parkin-dependent degradation of the F-box protein Fbw7beta promotes neuronal survival in response to oxidative stress by stabilizing Mcl-1. *Mol Cell Biol, 33*(18), 3627-3643. doi:10.1128/MCB.00535-13

Eletr, Z. M., & Wilkinson, K. D. (2014). Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta, 1843*(1), 114-128. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.027

Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., . . . Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature, 461*(7261), 282-286. doi:10.1038/nature08296

Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell, 44*(6), 817-829. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3955651

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature, 391*(6662), 43-50. doi:10.1038/34112

Erlacher, M., Labi, V., Manzl, C., Bock, G., Tzankov, A., Hacker, G., . . . Villunger, A. (2006). Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med, 203*(13), 2939-2951. doi:10.1084/jem.20061552

Essafi, A., Fernandez de Mattos, S., Hassen, Y. A., Soeiro, I., Mufti, G. J., Thomas, N. S., . . . Lam, E. W. (2005). Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene, 24*(14), 2317-2329. doi:10.1038/sj.onc.1208421

Fadeel, B., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun, 266*(3), 699-717. doi:10.1006/bbrc.1999.1888

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature, 405*(6782), 85-90. doi:10.1038/35011084

Fadok, V. A., Savill, J. S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D. E., Campbell, P. A., & Henson, P. M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol, 149*(12), 4029-4035. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281199

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol, 148*(7), 2207-2216. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545126

Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., & Weissman, A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem, 275*(12), 8945-8951. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722742

Fanidi, A., Harrington, E. A., & Evan, G. I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature, 359*(6395), 554-556. doi:10.1038/359554a0

Fantuzzi, G., & Dinarello, C. A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol, 19*(1), 1-11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080100

Ferreira, J. V., Fofo, H., Bejarano, E., Bento, C. F., Ramalho, J. S., Girao, H., & Pereira, P. (2013). STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy, 9*(9), 1349-1366. doi:10.4161/auto.25190

Finley, D., Ciechanover, A., & Varshavsky, A. (2004). Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell, 116*(2 Suppl), S29-32, 22 p following S32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055578

Finnberg, N., Gruber, J. J., Fei, P., Rudolph, D., Bric, A., Kim, S. H., . . . El-Deiry, W. S. (2005). DR5 knockout mice are compromised in radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol, 25*(5), 2000-2013. doi:10.1128/MCB.25.5.2000-2013.2005

Fleischer, B., Schulze-Bergkamen, H., Schuchmann, M., Weber, A., Biesterfeld, S., Muller, M., . . . Galle, P. R. (2006). Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human

hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol, 28*(1), 25-32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327976

Fleming, P., Kvansakul, M., Voigt, V., Kile, B. T., Kluck, R. M., Huang, D. C., . . . Andoniou, C. E. (2013). MCMV-mediated inhibition of the pro-apoptotic Bak protein is required for optimal in vivo replication. *PLoS Pathog, 9*(2), e1003192. doi:10.1371/journal.ppat.1003192

Fletcher, J. I., Meusburger, S., Hawkins, C. J., Riglar, D. T., Lee, E. F., Fairlie, W. D., . . . Adams, J. M. (2008). Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(47), 18081-18087. doi:10.1073/pnas.0808691105

Follis, A. V., Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Yun, M. K., Grace, C. R., Nourse, A., . . . Kriwacki, R. W. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat Chem Biol, 9*(3), 163-168. doi:10.1038/nchembio.1166

Fraile, J. M., Quesada, V., Rodriguez, D., Freije, J. M., & Lopez-Otin, C. (2012). Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene, 31*(19), 2373-2388. doi:10.1038/onc.2011.443

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., . . . Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell, 1*(4), 515-525. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703942

Frescas, D., & Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer, 8*(6), 438-449. doi:10.1038/nrc2396

Fricker, M., O'Prey, J., Tolkovsky, A. M., & Ryan, K. M. (2010). Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis, 1*, e59. doi:10.1038/cddis.2010.38

Fry, A. M., & Yamano, H. (2008). Under arrest in mitosis: Cdc20 dies twice. *Nat Cell Biol, 10*(12), 1385-1387. doi:10.1038/ncb1208-1385

Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell, 147*(4), 742-758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., & Yeh, E. T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem, 275*(50), 39458-39465. doi:10.1074/jbc.M006626200

Futami, T., Miyagishi, M., & Taira, K. (2005). Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *J Biol Chem, 280*(1), 826-831. doi:10.1074/jbc.M409948200

Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noel, B., Hickman, J. A., . . . Juin, P. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol, 185*(2), 279-290. doi:10.1083/jcb.200809153

Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ, 14*(7), 1237-1243. doi:10.1038/sj.cdd.4402148

Gangappa, S., van Dyk, L. F., Jewett, T. J., Speck, S. H., & Virgin, H. W. t. (2002). Identification of the in vivo role of a viral bcl-2. *J Exp Med, 195*(7), 931-940. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927636

Gao, M., & Karin, M. (2005). Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell, 19*(5), 581-593. doi:10.1016/j.molcel.2005.08.017

Garcia-Saez, A. J., Chiantia, S., Salgado, J., & Schwille, P. (2007). Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. *Biophys J, 93*(1), 103-112. doi:10.1529/biophysj.106.100370

Garcia-Saez, A. J., Ries, J., Orzaez, M., Perez-Paya, E., & Schwille, P. (2009). Membrane promotes tBID interaction with BCL(XL). *Nat Struct Mol Biol, 16*(11), 1178-1185. doi:10.1038/nsmb.1671

Garrison, S. P., Jeffers, J. R., Yang, C., Nilsson, J. A., Hall, M. A., Rehg, J. E., . . . Zambetti, G. P. (2008). Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol Cell Biol, 28*(17), 5391-5402. doi:10.1128/MCB.00907-07

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., . . . Walensky, L. D. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature, 455*(7216), 1076-1081. doi:10.1038/nature07396

Ghosh, A. P., Klocke, B. J., Ballestas, M. E., & Roth, K. A. (2012). CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PLoS One, 7*(6), e39586. doi:10.1371/journal.pone.0039586

Gibson, L., Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., . . . Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene, 13*(4), 665-675. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8761287

Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc, 26*(1), 59-86. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24540363

Gomez-Bougie, P., Menoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., & Amiot, M. (2011). Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochem Biophys Res Commun, 413*(3), 460-464. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.118

Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., . . . Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol, 143*(1), 207-215. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763432

Green, John, C., nbsp, & Reed, D. R. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science, 281*(5381), 1309-1312. doi:10.1126/science.281.5381.1309

Green, D. R., & Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell, 1*(1), 19-30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086884

Gregory, C. (2009). Cell biology: Sent by the scent of death. *Nature, 461*(7261), 181-182. doi:10.1038/461181a

Griffiths, G. J., Corfe, B. M., Savory, P., Leech, S., Esposti, M. D., Hickman, J. A., & Dive, C. (2001). Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene, 20*(52), 7668-7676. doi:10.1038/sj.onc.1204995

Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., . . . Hickman, J. A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol, 144*(5), 903-914. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085290

Grivel, J. C., Malkevitch, N., & Margolis, L. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis in CD4(+) but not in CD8(+) T cells in ex vivo-infected human

lymphoid tissue. *J Virol, 74*(17), 8077-8084. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933717

Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., & Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J, 17*(14), 3878-3885. doi:10.1093/emboj/17.14.3878

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 5*(2). doi:10.1101/cshperspect.a008722

Harhaj, E. W., & Dixit, V. M. (2011). Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res, 21*(1), 22-39. doi:10.1038/cr.2010.166

Harhaj, E. W., & Dixit, V. M. (2012). Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol Rev, 246*(1), 107-124. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01100.x

Harley, M. E., Allan, L. A., Sanderson, H. S., & Clarke, P. R. (2010). Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J, 29*(14), 2407-2420. doi:10.1038/emboj.2010.112

Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., & Thomson, J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans. *Science, 220*(4603), 1277-1279. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6857247

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., . . . Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem, 277*(1), 432-438. doi:10.1074/jbc.M109721200

Hemann, M. T., Zilfou, J. T., Zhao, Z., Burgess, D. J., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2004). Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(25), 9333-9338. doi:10.1073/pnas.0403286101

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature, 407*(6805), 770-776. doi:10.1038/35037710

Hengartner, M. O., & Horvitz, H. R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell, 76*(4), 665-676. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907274

Hengstermann, A., Linares, L. K., Ciechanover, A., Whitaker, N. J., & Scheffner, M. (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 98*(3), 1218-1223. doi:10.1073/pnas.031470698

Henry, R. E., Andrysik, Z., Paris, R., Galbraith, M. D., & Espinosa, J. M. (2012). A DR4:tBID axis drives the p53 apoptotic response by promoting oligomerization of poised BAX. *EMBO J, 31*(5), 1266-1278. doi:10.1038/emboj.2011.498

Henson, E. S., Hu, X., & Gibson, S. B. (2006). Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. *Clin Cancer Res, 12*(3 Pt 1), 845-853. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0754

Henson, P. M., & Hume, D. A. (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol, 27*(5), 244-250. doi:10.1016/j.it.2006.03.005

Herrant, M., Jacquel, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., & Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene, 23*(47), 7863-7873. doi:10.1038/sj.onc.1208069

Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem, 67*, 425-479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., & Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A, 77*(4), 1783-1786. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6990414

Hershko, A., Ciechanover, A., & Rose, I. A. (1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A, 76*(7), 3107-3110. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/290989

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., & Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem, 258*(13), 8206-8214. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6305978

Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol, 19*, 141-172. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617

Hickey, M. A., & Chesselet, M.-F. (2003). Apoptosis in Huntington's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 27*(2), 255-265. doi:10.1016/s0278-5846(03)00021-6

Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J., & Marrack, P. (2002). Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity, 16*(6), 759-767. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121658

Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C., & Day, C. L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ, 14*(1), 128-136. doi:10.1038/sj.cdd.4401934

Hirsch, E. C., Hunot, S., Faucheux, B., Agid, Y., Mizuno, Y., Mochizuki, H., . . . Olanow, W. C. (1999). Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord, 14*(2), 383-385. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091646

Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R. L., Brouwer, J., O'Hely, M., Evangelista, M., . . . Kluck, R. M. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis, 6*, e1735. doi:10.1038/cddis.2015.105

