

Antagonistes de Bcl-2, thérapies anticancéreuses alternatives

par Anne Mazars, Olivier Geneste & John Hickman

Institut de Recherches Servier, Division Recherche Cancérologie, 125, Chemin de Ronde, 78290 Croissy/Seine, France.

Correspondance : anne.mazars@fr.netgrs.com

Reçu le 19 avril 2005

RÉSUMÉ

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un processus nécessaire au développement embryonnaire normal et au maintien de l'homéostasie tissulaire. L'apoptose a été décrite comme étroitement liée à diverses voies essentielles de signalisation. L'identification de points de contrôles critiques de la mort cellulaire est un enjeu majeur pour la connaissance générale de la biologie cellulaire mais surtout elle permettrait de fournir des cibles pour de nouvelles thérapies, en particulier en oncologie. Il est désormais admis que des altérations dans l'exécution de l'apoptose peuvent avoir une influence majeure sur l'initiation et/ou la progression tumorale ainsi que sur la chimiorésistance. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des acteurs intracellulaires essentiels dans la machi-

nerie apoptotique. Cette famille de protéines contient à la fois des membres antiapoptotiques et pro-apoptotiques qui interagissent pour réguler l'apoptose. L'inhibition de l'hétérodimérisation entre membres pro- et anti-apoptotiques est suffisante pour promouvoir l'apoptose chez des cellules de mammifères. De petites molécules ou des peptidomimétiques, inhibant l'hétérodimérisation entre les membres de la famille Bcl-2, représentent un prototype thérapeutique pour cibler la cascade apoptotique car ils induisent la mort cellulaire par activation directe de la voie apoptotique mitochondriale. De nombreuses données suggèrent que ces petites molécules antagonistes de Bcl-2 pourraient être des outils de choix pour induire l'apoptose préférentiellement dans les cellules néoplasiques.

SUMMARY The Bcl-2 family of proteins as drug targets

Programmed cell death or apoptosis is a crucial process for normal embryonic development and homeostasis. Apoptosis is known to be coupled to multiple signalling pathways. Identification of critical points in the regulation of apoptosis is of major interest both for the understanding of control of cell fate and for the discovery of new pharmacological targets, particularly in oncology. Indeed, defects in the execution of apoptosis are known to participate in tumour initiation and progression as well as in chemoresistance. The Bcl-2 family members constitute essential intracellular players in the apoptotic machi-

nery. Those proteins are either pro or anti-apoptotic, they interact with each other to regulate apoptosis. Inhibiting the heterodimerisation between pro- and anti-apoptotic members is sufficient to promote apoptosis in mammalian cells. Small molecules, antagonists or peptidomimetics inhibiting this heterodimerisation, represent a therapeutic prototype targeting the apoptotic cascade. They induce cell death by activating directly the mitochondrial apoptotic pathway. Considerable evidence indicate that such Bcl-2 antagonists could be useful drugs to induce apoptosis preferentially in neoplastic cells.

CANCER

Le cancer est un processus complexe au cours duquel 5 à 10 mutations génétiques sont nécessaires pour conduire à une tumeur solide. Evan et ses collaborateurs ont montré que seulement deux modifications étaient indispensables pour induire de façon expérimentale l'initiation et la progression tumorales dans le pancréas murin : l'expression du proto-oncogène c-myc et l'inhibition de l'apoptose induite par cet oncogène par une expression ciblée d'un membre

anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Pelengaris *et al.*, 2002). Dans ce modèle, la suppression de l'expression de la protéine c-myc chez des animaux possédant des métastases pancréatiques conduit à une complète régression des tumeurs murines et un effacement de la néo-vascularisation tumorale. Des modèles animaux, ayant une expression conditionnelle d'oncogènes, tels que c-myc, Ras ou Bcr-Abl, ont démontré que les tumeurs induites restent dépendantes de cet oncogène. En effet, les cellules tumorales meurent par apoptose lorsque l'expression de l'oncogène

est réprimée (Felsher *et al.*, 1999; Pelengaris *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Huettnner *et al.*, 2000).