Hofmann, R. M., & Pickart, C. M. (2001). In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J Biol Chem, 276*(30), 27936-27943. doi:10.1074/jbc.M103378200

Hollville, E., Carroll, R. G., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2014). Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy. *Mol Cell, 55*(3), 451-466. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.001

Honda, R., & Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J, 18*(1), 22-27. doi:10.1093/emboj/18.1.22

Horvitz, H. R., & Sternberg, P. W. (1982). Nematode postembryonic cell lineages. *J Nematol, 14*(2), 240-248. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295705

Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., . . . Imahori, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau

protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(7), 2719-2723. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610107

Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., & Hsueh, A. J. (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 U S A, 94*(23), 12401-12406. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356461

Hsu, Y. T., & Youle, R. J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem, 273*(17), 10777-10783. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553144

Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J. W., . . . Shi, Y. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell, 111*(7), 1041-1054. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507430

Huang, D. C., Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J, 17*(4), 1029-1039. doi:10.1093/emboj/17.4.1029

Huang, D. C., & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell, 103*(6), 839-842. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136969

Huang, H. M., Huang, C. J., & Yen, J. J. (2000). Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood, 96*(5), 1764-1771. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961875

Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P. M., Huibregtse, J. M., & Pavletich, N. P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science, 286*(5443), 1321-1326. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10558980

Huang, Q., Petros, A. M., Virgin, H. W., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(6), 3428-3433. doi:10.1073/pnas.062525799

Huang, Q., Petros, A. M., Virgin, H. W., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2003). Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2. *J Mol Biol, 332*(5), 1123-1130. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499614

Hubbi, M. E., Hu, H., Kshitiz, Ahmed, I., Levchenko, A., & Semenza, G. L. (2013). Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) for lysosomal degradation. *J Biol Chem, 288*(15), 10703-10714. doi:10.1074/jbc.M112.414771

Huibregtse, J. M., & Beaudenon, S. L. (1996). Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol, 7*(6), 317-326. doi:10.1006/scbi.1996.0041

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A, 92*(11), 5249. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761480

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human

papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol, 13*(2), 775-784. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380895

Husnjak, K., & Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem, 81*, 291-322. doi:10.1146/annurev-biochem-051810-094654

Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R. S., . . . Wei, W. (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature, 471*(7336), 104-109. doi:10.1038/nature09732

Irniger, S. (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett, 532*(1-2), 7-11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459453

Izzi, L., & Attisano, L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene, 23*(11), 2071-2078. doi:10.1038/sj.onc.1207412

Jabbour, A. M., Heraud, J. E., Daunt, C. P., Kaufmann, T., Sandow, J., O'Reilly, L. A., . . . Ekert, P. G. (2009). Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ, 16*(4), 555-563. doi:10.1038/cdd.2008.179

Jabbour, A. M., Puryer, M. A., Yu, J. Y., Lithgow, T., Riffkin, C. D., Ashley, D. M., . . . Hawkins, C. J. (2006). Human Bcl-2 cannot directly inhibit the Caenorhabditis elegans Apaf-1 homologue CED-4, but can interact with EGL-1. *J Cell Sci, 119*(Pt 12), 2572-2582. doi:10.1242/jcs.02985

Jamil, S., Mojtabavi, S., Hojabrpour, P., Cheah, S., & Duronio, V. (2008). An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol Biol Cell, 19*(8), 3212-3220. doi:10.1091/mbc.E07-11-1171

Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., & Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J, 387*(Pt 3), 659-667. doi:10.1042/BJ20041596

Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C. G., Valentin, M., & Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J Biol Chem, 283*(49), 34108-34120. doi:10.1074/jbc.M806294200

Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., . . . Zambetti, G. P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell, 4*(4), 321-328. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585359

Jin, J., Li, X., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2007). Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature, 447*(7148), 1135-1138. doi:10.1038/nature05902

Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C., . . . Kaufmann, T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature, 460*(7258), 1035-1039. doi:10.1038/nature08229

Jourdan, M., De Vos, J., Mechti, N., & Klein, B. (2000). Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ, 7*(12), 1244-1252. doi:10.1038/sj.cdd.4400758

Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., & Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol, 8*(18), 1001-1008. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740801

Jurak, I., Schumacher, U., Simic, H., Voigt, S., & Brune, W. (2008). Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J Virol, 82*(10), 4812-4822. doi:10.1128/JVI.02570-07

Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., & Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(9), 4997-5002. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560217

Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahashi, T., Noda, T., . . . Tsujimoto, Y. (1995). bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res, 55*(2), 354-359. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7812968

Kamal, A., Faazil, S., & Malik, M. S. (2014). Apoptosis-inducing agents: a patent review (2010 - 2013). *Expert Opin Ther Pat, 24*(3), 339-354. doi:10.1517/13543776.2014.877445

Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., . . . Farber, E. (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol, 21*(1), 165-170. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063564

Kaufmann, T., Strasser, A., & Jost, P. J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ, 19*(1), 42-50. doi:10.1038/cdd.2011.121

Kay, J. (1978). Intracellular protein degradation. *Biochem Soc Trans, 6*(4), 789-797. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/710720

Ke, F., Bouillet, P., Kaufmann, T., Strasser, A., Kerr, J., & Voss, A. K. (2013). Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis, 4*, e650. doi:10.1038/cddis.2013.176

Ke, F., Voss, A., Kerr, J. B., O'Reilly, L. A., Tai, L., Echeverry, N., . . . Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ, 19*(6), 915-925. doi:10.1038/cdd.2011.210

Kepp, O., Rajalingam, K., Kimmig, S., & Rudel, T. (2007). Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. *EMBO J, 26*(3), 825-834. doi:10.1038/sj.emboj.7601533

Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer, 73*(8), 2013-2026. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8156506

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer, 26*(4), 239-257. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027

Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., & Cheng, E. H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol, 8*(12), 1348-1358. doi:10.1038/ncb1499

Kim, H., Tu, H. C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., . . . Cheng, E. H. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell, 36*(3), 487-499. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.030

Kim, H. C., & Huibregtse, J. M. (2009). Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol Cell Biol, 29*(12), 3307-3318. doi:10.1128/MCB.00240-09

Kim, H. E., Du, F., Fang, M., & Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on

Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(49), 17545-17550. doi:10.1073/pnas.0507900102

Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol, 8*(11), 931-937. doi:10.1038/nrm2245

Kluck, R. M. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science, 275*(5303), 1132-1136. doi:10.1126/science.275.5303.1132

Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., & Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A, 90*(8), 3516-3520. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682708

Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., & Reed, J. C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol, 146*(6), 1309-1319. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7778670

Kravtsova-Ivantsiv, Y., & Ciechanover, A. (2012). Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci, 125*(Pt 3), 539-548. doi:10.1242/jcs.093567

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., . . . Nomenclature Committee on Cell, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ, 16*(1), 3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150

Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer, 5*(11), 886-897. doi:10.1038/nrc1738

Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med, 6*(5), 513-519. doi:10.1038/74994

Kroemer, G., Zamzami, N., & Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today, 18*(1), 44-51. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018974

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem, 276*(23), 20633-20640. doi:10.1074/jbc.M101780200

Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods, 44*(3), 205-221. doi:10.1016/j.ymeth.2007.12.001

Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ, 6*(11), 1060-1066. doi:10.1038/sj.cdd.4400600

Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., & El-Deiry, W. S. (2011). The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle, 10*(14), 2380-2389. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709442

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell, 17*(4), 525-535. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.003

Kvansakul, M., van Delft, M. F., Lee, E. F., Gulbis, J. M., Fairlie, W. D., Huang, D. C., & Colman, P. M. (2007). A structural viral mimic of prosurvival Bcl-2: a pivotal role

for sequestering proapoptotic Bax and Bak. *Mol Cell, 25*(6), 933-942. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.004

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., . . . Colman, P. M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ, 15*(10), 1564-1571. doi:10.1038/cdd.2008.83

Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., & van der Bliek, A. M. (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell, 4*(5), 815-826. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619028

Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature, 411*(6839), 848-853. doi:10.1038/35081184

Lassot, I., Robbins, I., Kristiansen, M., Rahmeh, R., Jaudon, F., Magiera, M. M., . . . Desagher, S. (2010). Trim17, a novel E3 ubiquitin-ligase, initiates neuronal apoptosis. *Cell Death Differ, 17*(12), 1928-1941. doi:10.1038/cdd.2010.73

Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., & Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell, 14*(3), 277-287. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125832

Lavrik, I., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci, 118*(Pt 2), 265-267. doi:10.1242/jcs.01610

Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., & Earnshaw, W. C. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol, 123*(1), 7-22. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408207

Le Gouill, S., Podar, K., Harousseau, J. L., & Anderson, K. C. (2004). Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle, 3*(10), 1259-1262. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467463

Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene, 29*(38), 5221-5230. doi:10.1038/onc.2010.283

Lee, I., & Schindelin, H. (2008). Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell, 134*(2), 268-278. doi:10.1016/j.cell.2008.05.046

Leist, M., & Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol, 2*(8), 589-598. doi:10.1038/35085008

Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell, 2*(3), 183-192. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242151

Leu, C. M., Chang, C., & Hu, C. (2000). Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene, 19*(13), 1665-1675. doi:10.1038/sj.onc.1203452

Leuenroth, S. J., Grutkoski, P. S., Ayala, A., & Simms, H. H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol, 68*(1), 158-166. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914504

Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest, 115*(10), 2679-2688. doi:10.1172/JCI26390

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell, 94*(4), 491-501. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727492

Li, J., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem, 281*(11), 7260-7270. doi:10.1074/jbc.M509868200

Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature, 412*(6842), 95-99. doi:10.1038/35083620

Li, M. X., & Dewson, G. (2015). Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000Prime Rep, 7*, 42. doi:10.12703/P7-42

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell, 91*(4), 479-489. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557

Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., . . . Joazeiro, C. A. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One, 3*(1), e1487. doi:10.1371/journal.pone.0001487

Li, W. W., Li, J., & Bao, J. K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci, 69*(7), 1125-1136. doi:10.1007/s00018-011-0865-5

Liang, J., Saad, Y., Lei, T., Wang, J., Qi, D., Yang, Q., . . . Fu, M. (2010). MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med, 207*(13), 2959-2973. doi:10.1084/jem.20092641

Lim, K. H., & Baek, K. H. (2013). Deubiquitinating enzymes as therapeutic targets in cancer. *Curr Pharm Des, 19*(22), 4039-4052. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181570

Lin, E. Y., Orlofsky, A., Berger, M. S., & Prystowsky, M. B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol, 151*(4), 1979-1988. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345191

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., . . . 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*(6), 1389-1399. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163212

Linette, G. P., Li, Y., Roth, K., & Korsmeyer, S. J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(18), 9545-9552. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790367

Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., . . . Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature, 379*(6563), 349-353. doi:10.1038/379349a0

Liu, H. (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Pharmacology, 3*(3), 317-322. doi:10.1016/s1471-4892(03)00037-7

Liu, H., Peng, H. W., Cheng, Y. S., Yuan, H. S., & Yang-Yen, H. F. (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol, 25*(8), 3117-3126. doi:10.1128/MCB.25.8.3117-3126.2005

Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, Y. T., . . . Chen, Z. J. (2013). MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife, 2*, e00785. doi:10.7554/eLife.00785

Liu, X., Beugelsdijk, A., & Chen, J. (2015). Dynamics of the BH3-Only Protein Binding Interface of Bcl-xL. *Biophys J, 109*(5), 1049-1057. doi:10.1016/j.bpj.2015.07.043

Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., & Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(15), 8461-8466. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671700

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell, 89*(2), 175-184. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108473

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S. W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L. L., . . . Green, D. R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell, 44*(4), 517-531. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.001

Lopez, J., & Tait, S. W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer, 112*(6), 957-962. doi:10.1038/bjc.2015.85

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., & Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*(20), 11364-11369. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500182

Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D. W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell, 135*(6), 1074-1084. doi:10.1016/j.cell.2008.11.010

Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., . . . Freemont, P. S. (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A, 90*(6), 2112-2116. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7681583

Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature, 432*(7015), 307-315. doi:10.1038/nature03098

Luciano, F., Jacquel, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., & Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene, 22*(43), 6785-6793. doi:10.1038/sj.onc.1206792

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell, 94*(4), 481-490. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491

Luthi, A. U., & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ, 14*(4), 641-650. doi:10.1038/sj.cdd.4402103

Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., & Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol, 2*(10), 754-761. doi:10.1038/35036395

Macen, J. L., Graham, K. A., Lee, S. F., Schreiber, M., Boshkov, L. K., & McFadden, G. (1996). Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and

M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology, 218*(1), 232-237. doi:10.1006/viro.1996.0183

MacKenzie, S. H., & Clark, A. C. (2012). Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol, 747*, 55-73. doi:10.1007/978-1-4614-3229-6_4

Magiera, M. M., Mora, S., Mojsa, B., Robbins, I., Lassot, I., & Desagher, S. (2013). Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. *Cell Death Differ, 20*(2), 281-292. doi:10.1038/cdd.2012.124

Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol, 146*(1), 3-15. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856735

Makarova, K. S., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. *Trends Biochem Sci, 25*(2), 50-52. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664582

Malone, C. D., Hasan, S. M., Roome, R. B., Xiong, J., Furlong, M., Opferman, J. T., & Vanderluit, J. L. (2012). Mcl-1 regulates the survival of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci, 49*(4), 439-447. doi:10.1016/j.mcn.2012.02.003

Maltzman, W., & Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol, 4*(9), 1689-1694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092932

Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P. P., Polo, S., Hodsdon, M. E., & De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(36), 12700-12705. doi:10.1073/pnas.0506344102

Markson, G., Kiel, C., Hyde, R., Brown, S., Charalabous, P., Bremm, A., . . . Sanderson, C. M. (2009). Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Res, 19*(10), 1905-1911. doi:10.1101/gr.093963.109

Martelli, A. M., Zweyer, M., Ochs, R. L., Tazzari, P. L., Tabellini, G., Narducci, P., & Bortul, R. (2001). Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem, 82*(4), 634-646. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500941

Martinou, J. C., Desagher, S., & Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol, 2*(3), E41-43. doi:10.1038/35004069

Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell, 21*(1), 92-101. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.017

Marvel, J., Perkins, G. R., Lopez Rivas, A., & Collins, M. K. (1994). Growth factor starvation of bcl-2 overexpressing murine bone marrow cells induced refractoriness to IL-3 stimulation of proliferation. *Oncogene, 9*(4), 1117-1122. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8134114

Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W., & Tsuruo, T. (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene, 14*(9), 1007-1012. doi:10.1038/sj.onc.1200919

Mazel, S., Burtrum, D., & Petrie, H. T. (1996). Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med, 183*(5), 2219-2226. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642331

McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S., & Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA

damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol, 136*(1), 215-227. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008715

McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., & Korsmeyer, S. J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell, 57*(1), 79-88. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649247

Mei, Y., Du, W., Yang, Y., & Wu, M. (2005). Puma(*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene, 24*(48), 7224-7237. doi:10.1038/sj.onc.1208873

Melino, G. (2001). The Sirens' song. *Nature, 412*(6842), 23. doi:10.1038/35083653

Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., . . . Vousden, K. H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem, 279*(9), 8076-8083. doi:10.1074/jbc.M307469200

Merino, D., Giam, M., Hughes, P. D., Siggs, O. M., Heger, K., O'Reilly, L. A., . . . Bouillet, P. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol, 186*(3), 355-362. doi:10.1083/jcb.200905153

Michalak, E. M., Jansen, E. S., Happo, L., Cragg, M. S., Tai, L., Smyth, G. K., . . . Scott, C. L. (2009). Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ, 16*(5), 684-696. doi:10.1038/cdd.2008.195

Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell, 114*(2), 181-190. doi:10.1016/s0092-8674(03)00521-x

Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L., & Andres, C. R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol, 68*(6), 616-628. doi:10.1007/s00239-009-9225-6

Michels, J., Johnson, P. W., & Packham, G. (2005). Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol, 37*(2), 267-271. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.007

Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2014). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy, 7*(7), 673-682. doi:10.4161/auto.7.7.14733

Millman, S. E., & Pagano, M. (2011). MCL1 meets its end during mitotic arrest. *EMBO Rep, 12*(5), 384-385. doi:10.1038/embor.2011.62

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. A., & Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell, 75*(4), 653-660. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242741

Mojsa, B., Lassot, I., & Desagher, S. (2014). Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells, 3*(2), 418-437. doi:10.3390/cells3020418

Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., & Gehring, K. (2006). The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell, 24*(5), 677-688. doi:10.1016/j.molcel.2006.10.014

Monks, J., Smith-Steinhart, C., Kruk, E. R., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2008). Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biol Reprod, 78*(4), 586-594. doi:10.1095/biolreprod.107.065045

Morel, J. B., & Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ, 4*(8), 671-683. doi:10.1038/sj.cdd.4400309

Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., & Yasuda, H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem, 137*(2), 125-132. doi:10.1093/jb/mvi029

Morkin, E., Kimata, S., & Skillman, J. J. (1972). Myosin synthesis and degradation during development of cardiac hypertrophy in the rabbit. *Circ Res, 30*(6), 690-702. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4260249

Mouchantaf, R., Azakir, B. A., McPherson, P. S., Millard, S. M., Wood, S. A., & Angers, A. (2006). The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem, 281*(50), 38738-38747. doi:10.1074/jbc.M605959200

Mouhamad, S., Besnault, L., Auffredou, M. T., Leprince, C., Bourgeade, M. F., Leca, G., & Vazquez, A. (2004). B cell receptor-mediated apoptosis of human lymphocytes is associated with a new regulatory pathway of Bim isoform expression. *J Immunol, 172*(4), 2084-2091. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764673

Moulding, D. A., Giles, R. V., Spiller, D. G., White, M. R., Tidd, D. M., & Edwards, S. W. (2000). Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood, 96*(5), 1756-1763. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961874

Moustafa-Kamal, M., Gamache, I., Lu, Y., Li, S., & Teodoro, J. G. (2013). BimEL is phosphorylated at mitosis by Aurora A and targeted for degradation by betaTrCP1. *Cell Death Differ, 20*(10), 1393-1403. doi:10.1038/cdd.2013.93

Muro-Cacho, C. A., Pantaleo, G., & Fauci, A. S. (1995). Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol, 154*(10), 5555-5566. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730654

Murtaza, M., Jolly, L. A., Gecz, J., & Wood, S. A. (2015). La FAM fatale: USP9X in development and disease. *Cell Mol Life Sci, 72*(11), 2075-2089. doi:10.1007/s00018-015-1851-0

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res, 256*(1), 12-18. doi:10.1006/excr.2000.4834

Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell, 140*(5), 619-630. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014

Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell, 7*(3), 683-694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392

Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., & Loh, D. Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A, 91*(9), 3700-3704. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170972

Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M. C., . . . et al. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science, 261*(5128), 1584-1588. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8372353

Napolitano, L. M., & Meroni, G. (2012). TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life, 64*(1), 64-71. doi:10.1002/iub.580

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol, 183*(5), 795-803. doi:10.1083/jcb.200809125

Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H., & Youle, R. J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol, 153*(6), 1265-1276. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402069

Newmeyer, D. D., Farschon, D. M., & Reed, J. C. (1994). Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell, 79*(2), 353-364. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954801

Nicastro, G., Menon, R. P., Masino, L., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., & Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(30), 10493-10498. doi:10.1073/pnas.0501732102

Nicholls, P. (1974). Cytochrome c binding to enzymes and membranes. *Biochim Biophys Acta, 346*(3-4), 261-310. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4374236

Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci, 22*(8), 299-306. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9270303

Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., & Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev, 17*(12), 1475-1486. doi:10.1101/gad.1093903

Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., & Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell, 123*(5), 773-786. doi:10.1016/j.cell.2005.11.007

Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2011). INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death Differ, 18*(3), 439-451. doi:10.1038/cdd.2010.114

Nogueira, T. C., Paula, F. M., Villate, O., Colli, M. L., Moura, R. F., Cunha, D. A., . . . Eizirik, D. L. (2013). GLIS3, a susceptibility gene for type 1 and type 2 diabetes, modulates pancreatic beta cell apoptosis via regulation of a splice variant of the BH3-only protein Bim. *PLoS Genet, 9*(5), e1003532. doi:10.1371/journal.pgen.1003532

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., & Huang, D. C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J, 17*(2), 384-395. doi:10.1093/emboj/17.2.384