CANCER ET APOPTOSE

L'apoptose est un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaires. Elle permet le maintien d'un fonctionnement normal du système immunitaire, elle est également impliquée dans l'embryogenèse, la défense contre l'infection virale et le contrôle du nombre de neurones.

Les changements morphologiques apparaissant au cours de l'apoptose sont caractérisés par une condensation du cytoplasme, accompagnée d'une condensation et d'une fragmentation de la chromatine nucléaire ainsi que des coupures de l'ADN. Les membranes forment des repliements contenant des organites intacts. Ces vésicules, appelés corps apoptotiques, sont rapidement phagocytées et digérées par les macrophages ou les cellules voisines. Dans les macrophages, les cellules apoptotiques sont dégradées et leurs éléments chimiques d'assemblage sont recyclés. La phagocytose est activée après modification de la structure chimique à la surface des cellules apoptotiques pour permettre la reconnaissance par les macrophages; les phosphatidylsérines sont exposées à la surface externe de la membrane, permettant cette reconnaissance.

Les études effectuées sur le nématode *Caenorhabditis elegans* ont permis l'identification de deux gènes (*ced-3* et *ced-4*) contribuant à l'exécution du programme apoptotique et d'un gène (*ced-9*) l'inhibant. *Ced-3* est l'archétype de la famille des caspases (protéases à cystéine). *Bcl-2* (B-cell lymphoma 2), dont l'expression dérégulée dans de nombreuses tumeurs humaines protège contre la mort cellulaire, est l'homologue de *ced-9* chez les vertébrés. Enfin, l'homologue humain de *Ced-4*, *Apaf-1* (Apoptotic protease activating factor-1), exerce son action pro-apoptotique en activant la caspase-3. La présence, chez les mammifères, de multiples molécules homologues de *ced-3* et *ced-9*, aux fonctions redondantes et antagonistes dans l'apoptose, suggère que le programme d'apoptose se serait compliqué au cours de l'évolution. L'importance des processus d'apoptose en physiologie fait que toute dérégulation de ces processus sera préjudiciable pour l'organisme. En effet, au cours du processus de cancérisation, il existe des déficiences de l'apoptose influençant l'initiation et/ou la progression tumorale (Hanahan & Weinberg, 2000). A l'inverse du cancer où l'apoptose est réprimée, d'autres maladies, notamment les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson, mais aussi certaines maladies auto-immunes pourraient présenter une apoptose excessive. Une meilleure compréhension des mécanismes d'apoptose permettrait le développement de nouvelles stratégies visant à manipuler la machinerie apoptotique.

Un certain nombre d'observations ont conduit à prendre en compte l'apoptose en oncologie. Par exemple,

l'altération de l'expression du gène *Bcl-2*, qui a une fonction de protection contre l'apoptose, aboutit au développement de tumeurs telles que des lymphomes B. L'expression de certains oncogènes ou anti-oncogènes, tels que *c-myc*, *Rb* ou *p53*, est corrélée à la sensibilité cellulaire à l'apoptose. De nombreuses observations montrent que la plupart des agents anticancéreux exercent leur action en induisant l'apoptose. De plus, il semble que l'efficacité d'une thérapie soit corrélée à la capacité de la cellule tumorale cible à répondre à l'apoptose et que la résistance cellulaire à certains traitements reflète une certaine incapacité à activer la cascade des événements de l'apoptose (Schmitt & Lowe, 1999).

Au cours des dernières années, les recherches ont porté sur l'identification des éléments du programme de mort cellulaire; cependant, malgré la découverte d'acteurs importants dans ce processus, peu d'éléments sont à notre disposition pour construire un schéma cohérent résumant la façon dont le programme apoptotique se déclenche et est régulé. Ceci est dû au fait que certains facteurs susceptibles d'induire l'apoptose, tels que les protéines oncogéniques et les protéines suppresseurs de tumeurs, sont aussi susceptibles de l'inhiber dans certains cas. Ceci s'explique par le fait que la réponse biologique de la cellule résulte de l'intégration des différentes signalisations de l'environnement qui lui sont perceptibles en fonction de son génotype et de son phénotype à ce moment donné. Il apparaît donc que l'apoptose est une réponse cellulaire hautement régulée avec des points de contrôle qui peuvent être également des points potentiels d'intervention dans un but thérapeutique.