O'Reilly, L. A., Harris, A. W., & Strasser, A. (1997). bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8- T cell progenitors. *Int Immunol, 9*(9), 1291-1301. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310832

Obulesu, M., & Lakshmi, M. J. (2014). Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res, 39*(12), 2301-2312. doi:10.1007/s11064-014-1454-4

Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science, 288*(5468), 1053-1058. doi:10.1126/science.288.5468.1053

Ogunjimi, A. A., Briant, D. J., Pece-Barbara, N., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Kavsak, P., . . . Wrana, J. L. (2005). Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring

the E2 to the HECT domain. *Mol Cell, 19*(3), 297-308. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.028

Okada, H., & Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer, 4*(8), 592-603. doi:10.1038/nrc1412

Okamoto, T., Campbell, S., Mehta, N., Thibault, J., Colman, P. M., Barry, M., . . . Kvansakul, M. (2012). Sheeppox virus SPPV14 encodes a Bcl-2-like cell death inhibitor that counters a distinct set of mammalian proapoptotic proteins. *J Virol, 86*(21), 11501-11511. doi:10.1128/JVI.01115-12

Olsen, S. K., & Lima, C. D. (2013). Structure of a ubiquitin E1-E2 complex: insights to E1-E2 thioester transfer. *Mol Cell, 49*(5), 884-896. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.013

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell, 74*(4), 609-619. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358790

Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., & Korsmeyer, S. J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature, 426*(6967), 671-676. doi:10.1038/nature02067

Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J., & Dixit, V. M. (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem, 271*(28), 16443-16446. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663580

Ozkan, E., Yu, H., & Deisenhofer, J. (2005). Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(52), 18890-18895. doi:10.1073/pnas.0509418102

Pantaleon, M., Kanai-Azuma, M., Mattick, J. S., Kaibuchi, K., Kaye, P. L., & Wood, S. A. (2001). FAM deubiquitylating enzyme is essential for preimplantation mouse embryo development. *Mech Dev, 109*(2), 151-160. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731229

Park, C., Suh, Y., & Cuervo, A. M. (2015). Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun, 6*, 6823. doi:10.1038/ncomms7823

Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L., & Wu, H. (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature, 398*(6727), 533-538. doi:10.1038/19110

Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., . . . 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*(5), 725-731. doi:10.1083/jcb.200107057

Perciavalle, R. M., & Opferman, J. T. (2013). Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol, 23*(1), 22-29. doi:10.1016/j.tcb.2012.08.011

Perciavalle, R. M., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., . . . Opferman, J. T. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol, 14*(6), 575-583. doi:10.1038/ncb2488

Petit, P. X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., & Gougeon, M. L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol, 130*(1), 157-167. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790370

Philchenkov, A. (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med, 8*(4), 432-444. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601572

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem, 70*, 503-533. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503

Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta, 1695*(1-3), 55-72. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019

Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., & Murphy, M. E. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene, 27*(50), 6507-6521. doi:10.1038/onc.2008.315

Pilder, S., Logan, J., & Shenk, T. (1984). Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J Virol, 52*(2), 664-671. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6492257

Pontier, D., Balague, C., & Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci III, 321*(9), 721-734. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809204

Puck, J. M., & Sneller, M. C. (1997). ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol, 9*(1), 77-84. doi:10.1006/smim.1996.0056

Puthalakath, H., & Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ, 9*(5), 505-512. doi:10.1038/sj/cdd/4400998

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., . . . Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science, 293*(5536), 1829-1832. doi:10.1126/science.1062257

Quesada, V., Diaz-Perales, A., Gutierrez-Fernandez, A., Garabaya, C., Cal, S., & Lopez-Otin, C. (2004). Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun, 314*(1), 54-62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715245

Ranger, A. M., Malynn, B. A., & Korsmeyer, S. J. (2001). Mouse models of cell death. *Nat Genet, 28*(2), 113-118. doi:10.1038/88815

Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., Cinalli, R. M., & Thompson, C. B. (2002). Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol, 3*(10), 932-939. doi:10.1038/ni834

Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med, 207*(9), 1807-1817. doi:10.1084/jem.20101157

Ravid, T., & Hochstrasser, M. (2007). Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol, 9*(4), 422-427. doi:10.1038/ncb1558

Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., . . . Cheng, E. H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science, 330*(6009), 1390-1393. doi:10.1126/science.1190217

Ren, H., Koo, J., Guan, B., Yue, P., Deng, X., Chen, M., . . . Sun, S. Y. (2013). The E3 ubiquitin ligases beta-TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1

degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. *Mol Cancer, 12*, 146. doi:10.1186/1476-4598-12-146

Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., & Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem, 78*, 363-397. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526

Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol, 8*(5), 405-413. doi:10.1038/nrm2153

Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol, 5*(11), 897-907. doi:10.1038/nrm1496

Rinkenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., & Korsmeyer, S. J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev, 14*(1), 23-27. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640272

Roninson, I. B., Broude, E. V., & Chang, B. D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat, 4*(5), 303-313. doi:10.1054/drup.2001.0213

Rosok, B. I., Brinchmann, J. E., Stent, G., Bjerknes, R., Voltersvik, P., Olofsson, J., & Asjo, B. (1998). Correlates of apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells in tonsillar tissue in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses, 14*(18), 1635-1643. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870316

Rotin, D., & Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10*(6), 398-409. doi:10.1038/nrm2690

Rotolo, J. A., Maj, J. G., Feldman, R., Ren, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., . . . Fuks, Z. (2008). Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys, 70*(3), 804-815. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.11.043

Ruf, I. K., Rhyne, P. W., Yang, H., Borza, C. M., Hutt-Fletcher, L. M., Cleveland, J. L., & Sample, J. T. (1999). Epstein-barr virus regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt lymphoma. *Mol Cell Biol, 19*(3), 1651-1660. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022853

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., & Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature, 401*(6749), 168-173. doi:10.1038/43678

Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature, 391*(6662), 96-99. doi:10.1038/34214

Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D., & Alnemri, E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol, 2*(8), 476-483. doi:10.1038/35019510

Sanchez, I., & Yuan, J. (2001). A convoluted way to die. *Neuron, 29*(3), 563-566. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301016

Sandow, J. J., Jabbour, A. M., Condina, M. R., Daunt, C. P., Stomski, F. C., Green, B. D., . . . Ekert, P. G. (2012). Cytokine receptor signaling activates an IKK-dependent phosphorylation of PUMA to prevent cell death. *Cell Death Differ, 19*(4), 633-641. doi:10.1038/cdd.2011.131

Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature, 496*(7445), 372-376. doi:10.1038/nature12043

Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., . . . Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature, 455*(7211), 358-362. doi:10.1038/nature07254

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., . . . Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science, 275*(5302), 983-986. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020082

Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature, 407*(6805), 784-788. doi:10.1038/35037722

Savill, J., Fadok, V., Henson, P., & Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today, 14*(3), 131-136. doi:10.1016/0167-5699(93)90215-7

Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., & Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest, 83*(3), 865-875. doi:10.1172/JCI113970

Sawa, A., Tomoda, T., & Bae, B. I. (2003). Mechanisms of neuronal cell death in Huntington’s disease. *Cytogenetic and Genome Research, 100*(1-4), 287-295. doi:10.1159/000072864

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., . . . Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J, 17*(6), 1675-1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675

Scarffe, L. A., Stevens, D. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci, 37*(6), 315-324. doi:10.1016/j.tins.2014.03.004

Scheffner, M., Nuber, U., & Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature, 373*(6509), 81-83. doi:10.1038/373081a0

Schile, A. J., Garcia-Fernandez, M., & Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev, 22*(16), 2256-2266. doi:10.1101/gad.1663108

Schlegel, R. A., Callahan, M., Krahling, S., Pradhan, D., & Williamson, P. (1996). Mechanisms for recognition and phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Adv Exp Med Biol, 406*, 21-28. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910668

Schwarz, M., Andrade-Navarro, M. A., & Gross, A. (2007). Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis, 12*(5), 869-876. doi:10.1007/s10495-007-0748-2

Schweichel, J. U., & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology, 7*(3), 253-266. doi:10.1002/tera.1420070306

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., . . . Dixit, V. M. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature, 463*(7277), 103-107. doi:10.1038/nature08646

Scorrano, L., & Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 304*(3), 437-444. doi:10.1016/s0006-291x(03)00615-6

Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C., & Brancolini, C. (1999). Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for

microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci, 112 (Pt 23)*, 4475-4482. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564664

Shamas-Din, A., Brahmbhatt, H., Leber, B., & Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta, 1813*(4), 508-520. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.11.024

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 5*(4), a008714. doi:10.1101/cshperspect.a008714

Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J., & George, D. L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J Biol Chem, 274*(53), 38189-38196. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608892

Shen, M., Schmitt, S., Buac, D., & Dou, Q. P. (2013). Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets, 17*(9), 1091-1108. doi:10.1517/14728222.2013.815728

Shenoy, A. R., Kirschnek, S., & Hacker, G. (2014). IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells. *Eur J Immunol, 44*(8), 2500-2507. doi:10.1002/eji.201344238

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell, 9*(3), 459-470. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931755

Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature, 399*(6735), 483-487. doi:10.1038/20959

Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., . . . 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*(3), 854-864. doi:10.1128/MCB.21.3.854-864.2001

Shpilka, T., & Elazar, Z. (2011). Shedding light on mammalian microautophagy. *Dev Cell, 20*(1), 1-2. doi:10.1016/j.devcel.2010.12.010

Siegel, R. M., Chan, F. K., Chun, H. J., & Lenardo, M. J. (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol, 1*(6), 469-474. doi:10.1038/82712

Simonen, M., Keller, H., & Heim, J. (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem, 249*(1), 85-91. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363757

Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., . . . Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol, 144*(2), 281-292. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922454

Sochalska, M., Tuzlak, S., Egle, A., & Villunger, A. (2015). Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: implications for targeted therapy. *FEBS J, 282*(5), 834-849. doi:10.1111/febs.13188

Song, L., Coppola, D., Livingston, S., Cress, D., & Haura, E. B. (2005). Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther, 4*(3), 267-276. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753661

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., & Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med, 188*(1), 211-216. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653098

Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., & Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem, 274*(13), 8359-8362. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085063

Stewart, D. P., Koss, B., Bathina, M., Perciavalle, R. M., Bisanz, K., & Opferman, J. T. (2010). Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol, 30*(12), 3099-3110. doi:10.1128/MCB.01266-09

Storer, A. C., & Menard, R. (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol, 244*, 486-500. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7845227

Strasser, A., Harris, A. W., & Cory, S. (1991). bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell, 67*(5), 889-899. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959134

Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., & Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J, 14*(24), 6136-6147. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557033

Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem, 69*, 217-245. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.217

Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D. L., Bath, M. L., Adams, J. M., Cory, S., & Harris, A. W. (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88*(19), 8661-8665. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1924327

Sulston, J. E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of Caenorhabditis elegans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 275*(938), 287-297. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804

Sun, Y. (2006). E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia, 8*(8), 645-654. doi:10.1593/neo.06376

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., . . . Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature, 397*(6718), 441-446. doi:10.1038/17135

Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell, 103*(4), 645-654. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106734

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell, 8*(3), 613-621. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583623

Tang, T. K., Chang, W. C., Chan, W. H., Yang, S. D., Ni, M. H., & Yu, J. S. (1998). Proteolytic cleavage and activation of PAK2 during UV irradiation-induced apoptosis in A431 cells. *J Cell Biochem, 70*(4), 442-454. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712143

Tata, J. R. (1966). Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol, 13*(1), 77-94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5923195

Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., & Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol, 53 Suppl 3*, S61-70; discussion S70-62. doi:10.1002/ana.10489

Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Tsuchiya, T., . . . Kaibuchi, K. (1998). The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol, 142*(4), 1053-1062. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722616

Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol, 9*(3), 231-241. doi:10.1038/nrm2312

Teles, A. V., Rosenstock, T. R., Okuno, C. S., Lopes, G. S., Bertoncini, C. R., & Smaili, S. S. (2008). Increase in bax expression and apoptosis are associated in Huntington's disease progression. *Neurosci Lett, 438*(1), 59-63. doi:10.1016/j.neulet.2008.03.062

Thallinger, C., Wolschek, M. F., Maierhofer, H., Skvara, H., Pehamberger, H., Monia, B. P., . . . Selzer, E. (2004). Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res, 10*(12 Pt 1), 4185-4191. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0774

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science, 267*(5203), 1456-1462. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878464

Thompson, S., Pearson, A. N., Ashley, M. D., Jessick, V., Murphy, B. M., Gafken, P., . . . Meller, R. (2011). Identification of a novel Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim) E3 ligase, tripartite motif-containing protein 2 (TRIM2), and its role in rapid ischemic tolerance-induced neuroprotection. *J Biol Chem, 286*(22), 19331-19339. doi:10.1074/jbc.M110.197707

Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science, 281*(5381), 1312-1316. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J, 19*(1), 94-102. doi:10.1093/emboj/19.1.94

Tolmach, L. J., & Marcus, P. I. (1960). Development of x-ray induced giant HeLa cells. *Exp Cell Res, 20*, 350-360. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13777254

Toporkiewicz, M., Grzybek, M., Meissner, J., Michalczyk, I., Dubielecka, P. M., Korycka, J., . . . Sikorski, A. F. (2013). Release of an ~55kDa fragment containing the actin-binding domain of beta-spectrin by caspase-8 during FND-induced apoptosis depends on the presence of protein 4.1. *Arch Biochem Biophys, 535*(2), 205-213. doi:10.1016/j.abb.2013.03.009

Toyama, B. H., & Hetzer, M. W. (2013). Protein homeostasis: live long, won't prosper. *Nat Rev Mol Cell Biol, 14*(1), 55-61. doi:10.1038/nrm3496

Trump, B. F., Berezesky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol, 25*(1), 82-88. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9061857

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science, 228*(4706), 1440-1443. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3874430

Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome

translocation. *Science, 226*(4678), 1097-1099. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6093263

Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science, 229*(4720), 1390-1393. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3929382

Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1985). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature, 315*(6017), 340-343. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923362

Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis, 12*(5), 835-840. doi:10.1007/s10495-006-0525-7

Tunquist, B. J., Woessner, R. D., & Walker, D. H. (2010). Mcl-1 stability determines mitotic cell fate of human multiple myeloma tumor cells treated with the kinesin spindle protein inhibitor ARRY-520. *Mol Cancer Ther, 9*(7), 2046-2056. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0033

Uhlmann, E. J., D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., Wagner, A. J., Hay, N., & Chinnadurai, G. (1996). Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res, 56*(11), 2506-2509. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8653686

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ, 15*(7), 1153-1162. doi:10.1038/cdd.2008.47

Van Cruchten, S., & Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol, 31*(4), 214-223. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196263

Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., & Fushman, D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem, 279*(8), 7055-7063. doi:10.1074/jbc.M309184200

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., . . . Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity, 9*(2), 267-276. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729047

Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature, 335*(6189), 440-442. doi:10.1038/335440a0

Vaux, D. L., & Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell, 96*(2), 245-254. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988219

Vaux, D. L., Weissman, I. L., & Kim, S. K. (1992). Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. *Science, 258*(5090), 1955-1957. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470921

Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell, 75*(2), 229-240. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402909

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., . . . Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell, 102*(1), 43-53. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929712

Verma, S., Zhao, L. J., & Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem, 276*(7), 4671-4676. doi:10.1074/jbc.M008983200

Versteeg, G. A., Rajsbaum, R., Sanchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Valdiviezo, J., Shi, M., . . . Garcia-Sastre, A. (2013). The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity, 38*(2), 384-398. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.013

Vick, B., Weber, A., Urbanik, T., Maass, T., Teufel, A., Krammer, P. H., . . . Schulze-Bergkamen, H. (2009). Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology, 49*(2), 627-636. doi:10.1002/hep.22664

Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., . . . Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science, 302*(5647), 1036-1038. doi:10.1126/science.1090072

Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol, 12*(7), 439-452. doi:10.1038/nrm3143

Walczak, H. (2011). TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev, 244*(1), 9-28. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01066.x

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., . . . et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. *Cell, 78*(2), 343-352. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044845

Wan, L., Tan, M., Yang, J., Inuzuka, H., Dai, X., Wu, T., . . . Wei, W. (2014). APC(Cdc20) suppresses apoptosis through targeting Bim for ubiquitination and destruction. *Dev Cell, 29*(4), 377-391. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.022

Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., & Baldwin, A. S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science, 281*(5383), 1680-1683. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733516

Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., . . . Reed, J. C. (1999). Ca2+-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science, 284*(5412), 339-343. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195903

Wang, K., Gross, A., Waksman, G., & Korsmeyer, S. J. (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol, 18*(10), 6083-6089. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742125

Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Development, 10*(22), 2859-2869. doi:10.1101/gad.10.22.2859

Wang, L., Ye, X., Liu, Y., Wei, W., & Wang, Z. (2014). Aberrant regulation of FBW7 in cancer. *Oncotarget, 5*(8), 2000-2015. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899581

Wang, S., Miura, M., Jung, Y. K., Zhu, H., Li, E., & Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell, 92*(4), 501-509. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491891

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev, 15*(22), 2922-2933. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711427

Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., . . . Opferman, J. T. (2013). Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes Dev, 27*(12), 1351-1364. doi:10.1101/gad.215855.113

Wang, Y. F., Jiang, C. C., Kiejda, K. A., Gillespie, S., Zhang, X. D., & Hersey, P. (2007). Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res, 13*(16), 4934-4942. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0665

Warr, M. R., Acoca, S., Liu, Z., Germain, M., Watson, M., Blanchette, M., . . . Shore, G. C. (2005). BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett, 579*(25), 5603-5608. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.028

Weerasinghe, P., & Buja, L. M. (2012). Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol, 93*(3), 302-308. doi:10.1016/j.yexmp.2012.09.018

Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., . . . Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev, 14*(16), 2060-2071. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950869

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., . . . Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science, 292*(5517), 727-730. doi:10.1126/science.1059108

Welcker, M., & Clurman, B. E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer, 8*(2), 83-93. doi:10.1038/nrc2290

Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., & Tang, H. (2005). Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem, 280*(11), 10491-10500. doi:10.1074/jbc.M412819200

Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I., & Borst, J. (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit is collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem, 277*(25), 22781-22788. doi:10.1074/jbc.M201469200

Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., . . . Dixit, V. M. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature, 471*(7336), 110-114. doi:10.1038/nature09779

Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., . . . Krammer, P. H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature, 375*(6531), 497-500. doi:10.1038/375497a0

Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol, 72*, 19-44. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163111

White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W. S., Kusher, D. I., & Gooding, L. R. (1992). The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell

death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol, 12*(6), 2570-2580. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317006

Whitfield, J., Neame, S. J., Paquet, L., Bernard, O., & Ham, J. (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron, 29*(3), 629-643. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301023

Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vogtle, F. N., Meisinger, C., Paschen, S. A., & Hacker, G. (2012). BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ, 19*(8), 1328-1336. doi:10.1038/cdd.2012.9

Wilkinson, K. D. (2004). Ubiquitin: a Nobel protein. *Cell, 119*(6), 741-745. doi:10.1016/j.cell.2004.12.001

Williams, S. T., Smith, A. N., Cianci, C. D., Morrow, J. S., & Brown, T. L. (2003). Identification of the primary caspase 3 cleavage site in alpha II-spectrin during apoptosis. *Apoptosis, 8*(4), 353-361. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815278

Willis, S. N., & Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol, 17*(6), 617-625. doi:10.1016/j.ceb.2005.10.001

Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., . . . Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev, 19*(11), 1294-1305. doi:10.1101/gad.1304105

Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., . . . Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science, 315*(5813), 856-859. doi:10.1126/science.1133289

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., . . . et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature, 370*(6487), 270-275. doi:10.1038/370270a0

Winn, P. J., Religa, T. L., Battey, J. N., Banerjee, A., & Wade, R. C. (2004). Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure, 12*(9), 1563-1574. doi:10.1016/j.str.2004.06.017

Wolf, B. B., & Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem, 274*(29), 20049-20052. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400609

Worth, A., Thrasher, A. J., & Gaspar, H. B. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol, 133*(2), 124-140. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.05993.x

Wu, W. S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., Adams, J. M., & Look, A. T. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell, 123*(4), 641-653. doi:10.1016/j.cell.2005.09.029

Wuilleme-Toumi, S., Trichet, V., Gomez-Bougie, P., Gratas, C., Bataille, R., & Amiot, M. (2007). Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun, 361*(4), 865-869. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.070