Cependant, malgré l'extrême diversité des signaux intervenant dans l'exécution du programme apoptotique et sa régulation, on peut dégager des mécanismes généraux qui se sont conservés au travers de l'évolution et qui font intervenir des protéines dont l'expression conditionne la survie cellulaire. Au nombre de celles-ci figurent *p53*, la famille *Bcl-2* et la famille des caspases. On peut penser que ces avancées dans la connaissance des éléments du programme de mort cellulaire pourront être exploitées en vue de moduler l'apoptose à des fins thérapeutiques dans des pathologies où existe un défaut d'apoptose comme le cancer.

LA FAMILLE DES PROTÉINES *Bcl-2*

La famille *Bcl-2*, dont les membres jouent un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose, notamment en contrôlant l'intégrité mitochondriale, présente un nombre limité de protéines pouvant servir de cibles pour une thérapie anticancéreuse. Certains membres de cette famille sont proapoptotiques alors que d'autres sont anti-apoptotiques.

Le clonage chez le nématode *C. elegans* du gène *ced-9* a révélé une homologie de séquence de son produit avec la protéine anti-apoptotique *Bcl-2*. Ces homologies semblent indiquer que cette famille de protéines joue un

rôle majeur dans la régulation des caspases et plus généralement dans l'apoptose. La translocation t(14, 18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires de type B a conduit à la découverte de Bcl-2 et de son activité oncogénique chez l'Homme (Tsujimoto *et al.*, 1984).

Bcl-2 a été reconnu comme le membre fondateur d'une famille d'une vingtaine de protéines impliquées soit dans la survie, soit dans la mort cellulaire induite par un grand nombre de stimuli intra ou extracellulaires comme les dommages de l'ADN, l'expression d'oncogènes, les glucocorticoides, etc. (Yang & Korsmeyer, 1996).

En fonction de leur rôle biologique, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en deux sous-familles, les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xL (Boise & Thompson, 1997), Bcl-w (Gibson *et al.*, 1996), Mcl-1 (Kozopas *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1997), A1 (Lin *et al.*, 1993)/Bfl-1 (Choi *et al.*, 1995), et des membres pro-apoptotiques comme Bax (Oltvai *et al.*, 1993), Bak (Chittenden *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995), Bok (Hsu *et al.*, 1997)/Mtd (Inohara *et al.*, 1998a), Diva (Inahora *et al.*, 1998b), Bcl-xS (Boise & Thompson, 1997), Bik (Boyd *et al.*, 1995)/Nbk (Han *et al.*, 1996), Hrk/Dp5 (Inohara *et al.*, 1997), Bim/Bod (O'Connor *et al.*, 1998), Blk (Hegde *et al.*, 1998), BNIP3 (Chen *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998), Bad (Yang *et al.*, 1995), Bid (Wang *et al.*, 1996).

Le ratio entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques à multi-domaines détermine la sensibilité des cellules à la mort (Oltvai *et al.*, 1993).

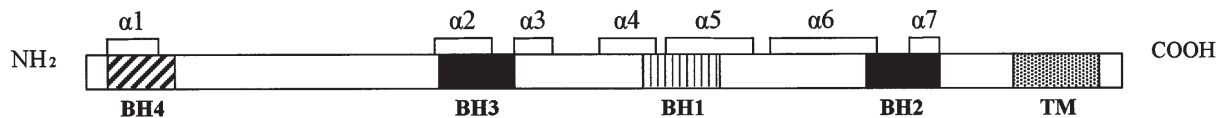
Les membres de la famille anti-apoptotique de type Bcl-2 possèdent tous au moins quatre motifs conservés appelés domaines BH (Bcl-2 homology domain) (BH1 à BH4) (Kelekar & Thompson, 1998). Les membres de la famille pro-apoptotique de type Bax ressemblent à Bcl-2, à l'exception du domaine BH4 propre aux molécules anti-apoptotiques. Enfin, d'autres partenaires ne possèdent que le domaine BH3, essentiel à leur fonction pro-apoptotique. Ainsi, la distribution de ces domaines permet de classer cette famille en trois groupes.