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature, 284*(5756), 555-556. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6245367

Xiang, J., Chao, D. T., & Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(25), 14559-14563. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8962091

Xu, H., Tai, J., Ye, H., Kang, C. B., & Yoon, H. S. (2006). The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-Xl. *Biochem Biophys Res Commun, 341*(4), 938-944. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.227

Xue, D., & Horvitz, H. R. (1995). Inhibition of the Caenorhabditis elegans cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature, 377*(6546), 248-251. doi:10.1038/377248a0

Yamaguchi, H., & 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*(44), 41604-41612. doi:10.1074/jbc.M207516200

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell, 80*(2), 285-291. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834748

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., . . . Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science, 275*(5303), 1129-1132. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027314

Yang, T., Buchan, H. L., Townsend, K. J., & Craig, R. W. (1996). MCL-1, a member of the BLC-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J Cell Physiol, 166*(3), 523-536. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<523::AID-JCP7>3.0.CO;2-R

Yang, T., Kozopas, K. M., & Craig, R. W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol, 128*(6), 1173-1184. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896880

Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., . . . Weissman, A. M. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res, 67*(19), 9472-9481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0568

Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10*(11), 755-764. doi:10.1038/nrm2780

Ye, Y., Scheel, H., Hofmann, K., & Komander, D. (2009). Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. *Mol Biosyst, 5*(12), 1797-1808. doi:10.1039/b907669g

Yecies, D., Carlson, N. E., Deng, J., & Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood, 115*(16), 3304-3313. doi:10.1182/blood-2009-07-233304

Yee, K. S., & Vousden, K. H. (2008). Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis, 13*(1), 87-95. doi:10.1007/s10495-007-0140-2

Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., . . . Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature, 400*(6747), 886-891. doi:10.1038/23730

Yonehara, S., Ishii, A., & Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med, 169*(5), 1747-1756. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469768

You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., . . . Mak, T. W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med, 203*(7), 1657-1663. doi:10.1084/jem.20060353

You, M., Ku, P. T., Hrdlickova, R., & Bose, H. R., Jr. (1997). ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol, 17*(12), 7328-7341. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372964

Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol, 9*(1), 47-59. doi:10.1038/nrm2308

Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene, 27 Suppl 1*, S71-83. doi:10.1038/onc.2009.45

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell, 7*(3), 673-682. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463391

Yuan, J., & Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev, 24*(23), 2592-2602. doi:10.1101/gad.1984410

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell, 75*(4), 641-652. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242740

Zack, T. I., Schumacher, S. E., Carter, S. L., Cherniack, A. D., Saksena, G., Tabak, B., . . . Beroukhim, R. (2013). Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet, 45*(10), 1134-1140. doi:10.1038/ng.2760

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., . . . Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med, 182*(2), 367-377. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7629499

Zha, J. (2000). Posttranslational N-Myristoylation of BID as a Molecular Switch for Targeting Mitochondria and Apoptosis. *Science, 290*(5497), 1761-1765. doi:10.1126/science.290.5497.1761

Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G., & Korsmeyer, S. J. (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem, 272*(39), 24101-24104. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305851

Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C., & Reed, J. C. (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem, 283*(15), 9580-9586. doi:10.1074/jbc.M708426200

Zhang, C., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Han, L., You, Y., . . . Kang, C. (2010). PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol, 37*(6), 1621-1626. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042732

Zhang, C. Z., Zhang, J. X., Zhang, A. L., Shi, Z. D., Han, L., Jia, Z. F., . . . Kang, C. S. (2010). MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer, 9*, 229. doi:10.1186/1476-4598-9-229

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., & Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell, 121*(7), 1085-1095. doi:10.1016/j.cell.2005.06.009

Zhou, L., Cai, X., Han, X., Xu, N., & Chang, D. C. (2014). CDK1 switches mitotic arrest to apoptosis by phosphorylating Bcl-2/Bax family proteins during treatment with microtubule interfering agents. *Cell Biol Int, 38*(6), 737-746. doi:10.1002/cbin.10259

Zhu, H., Cao, X., Ali-Osman, F., Keir, S., & Lo, H. W. (2010). EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocalization of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett, 294*(1), 101-110. doi:10.1016/j.canlet.2010.01.028

Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci, 19*, 124-128. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143207

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., & Thompson, C. B. (2001). 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), 1481-1486. doi:10.1101/gad.897601

Zong, W. X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev, 20*(1), 1-15. doi:10.1101/gad.1376506

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell, 90*(3), 405-413. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267021

DISCUSSION

Abastado, J. P. (2015). O4.5 * Cancer cells are addicted to inhibitors of apoptosis. *Annals of Oncology, 26*(suppl 2), ii6-ii6. doi:10.1093/annonc/mdv082.5

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., & 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 Pt 2*, 271-278. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620504

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., & 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*(15), 11615-11623. doi:10.1074/jbc.M010810200

Azad, A., & Storey, A. (2014). Chk1 activity is required for BAK multimerization in association with PUMA during mitochondrial apoptosis. *Cell Commun Signal, 12*, 42. doi:10.1186/s12964-014-0042-1

Bernstein, A. I., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., & O'Malley, K. L. (2011). 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA-dependent cell death. *Mol Neurodegener, 6*(1), 2. doi:10.1186/1750-1326-6-2

Besnault, L., Schrantz, N., Auffredou, M. T., Leca, G., Bourgeade, M. F., & Vazquez, A. (2001). B cell receptor cross-linking triggers a caspase-8-dependent apoptotic pathway that is independent of the death effector domain of Fas-associated death domain protein. *J Immunol, 167*(2), 733-740. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441077

Bhattacharya, S., Ray, R. M., & Johnson, L. R. (2005). STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J, 392*(Pt 2), 335-344. doi:10.1042/BJ20050465

Billen, L. P., Shamas-Din, A., & Andrews, D. W. (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene, 27 Suppl 1*, S93-104. doi:10.1038/onc.2009.47

Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., . . . Fornace, A. J., Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature, 411*(6833), 102-107. doi:10.1038/35075107

Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., & Fornace, A. J., Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J, 18*(23), 6845-6854. doi:10.1093/emboj/18.23.6845

Bunin, A., Khwaja, F. W., & Kersh, G. J. (2005). Regulation of Bim by TCR signals in CD4/CD8 double-positive thymocytes. *J Immunol, 175*(3), 1532-1539. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034091

Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., & Lo, H. W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocalization: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol Cancer, 10*, 26. doi:10.1186/1476-4598-10-26

Carpenter, R. L., Han, W., Paw, I., & Lo, H. W. (2013). HER2 phosphorylates and destabilizes pro-apoptotic PUMA, leading to antagonized apoptosis in cancer cells. *PLoS One, 8*(11), e78836. doi:10.1371/journal.pone.0078836

Cartron, P. F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., . . . Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation

by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell, 16*(5), 807-818. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.028

Chen, F., Wang, W., & El-Deiry, W. S. (2010). Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol, 80*(5), 724-730. doi:10.1016/j.bcp.2010.04.031

Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., . . . Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell, 17*(3), 393-403. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030

Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science, 309*(5741), 1732-1735. doi:10.1126/science.1114297

Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2004). Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle, 3*(4), 429-431. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020844

Chuensumran, U., Saelee, P., Punyarit, P., Wongkham, S., Pairojkul, C., Chauin, S., & Petmitr, S. (2011). Ubiquitin-specific protease 14 expression associated with intrahepatic cholangiocarcinoma cell differentiation. *Asian Pac J Cancer Prev, 12*(3), 775-779. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21627382

Clybouw, C., Fischer, S., Auffredou, M. T., Hugues, P., Alexia, C., Bouillet, P., . . . Vazquez, A. (2011). Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma. *Blood, 118*(15), 4120-4128. doi:10.1182/blood-2011-04-347096

Clybouw, C., Hadji, A., ElMchichi, B., Auffredou, M. T., Leca, G., & Vazquez, A. (2009). BimL upregulation induced by BCR cross-linking in BL41 Burkitt's lymphoma results from a splicing mechanism of the BimEL mRNA. *Biochem Biophys Res Commun, 383*(1), 32-36. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.123

Clybouw, C., McHichi, B. E., Hadji, A., Portier, A., Auffredou, M. T., Arnoult, D., . . . Vazquez, A. (2008). TGFbeta-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma BL41 cells is associated with the relocation of mitochondrial BimEL. *Oncogene, 27*(24), 3446-3456. doi:10.1038/sj.onc.1211009

D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M. H., Fryknas, M., Lindsten, K., De Cesare, M., . . . Linder, S. (2011). Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med, 17*(12), 1636-1640. doi:10.1038/nm.2536

Dai, H., Ding, H., Meng, X. W., Lee, S. H., Schneider, P. A., & Kaufmann, S. H. (2013). Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res, 73*(23), 6998-7008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0940

Dai, H., Smith, A., Meng, X. W., Schneider, P. A., Pang, Y. P., & Kaufmann, S. H. (2011). Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J Cell Biol, 194*(1), 39-48. doi:10.1083/jcb.201102027

Danial, N. N. (2008). BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene, 27 Suppl 1*, S53-70. doi:10.1038/onc.2009.44

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell, 116*(2), 205-219. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432

Di Martino, M. T., Gulla, A., Cantafio, M. E., Lionetti, M., Leone, E., Amodio, N., . . . Tassone, P. (2013). In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma. *Oncotarget, 4*(2), 242-255. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479461

El Mchichi, B., Hadji, A., Vazquez, A., & Leca, G. (2007). p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death Differ, 14*(10), 1826-1836. doi:10.1038/sj.cdd.4402187

Feng, X., Holmlund, T., Zheng, C., & Fadeel, B. (2014). Proapoptotic effects of the novel proteasome inhibitor b-AP15 on multiple myeloma cells and natural killer cells. *Exp Hematol, 42*(3), 172-182. doi:10.1016/j.exphem.2013.11.010

Follis, A. V., Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Yun, M. K., Grace, C. R., Nourse, A., . . . Kriwacki, R. W. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat Chem Biol, 9*(3), 163-168. doi:10.1038/nchembio.1166

Fricker, M., O'Prey, J., Tolkovsky, A. M., & Ryan, K. M. (2010). Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis, 1*, e59. doi:10.1038/cddis.2010.38

Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noel, B., Hickman, J. A., . . . Juin, P. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol, 185*(2), 279-290. doi:10.1083/jcb.200809153

Gawad, A., Ptak-Belowska, A., Brzozowski, T., & Pawlik, W. W. (2009). Monocytes and vascular endothelial cells apoptosis. Role of p-HSP27. *J Physiol Pharmacol, 60*(4), 55-61. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065497

Ghosh, A. P., Klocke, B. J., Ballestas, M. E., & Roth, K. A. (2012). CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PLoS One, 7*(6), e39586. doi:10.1371/journal.pone.0039586

Gomes, N. P., & Espinosa, J. M. (2010). Gene-specific repression of the p53 target gene PUMA via intragenic CTCF-Cohesin binding. *Genes Dev, 24*(10), 1022-1034. doi:10.1101/gad.1881010

Gomez-Bougie, P., Bataille, R., & Amiot, M. (2004). The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol, 34*(11), 3156-3164. doi:10.1002/eji.200424981

Gomez-Lazaro, M., Galindo, M. F., Concannon, C. G., Segura, M. F., Fernandez-Gomez, F. J., Llecha, N., . . . Jordan, J. (2008). 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem, 104*(6), 1599-1612. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05115.x

Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell, 121*(5), 671-674. doi:10.1016/j.cell.2005.05.019

Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., & Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science, 265*(5173), 808-811. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7914033

Hershko, T., & Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem, 279*(10), 8627-8634. doi:10.1074/jbc.M312866200

Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C., & Day, C. L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ, 14*(1), 128-136. doi:10.1038/sj.cdd.4401934

Hu, M., Li, P., Song, L., Jeffrey, P. D., Chenova, T. A., Wilkinson, K. D., . . . Shi, Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J, 24*(21), 3747-3756. doi:10.1038/sj.emboj.7600832

Hwang, D., Jang, B. C., Yu, G., & Boudreau, M. (1997). Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol, 54*(1), 87-96. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9296354

Ito, H., Kanzawa, T., Miyoshi, T., Hirohata, S., Kyo, S., Iwamaru, A., . . . Kondo, S. (2005). Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status. *Hum Gene Ther, 16*(6), 685-698. doi:10.1089/hum.2005.16.685

Ivanov, V. N., & Ronai, Z. (2000). p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene, 19*(26), 3003-3012. doi:10.1038/sj.onc.1203602

Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., . . . Zambetti, G. P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell, 4*(4), 321-328. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585359

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer, 26*(4), 239-257. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027

Keuling, A. M., Andrew, S. E., & Tron, V. A. (2010). Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines: novel regulation of PUMA. *Pigment Cell Melanoma Res, 23*(3), 430-440. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00698.x

Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A., & Prehn, J. H. (2007). Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(51), 20606-20611. doi:10.1073/pnas.0707906105

Kim, B. J., Ryu, S. W., & Song, B. J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem, 281*(30), 21256-21265. doi:10.1074/jbc.M510644200

Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., & Cheng, E. H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol, 8*(12), 1348-1358. doi:10.1038/ncb1499

Kim, M. R., Jeong, E. G., Chae, B., Lee, J. W., Soung, Y. H., Nam, S. W., . . . Lee, S. H. (2007). Pro-apoptotic PUMA and anti-apoptotic phospho-BAD are highly expressed in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci, 52*(10), 2751-2756. doi:10.1007/s10620-007-9799-z

Kleiger, G., & Mayor, T. (2014). Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol, 24*(6), 352-359. doi:10.1016/j.tcb.2013.12.003

Kobayashi, S., Lee, S. H., Meng, X. W., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., . . . Gores, G. J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J Biol Chem, 282*(25), 18407-18417. doi:10.1074/jbc.M610010200

Kuroki, K., Virard, I., Concannon, C. G., Engel, T., Woods, I., Taki, W., . . . Prehn, J. H. (2009). Effects of transient focal cerebral ischemia in mice deficient in puma. *Neurosci Lett, 451*(3), 237-240. doi:10.1016/j.neulet.2009.01.019

Kushnareva, Y., Andreyev, A. Y., Kuwana, T., & Newmeyer, D. D. (2012). Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation

in mitochondrial outer membranes. *PLoS Biol, 10*(9), e1001394. doi:10.1371/journal.pbio.1001394

Lauretti, E., & Pratico, D. (2015). Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase. *Aging Cell*. doi:10.1111/acel.12381

Lee, B. H., Lee, M. J., Park, S., Oh, D. C., Elsasser, S., Chen, P. C., . . . Finley, D. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature, 467*(7312), 179-184. doi:10.1038/nature09299

Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., . . . et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature, 372*(6508), 739-746. doi:10.1038/372739a0

Lee, J. H., Shin, S. K., Jiang, Y., Choi, W. H., Hong, C., Kim, D. E., & Lee, M. J. (2015). Facilitated Tau Degradation by USP14 Aptamers via Enhanced Proteasome Activity. *Sci Rep, 5*, 10757. doi:10.1038/srep10757

Lee, M. J., Lee, B. H., Hanna, J., King, R. W., & Finley, D. (2011). Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Mol Cell Proteomics, 10*(5), R110 003871. doi:10.1074/mcp.R110.003871

Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., . . . Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell, 10*(3), 495-507. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408819

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell, 94*(4), 491-501. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727492

Li, J., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem, 281*(11), 7260-7270. doi:10.1074/jbc.M509868200

Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D. W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell, 135*(6), 1074-1084. doi:10.1016/j.cell.2008.11.010

Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E., & Yaffe, M. B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell, 17*(1), 37-48. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.021

Matsusaka, T., & Pines, J. (2004). Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol, 166*(4), 507-516. doi:10.1083/jcb.200401139

McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., & Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell, 96*(5), 625-634. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089878

Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., . . . Vousden, K. H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem, 279*(9), 8076-8083. doi:10.1074/jbc.M307469200

Michalak, E. M., Villunger, A., Adams, J. M., & Strasser, A. (2008). In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ, 15*(6), 1019-1029. doi:10.1038/cdd.2008.16

Mikhailov, A., Shinohara, M., & Rieder, C. L. (2005). The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephase and entry into mitosis. *Cell Cycle, 4*(1), 57-62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611649

Mines, M. A., Goodwin, J. S., Limbird, L. E., Cui, F. F., & Fan, G. H. (2009). Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK ativation. *J Biol Chem, 284*(9), 5742-5752. doi:10.1074/jbc.M808507200

Miyashita, T., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell, 80*(2), 293-299. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834749

Moldoveanu, T., Grace, C. R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., . . . Green, D. R. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat Struct Mol Biol, 20*(5), 589-597. doi:10.1038/nsmb.2563

Mouhamad, S., Besnault, L., Auffredou, M. T., Leprince, C., Bourgeade, M. F., Leca, G., & Vazquez, A. (2004). B cell receptor-mediated apoptosis of human lymphocytes is associated with a new regulatory pathway of Bim isoform expression. *J Immunol, 172*(4), 2084-2091. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764673

Nag, D. K., & Finley, D. (2012). A small-molecule inhibitor of deubiquitinating enzyme USP14 inhibits Dengue virus replication. *Virus Res, 165*(1), 103-106. doi:10.1016/j.virusres.2012.01.009

Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell, 7*(3), 683-694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392

Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., & Youle, R. J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J, 18*(9), 2330-2341. doi:10.1093/emboj/18.9.2330

Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., & Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev, 17*(12), 1475-1486. doi:10.1101/gad.1093903

Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science, 288*(5468), 1053-1058. doi:10.1126/science.288.5468.1053

Park, B. S., Song, Y. S., Yee, S. B., Lee, B. G., Seo, S. Y., Park, Y. C., . . . Yoo, Y. H. (2005). Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis, 10*(1), 193-200. doi:10.1007/s10495-005-6074-7

Paul, A., Cuenda, A., Bryant, C. E., Murray, J., Chilvers, E. R., Cohen, P., . . . Plevin, R. (1999). Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *Cell Signal, 11*(7), 491-497. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405759

Peth, A., Besche, H. C., & Goldberg, A. L. (2009). Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol Cell, 36*(5), 794-804. doi:10.1016/j.molcel.2009.11.015

Poukkula, M., Kaunisto, A., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Katajamaki, T., Johnson, M. S., . . . Eriksson, J. E. (2005). Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its

unique C-terminal tail. *J Biol Chem, 280*(29), 27345-27355. doi:10.1074/jbc.M504019200

Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., & 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*(3), 287-296. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198631

Puthalakath, H., & Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ, 9*(5), 505-512. doi:10.1038/sj/cdd/4400998

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., . . . Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science, 293*(5536), 1829-1832. doi:10.1126/science.1062257

Rautureau, G. J., Day, C. L., & Hinds, M. G. (2010). Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int J Mol Sci, 11*(4), 1808-1824. doi:10.3390/ijms11041808

Reimertz, C., Kogel, D., Rami, A., Chittenden, T., & Prehn, J. H. (2003). Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol, 162*(4), 587-597. doi:10.1083/jcb.200305149

Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A., & Anderton, B. H. (1997). Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J Neurochem, 69*(1), 191-198. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202310

Ridley, S. H., Dean, J. L., Sarsfield, S. J., Brook, M., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (1998). A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *FEBS Lett, 439*(1-2), 75-80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9849881

Sanchez-Prieto, R., Rojas, J. M., Taya, Y., & Gutkind, J. S. (2000). A role for the p38 mitogen-acitvated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res, 60*(9), 2464-2472. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811125

Sandow, J. J., Jabbour, A. M., Condina, M. R., Daunt, C. P., Stomski, F. C., Green, B. D., . . . Ekert, P. G. (2012). Cytokine receptor signaling activates an IKK-dependent phosphorylation of PUMA to prevent cell death. *Cell Death Differ, 19*(4), 633-641. doi:10.1038/cdd.2011.131

Schrantz, N., Auffredou, M. T., Bourgeade, M. F., Besnault, L., Leca, G., & Vazquez, A. (2001). Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ, 8*(2), 152-161. doi:10.1038/sj.cdd.4400772

Schrantz, N., Blanchard, D. A., Mitenne, F., Auffredou, M. T., Vazquez, A., & Leca, G. (1999). Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. *Cell Death Differ, 6*(5), 445-453. doi:10.1038/sj.cdd.4400508