Sous-familles des protéines Bcl-2 (Fig. 1 et 2)

Tout d'abord, les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, et Mcl-1, présentent des homologies de séquence dans les domaines BH1 à BH4. Ces membres antiapoptotiques sont localisés à la mitochondrie où ils empêchent la perméabilisation membranaire et donc la libération de facteurs apoptotiques. Lorsqu'ils sont localisés dans le réticulum endoplasmique, ils régulent la dynamique calcique (Oakes *et al.*, 2003).

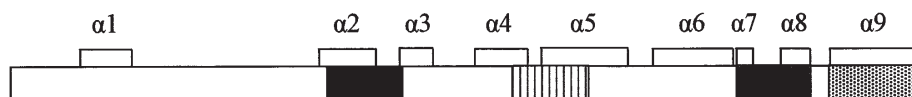
Puis les membres pro-apoptotiques à multi-domaines, comme Bax, Bak et Bok, qui possèdent des homologies

Anti-Apoptotiques : Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, A1/Bfl-1, ...

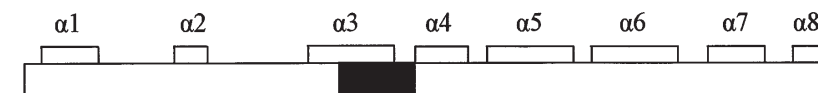


Pro-Apoptotiques :

Multi-domaines : Bax, Bak, Bok/Mtd, Diva, ...



« BH3-only » :



Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Bim, Blk, BNIP3, ...

(d'après Cory et Adams, 2002)

FIG. 1. – Protéines de la famille Bcl-2.

Représentation schématique des trois sous-familles des protéines de la famille Bcl-2. Les domaines conservés BH (Bcl-2 homology domain), les hélices α et les domaines transmembranaires (TM) sont indiqués.

dans les domaines BH1 à BH3. Un cas particulier, la protéine pro-apoptotique Diva qui possède un domaine BH4. Les membres pro-apoptotiques sont intrinsèquement cytosoliques. Quand ils sont localisés dans la membrane mitochondriale, leur principale fonction est de perturber la perméabilité de cette membrane, conduisant ainsi à la libération de nombreuses protéines apoptogènes de l'espace mitochondrial intermembranaire, comme par exemple le cytochrome-c, grâce à un mécanisme encore mal connu (Adams & Cory, 1998; Kuwana *et al.*, 2002; Martinou *et al.*, 2000). Ces protéines sont capables de contrôler l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique en régulant des stimuli apoptotiques dépendant du calcium (Scorrano, 2003).

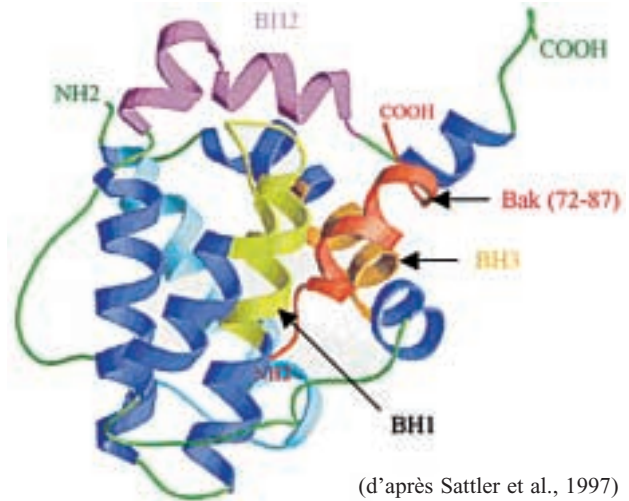
Et enfin, il existe des membres n'ayant qu'un seul domaine BH3, telles que Bik, Hrk, Bim, Blk, Bid et BNIP3. Tous les membres de la famille Bcl-2, à l'exception d'A1/Bfl-1, Bad et Bid, possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être localisés sur les membranes externes de la mitochondrie, du noyau et du réticulum endoplasmique (Krajewski *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1993; Akao *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1997).

L'activité des différents membres de la famille Bcl-2 peut être régulée par divers mécanismes, comme la dimérisation ou la phosphorylation.