Schrantz, N., Bourgeade, M. F., Mouhamad, S., Leca, G., Sharma, S., & Vazquez, A. (2001). p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. *Mol Biol Cell, 12*(10), 3139-3151. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598198

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., . . . Dixit, V. M. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature, 463*(7277), 103-107. doi:10.1038/nature08646

Seward, R. J., von Haller, P. D., Aebersold, R., & Huber, B. T. (2003). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bim in lymphocytes is associated with protection from apoptosis. *Molecular Immunology, 39*(16), 983-993. doi:10.1016/s0161-5890(03)00047-6

Shi, D., & Grossman, S. R. (2010). Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther, 10*(8), 737-747. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930542

Shinji, S., Naito, Z., Ishiwata, S., Ishiwata, T., Tanaka, N., Furukawa, K., . . . Tajiri, T. (2006). Ubiquitin-specific protease 14 expression in colorectal cancer is associated with liver and lymph node metastases. *Oncol Rep, 15*(3), 539-543. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465409

Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol, 89*(3), 289-317. doi:10.1007/s00204-014-1448-7

Sun, Q., Sakaida, T., Yue, W., Gollin, S. M., & Yu, J. (2007). Chemosensitization of head and neck cancer cells by PUMA. *Mol Cancer Ther, 6*(12 Pt 1), 3180-3188. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0265

Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell, 103*(4), 645-654. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106734

Tan, S., Wei, X., Song, M., Tao, J., Yang, Y., Khatoon, S., . . . Wu, B. (2014). PUMA mediates ER stress-induced apoptosis in portal hypertensive gastropathy. *Cell Death Dis, 5*, e1128. doi:10.1038/cddis.2014.95

Tian, Z., D'Arcy, P., Wang, X., Ray, A., Tai, Y. T., Hu, Y., . . . Anderson, K. C. (2014). A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood, 123*(5), 706-716. doi:10.1182/blood-2013-05-500033

Todd, D. E., Densham, R. M., Molton, S. A., Balmanno, K., Newson, C., Weston, C. R., . . . Cook, S. J. (2004). ERK1/2 and p38 cooperate to induce a p21CIP1-dependent G1 cell cycle arrest. *Oncogene, 23*(19), 3284-3295. doi:10.1038/sj.onc.1207467

Trivigno, D., Essmann, F., Huber, S. M., & Rudner, J. (2012). Deubiquitinase USP9x Confers Radioresistance through Stabilization of Mcl-1. *Neoplasia, 14*(10), 893-IN894. doi:10.1593/neo.12598

van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., . . . Huang, D. C. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell, 10*(5), 389-399. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.027

Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., . . . Agostinis, P. (2004). Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J, 18*(15), 1946-1948. doi:10.1096/fj.04-2285fje

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V., & Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science, 298*(5593), 611-615. doi:10.1126/science.1075898

Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., . . . Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science, 302*(5647), 1036-1038. doi:10.1126/science.1090072

Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol, 12*(7), 439-452. doi:10.1038/nrm3143

Wang, H., Qian, H., Yu, J., Zhang, X., Zhang, L., Fu, M., . . . Lin, C. (2006). Administration of PUMA adenovirus increases the sensitivity of esophageal cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Biol Ther, 5*(4), 380-385. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481741

Wang, R., Wang, X., Li, B., Lin, F., Dong, K., Gao, P., & Zhang, H. Z. (2009). Tumor-specific adenovirus-mediated PUMA gene transfer using the survivin promoter enhances radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat, 117*(1), 45-54. doi:10.1007/s10549-008-0163-6

Wang, Y., Wang, J., Zhong, J., Deng, Y., Xi, Q., He, S., . . . Liu, R. (2015). Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol, 32*(1), 379. doi:10.1007/s12032-014-0379-8

Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., . . . Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev, 14*(16), 2060-2071. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950869

Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., . . . Dixit, V. M. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature, 471*(7336), 110-114. doi:10.1038/nature09779

Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., . . . Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev, 19*(11), 1294-1305. doi:10.1101/gad.1304105

Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., . . . Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science, 315*(5813), 856-859. doi:10.1126/science.1133289

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol, 139*(5), 1281-1292. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382873

Wu, N., Liu, C., Bai, C., Han, Y. P., Cho, W. C., & Li, Q. (2013). Over-expression of deubiquitinating enzyme USP14 in lung adenocarcinoma promotes proliferation through the accumulation of beta-catenin. *Int J Mol Sci, 14*(6), 10749-10760. doi:10.3390/ijms140610749

Yao, T., & Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature, 419*(6905), 403-407. doi:10.1038/nature01071

Yee, K. S., & Vousden, K. H. (2008). Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis, 13*(1), 87-95. doi:10.1007/s10495-007-0140-2

You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., . . . Mak, T. W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to

cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med, 203*(7), 1657-1663. doi:10.1084/jem.20060353

Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol, 9*(1), 47-59. doi:10.1038/nrm2308

Yu, J., Yue, W., Wu, B., & Zhang, L. (2006). PUMA sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation. *Clin Cancer Res, 12*(9), 2928-2936. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2429

Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene, 27 Suppl 1*, S71-83. doi:10.1038/onc.2009.45

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell, 7*(3), 673-682. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463391

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., & Korsmeyer, S. J. (1996). 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), 619-628. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929531

Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C., & Reed, J. C. (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem, 283*(15), 9580-9586. doi:10.1074/jbc.M708426200

Zhang, C., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Han, L., You, Y., . . . Kang, C. (2010). PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol, 37*(6), 1621-1626. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042732

Zhang, C. Z., Zhang, J. X., Zhang, A. L., Shi, Z. D., Han, L., Jia, Z. F., . . . Kang, C. S. (2010). MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer, 9*, 229. doi:10.1186/1476-4598-9-229

Zhao, J. J., Chu, Z. B., Hu, Y., Lin, J., Wang, Z., Jiang, M., . . . Carrasco, R. D. (2015). Targeting the miR-221-222/PUMA/BAK/BAX Pathway Abrogates Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0457

Zhu, H., Cao, X., Ali-Osman, F., Keir, S., & Lo, H. W. (2010). EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocalization of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett, 294*(1), 101-110. doi:10.1016/j.canlet.2010.01.028

Zhu, Y., Swanson, B. J., Wang, M., Hildeman, D. A., Schaefer, B. C., Liu, X., . . . Marrack, P. (2004). Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(20), 7681-7686. doi:10.1073/pnas.0402293101

Caractérisation de nouvelles voies régulant l'expression et l'activité des protéines Mcl-1 et PUMA

Mots clés : Apoptose, Famille Bcl-2, Cancer, Lymphome de Burkitt

Le cancer est un problème majeur de santé public, tuant chaque année plusieurs millions de personnes. L'inhibition de la mort cellulaire programmée, l'apoptose, est considérée comme l'un des paramètres principaux impliqués dans son initiation et son développement. La voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose est régulée par la famille Bcl-2. Jusqu'à maintenant, on pensait que la protéine PUMA, une protéine pro-apoptotique, était principalement exprimée au niveau mitochondrial. Nous avons montré qu'à l'état basal, PUMA était exprimé au niveau du cytosol des lymphocytes B humains. Cependant, suite à un signal apoptotique, PUMA est capable de transloquer du cytosol à la mitochondrie, de façon indépendante des caspases mais dépendante de l'activation de la MAPKinase p38, permettant ainsi son interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 dont l'inhibition conduit à l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques, Mcl-1 notamment, sont souvent surexprimées dans les tumeurs. Mcl-1 est une protéine à courte demi-vie, rapidement dégradée par le protéasome. Cette dégradation dépend de son ubiquitination réalisée par des E3 ligases (E3). Quelques E3 et une déubiquitinase (DUB), hydrolysant les chaînes d'ubiquitine, régulant l'expression de Mcl-1 ont été décrites. Cependant, ces protéines sont soit très peu exprimées, soit leur inhibition n'a pas d'impact sur l'expression de Mcl-1 dans notre modèle. Nous avons donc entrepris de caractériser de nouvelles E3 et DUB régulant l'ubiquitination de Mcl-1. Après une immunoprécipitation de Mcl-1 dans nos cellules, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, nous avons identifié la DUB USP14. Lorsque son expression est diminuée, l'expression et la stabilité de Mcl-1 diminuent de façon sélective. Nos résultats pourraient contribuer à une approche à double-tranchant dans le traitement du cancer, en retirant les freins à l'apoptose via une diminution de l'expression de Mcl-1 d'une part et en l'activant via PUMA de l'autre.

Characterization of new regulatory pathways for Mcl-1 and PUMA expression and activity

Keywords : Apoptosis, Bcl-2 family, Cancer, Burkitt's lymphoma

Cancer is a major public health issue, killing millions of people worldwide each year. The inhibition of apoptosis, a programmed cell death, in its onset and development has been well documented, making it one of the hallmarks of cancer. The intrinsic (mitochondrial) pathway of apoptosis is regulated by the Bcl-2 (B cell lymphoma-2) family. Up until now, PUMA, a pro-apoptotic protein, was thought to be mainly expressed at the mitochondria, based on experiments where it had been overexpressed. We showed that endogenous PUMA is mainly expressed in the cytosol of activated or resting B cells. However, upon apoptotic stress, PUMA was able to translocate from the cytosol to the mitochondria, in a caspase-independent but p38-dependent manner, allowing PUMA to bind and inhibit the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1, and thereby leading to cell death. The anti-apoptotic proteins, especially Mcl-1, are often overexpressed in tumors. Mcl-1 is a protein with a short half-life, degraded rapidly by the proteasome. This degradation is ubiquitin-dependent, requiring E3 ligases (E3). A handful of E3s and one deubiquitinase (DUB), that hydrolyses ubiquitin chains, have been reported to regulate Mcl-1 expression. However, they were either very poorly expressed or their inhibition had no impact on Mcl-1 expression in our model. We thus undertook to characterize new E3s and DUBs mediating Mcl-1 ubiquitylation. After an immunoprecipitation of Mcl-1 in our cells, followed by a mass spectrometry analysis, we identified the DUB USP14. When knocked down, Mcl-1 expression was selectively decreased and its stability enhanced when USP14 was overexpressed. Our results could help build "double-edge" therapies, removing the breaks on apoptosis on one hand via Mcl-1 downregulation while activating it on the other via PUMA translocation.