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétérodimères. Les membres pro-apoptotiques comme Bax ou Bak, peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-xL; le domaine BH3 de Bax ou Bak interagissant avec la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et Bcl-xL (Chittenden *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997; Simonen *et al.*, 1997).

En fait, il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaires soit influencée par le type et la proportion de dimères pro-/anti-apoptotiques formés (Oltvai *et al.*, 1993; Oltvai & Korsmeyer, 1994; Sedlak *et al.*, 1995). Les membres ne comportant qu'un domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité intrinsèque. En fait, ils joueraient leur rôle pro-apoptotique en interagissant, *via* leur domaine BH3, avec les membres antiapoptotiques, neutralisant ainsi leur fonction. Ces protéines ne comportant qu'un domaine BH3 peuvent être considérées comme des « sentinelles » de dommages. Après activation par divers types de dommages, ces protéines induisent l'apoptose par un mécanisme dépendant des protéines Bax et/ou Bak (Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001).

Une corrélation directe entre le rapport des quantités de protéines pro- et anti-apoptotiques et la capacité de la cellule à résister à l'apoptose ou à mourir n'est pas toujours évidente, et des modifications post-traductionnelles ajoutent un degré supplémentaire de complexité à ces régulations (Wang *et al.*, 1996). L'exemple le plus caractéristique de ce type de régulation est la phosphorylation de Bad dépendante des facteurs de croissance, notamment dans des cellules dépendantes de l'IL-3 (interleukine-3). En présence du facteur de croissance IL-3, Bad



(d'après Sattler *et al.*, 1997)

FIG 2. – Structure tridimensionnelle du complexe Bcl-xL/Bak-BH3.

Structure en ruban du squelette de la protéine Bcl-xL complexée au peptide BH3 de Bak (déterminée par RMN). Les domaines conservés BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL sont représentés respectivement en jaune, rose et orange, le peptide BH3 de Bak en rouge.

est phosphorylée sur sérine par la kinase Akt (Zha *et al.*, 1996). Cette phosphorylation entraîne l'association de Bad avec la protéine cytosolique 14-3-3 (Zha *et al.*, 1996). En absence d'IL-3, Bad est déphosphorylée et peut donc se libérer de la protéine 14-3-3. Une fois libérée, Bad peut interagir avec Bcl-xL, *via* son domaine BH3 et ainsi bloquer son action protectrice (Kelekar *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1997). Bcl-2 est également une phosphoprotéine (Chang *et al.*, 1997). Ainsi, un traitement des cellules avec du taxol (agent chimiothérapeutique) ou l'utilisation d'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatase) résulte en la phosphorylation de Bcl-2 sur des sérines. Cette phosphorylation rend alors Bcl-2 incapable d'inhiber l'apoptose (Haldar *et al.*, 1995). Raf1 pourrait être la sérine/thréonine kinase responsable de cette modification. En effet, il a été montré que Raf1 et Bcl-2 pouvaient interagir (Wang *et al.*, 1994; Blagosklonny *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). De plus, la voie SAPK (Maundrell *et al.*, 1997) ainsi que la protéine kinase A (Srivastava *et al.*, 1998) ont aussi été impliquées dans la phosphorylation de Bcl-2.

Un certain nombre de renseignements ont pu être obtenus à partir de l'étude de souris rendues déficientes en protéines de la famille Bcl-2 par inactivation du gène correspondant.

Les souris invalidées pour le gène de Bcl-2 sont viables. Cependant la majorité d'entre elles meurent quelques semaines après la naissance. Les souris Bcl-2^{-/-} développent une insuffisance rénale sévère due à un nombre diminué de néphrons (Veis *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1994; Kamada *et al.*, 1995). De plus, les souris deviennent grises à l'âge de 5 ou 6 semaines, période qui correspond au deuxième cycle des follicules pileux. Cette hypopigmentation reflète la diminution de la survie des

mélanocytes (Veis *et al.*, 1993 ; Nakayama *et al.*, 1994 ; Kamada *et al.*, 1995). Bien que les souris Bcl-2^{-/-} présentent une différenciation normale des lignages T et B, elles sont incapables de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Le thymus et la rate subissent une apoptose massive quelques semaines après la naissance (Veis *et al.*, 1993 ; Nakayama *et al.*, 1994). Cependant, les résultats obtenus à partir de ces souris sont souvent difficiles à interpréter. En effet, le système nerveux, la peau ou le système intestinal (qui expriment fortement Bcl-2 chez la souris normale) ne présentent pas d'anomalies particulières chez ces souris déficientes. Ces observations suggèrent une redondance de fonction entre les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (Nakayama *et al.*, 1994).

L'inactivation du gène Bcl-xL est létale au jour 13 de développement embryonnaire (Motoyama *et al.*, 1995). Les souris Bcl-xL^{-/-} présentent une apoptose massive au niveau du cerveau, de la moelle épinière et des cellules hématopoïétiques. L'effet létal de l'inactivation de ce gène est probablement dû à la mort massive des cellules hématopoïétiques et des neurones (Motoyama *et al.*, 1995).

Les souris Bax^{-/-} sont viables, indiquant que Bax n'est pas essentiel pour le développement de l'organisme (Knudson *et al.*, 1995). Les souris mâles invalidées pour Bax sont stériles en raison d'anomalies au niveau des tubules séminifères. Les ovaires des souris Bax^{-/-} présentent un excès cellulaire dans les follicules primaires, consécutif à un défaut d'apoptose. De plus, les neurones isolés à partir de ces souris peuvent survivre en absence de facteurs trophiques. Il semble donc que, bien que les neurones expriment la plupart des membres de la famille Bcl-2, la mort induite par la privation de facteurs trophiques soit strictement dépendante de Bax (Deckwerth *et al.*, 1996).

Les souris Bcl-w^{-/-} sont viables (Print *et al.*, 1998). Alors que les femelles possèdent des fonctions reproductrices normales, les mâles sont stériles. Les testicules se développent normalement mais la maturation des spermatozoïdes ne peut se faire jusqu'à terme en raison d'un grand nombre de cellules apoptotiques au niveau du tube séminifère.

Mécanismes de mort cellulaire induite par les domaines BH3

Actuellement, nous n'avons qu'une connaissance partielle de la façon par laquelle les protéines n'ayant qu'un seul domaine BH3 initient l'apoptose. De nombreuses données démontrent que ces protéines pro-apoptotiques, tout comme les peptides BH3, induisent l'apoptose par un mécanisme qui nécessite la présence des protéines Bak et/ou Bax. Dans des conditions normales, ces protéines à multi-domaines sont inactives et localisées respectivement à la mitochondrie ou dans le cytosol (Wolter *et al.*, 1997) ; elles ont besoin d'un changement conformationnel pour exercer leur fonction apoptotique. Donc, pour induire l'apoptose dépendante de Bax/Bak, un signal doit activer ces protéines.

Les protéines à multi-domaines Bax et Bak peuvent être activées par les domaines BH3 selon deux mécanismes.

D'une part, agonistes de mort, par exemple les domaines BH3 de Bid, Bim ou Puma. Il s'agit d'une activation directe de Bax/Bak, *via* une interaction entre ces protéines. Les protéines anti-apoptotiques peuvent interférer avec ce processus en inhibant les formes activées de Bax/Bak ou en se liant directement à ces agonistes de mort.

D'autre part, antagonistes de survie, comme le domaine BH3 de Bad. Il s'agit alors d'une interaction seulement entre membres anti-apoptotiques. Potentiellement, ces antagonistes de survie peuvent induire l'apoptose de deux façons : en libérant des agonistes de mort des protéines anti-apoptotiques, qui vont à leur tour activer Bax/Bak, ou en libérant directement Bax/Bak actifs des protéines anti-apoptotiques (Letai *et al.*, 2002 ; Moreau *et al.*, 2003).

Des anomalies dans les gènes affectant l'apoptose sont retrouvées dans presque tous les cancers. Ainsi, Bcl-2 est surexprimé dans 70 % des cancers du sein, 30-60 % des cancers de la prostate, 80 % des lymphomes B, 90 % des adénocarcinomes colorectaux, ainsi que dans de nombreuses autres formes de cancers. Récemment, un modèle de souris transgéniques exprimant de façon conditionnelle le gène *bcl-2*, a permis de montrer que la surexpression continue de Bcl-2 est nécessaire à la progression tumorale (Letai *et al.*, 2004). Bcl-2 est donc une nouvelle cible anticancéreuse très séduisante.

STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

Les cellules néoplasiques bénéficient de nombreux avantages : elles peuvent survivre dans un environnement hostile, elles peuvent échapper à la mort induite par d'autres changements oncogéniques et elles peuvent évoluer vers des formes plus agressives. De plus, une apoptose défectueuse facilite les métastases car les cellules cancéreuses ignorent les signaux de leur environnement et survivent bien qu'étant détachées de la matrice extracellulaire.

Des liens entre la mort cellulaire programmée et le cancer ont émergé quand Bcl-2 a été décrit comme capable d'inhiber la mort cellulaire (Vaux *et al.*, 1988). Bcl-2 et ses proches homologues, Bcl-xL et Bcl-W, sont capables d'inhiber l'apoptose induite par divers cytotoxiques. Bcl-2 et les autres membres anti-apoptotiques s'associent à la membrane externe de la mitochondrie et aux membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. Au niveau de la mitochondrie, ils maintiennent l'intégrité de la membrane externe et peuvent empêcher la libération de cytochrome-c et l'activation séquentielle de la caspase-9 (Cory & Adams, 2002). Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été impliqués à la fois dans les processus de cancérisation et dans la résistance de ces cellules transformées aux traitements anticancéreux. Une surexpression de Bcl-2 rend les cellules tumorales réfractaires aux traitements par divers agents

thérapeutiques et aux irradiations, *in vitro* et *in vivo* (Strasser *et al.*, 1994 ; Schmitt *et al.*, 2000). Pour ces raisons, le ciblage de la machinerie apoptotique a suscité un vif intérêt.

Des petites molécules occupant la poche hydrophobe de Bcl-2/Bcl-xL (site de liaison des BH3) ou une approche antisens ciblant Bcl-2/Bcl-xL semblent être deux stratégies de choix pour contrer ces protéines et ainsi induire une toxicité dans les cellules cancéreuses (Wang *et al.*, 2000a ; Kim *et al.*, 2001 ; Tzung *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2000b ; Waters *et al.*, 2000).

Thérapie génique et approches antisens

Une approche prometteuse a été de cibler les membres de la famille Bcl-2 avec des oligonucléotides antisens. Une autre stratégie vise à exprimer la protéine pro-apoptotique Bax à l'aide d'adénovirus recombinants codant pour Bax (Kagawa *et al.*, 2000 ; Tsuruta *et al.*, 2001). Cette approche a toutefois montré certains inconvénients, en particulier la forte toxicité de cette construction, y compris vis-à-vis des cellules saines. Une optimisation est donc nécessaire avec un ciblage de l'expression du transgène seulement dans les cellules transformées. Ainsi une nouvelle construction, contenant le promoteur de la reverse transcriptase de la télomérase humaine placé en amont de l'antisens de Bax, permet une expression spécifique dans les cellules cancéreuses et une éradication de la croissance tumorale dans les modèles de xéno greffes (Gu *et al.*, 2000).

D'autres stratégies, utilisant des oligonucléotides antisens de Bcl-xL et Mcl-1 (Derenne *et al.*, 2002), des oligonucléotides antisens choisis pour transformer la protéine anti-apoptotique Bcl-xL en une protéine Bcl-xS pro-apoptotique (Taylor *et al.*, 1999) ou des antisens présentant une double spécificité pour Bcl-2 et Bcl-xL (Zangemeister-Wittke *et al.*, 2000), ont été décrites.

Jusqu' alors, la stratégie antisens visant Bcl-2 n'a pas montré d'effets thérapeutiques suffisants lors des études cliniques.

Approches peptidiques

Une alternative pour contrer les fonctions pro-survie de ces protéines est une stratégie ciblant Bcl-2 et Bcl-xL avec des peptides. L'analyse tridimensionnelle de Bcl-xL (Sattler *et al.*, 1997) et Bcl-2 (Petros *et al.*, 2001) complexées à un domaine BH3 a révélé la présence d'une poche hydrophobe à la surface de ces protéines dans laquelle se lient les domaines BH3. Cette poche est formée par les domaines BH1, BH2 et BH3.

Des résultats prometteurs ont été obtenus avec des peptides micro-injectés ou liés à des composés perméants d'origine lipidique ou peptidique (Letai *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2000b). De plus, l'activation de c-Myc dans des cellules primaires de souris augmente leur sensibilité à l'apoptose induite par les peptides BH3 (Juin *et al.*, 2002). Le mécanisme d'action de ces peptides inhibiteurs reste toutefois encore mal connu. Les cellules cancéreuses doivent être intrinsèquement sensibilisées aux effets

délétères des antagonistes de Bcl-2/Bcl-xL. En effet, certains peptides perméants ont la capacité d'induire *in vitro* l'apoptose de cellules leucémiques myéloïdes, de ralentir la croissance de ces cellules dans les souris immunodéficientes, bien qu'ayant peu d'effet sur les lymphocytes périphériques normaux (Wang *et al.*, 2000b). L'efficacité de ces peptides BH3 et leur capacité à coopérer avec c-Myc est intacte dans les cellules déficientes en p53 (Juin *et al.*, 2002). Dans ces cellules, ces antagonistes peptidiques semblent présenter un avantage par rapport à l'approche antisens, qui est essentiellement utilisée en combinaison avec une chimiothérapie classique et dont l'efficacité peut être altérée par la perte de p53 (Jiang *et al.*, 2003). L'apoptose induite de façon spécifique par ces peptides BH3 nécessite la présence d'au moins une des deux protéines pro-apoptotiques à multi-domaines Bax ou Bak (Juin *et al.*, 2002).

Une nouvelle approche possible est la synthèse de chimères des peptides inhibiteurs. Ces molécules modifiées doivent présenter une meilleure pénétration cellulaire et une meilleure stabilité que les peptides dont ils sont dérivés, qui sont eux faiblement perméants et instables. De tels peptides en hélice α peuvent présenter une toxicité non spécifique ; en effet, des mutants de BH3 qui n'ont plus la capacité à se lier à Bcl-2/Bcl-xL gardent une activité toxique résiduelle (Juin *et al.*, 2002). Bien que ce faible effet non-spécifique puisse être facilement différencié du puissant effet apoptotique spécifique, il peut limiter l'utilisation de ces peptides *in vivo*. Une étude vient de montrer que l'utilisation du peptide BH3 de Bid modifié par cyclisation, possédant des propriétés pharmacologiques accrues, peut être utilisé *in vivo* dans des modèles de leucémies (Walensky *et al.*, 2004).

Petites molécules chimiques

Actuellement, il existe une quinzaine de molécules décrites capables d'antagoniser Bcl-2/Bcl-xL (Baell & Huang, 2002 ; O'Neill & Hockenbery, 2003 ; Rutledge *et al.*, 2002). Parmi ces molécules, certaines ont été découvertes par des approches de criblage *in silico* basé sur les structures des sites de liaison des domaines BH3 à Bcl-2 et Bcl-xL (Wang *et al.*, 2000a ; Enyedy *et al.*, 2001).

HA14-1 (Fig. 3A)

Ce petit composé organique perméant, capable de se lier à la poche hydrophobe de Bcl-2, avec une IC50 de 9 μ M, est issu d'un criblage *in silico* (Wang *et al.*, 2000a). Il inhibe directement la liaison d'un peptide BH3 de Bak à Bcl-2. Ce composé présente une activité pro-apoptotique sur divers types de cellules cancéreuses, en particulier sur des lignées cellulaires hématopoïétiques cancéreuses qui surexpriment Bcl-2 (Lickliter *et al.*, 2003). L'expression de Bax est un déterminant clé de l'effet cytotoxique de HA14-1 (Chen *et al.*, 2002). Cette molécule, utilisée en combinaison avec de la cytarabine, présente une sélectivité pour les lymphoblastes leucémiques par rapport aux progéniteurs hématopoïétiques normaux (Lickliter *et al.*, 2003).

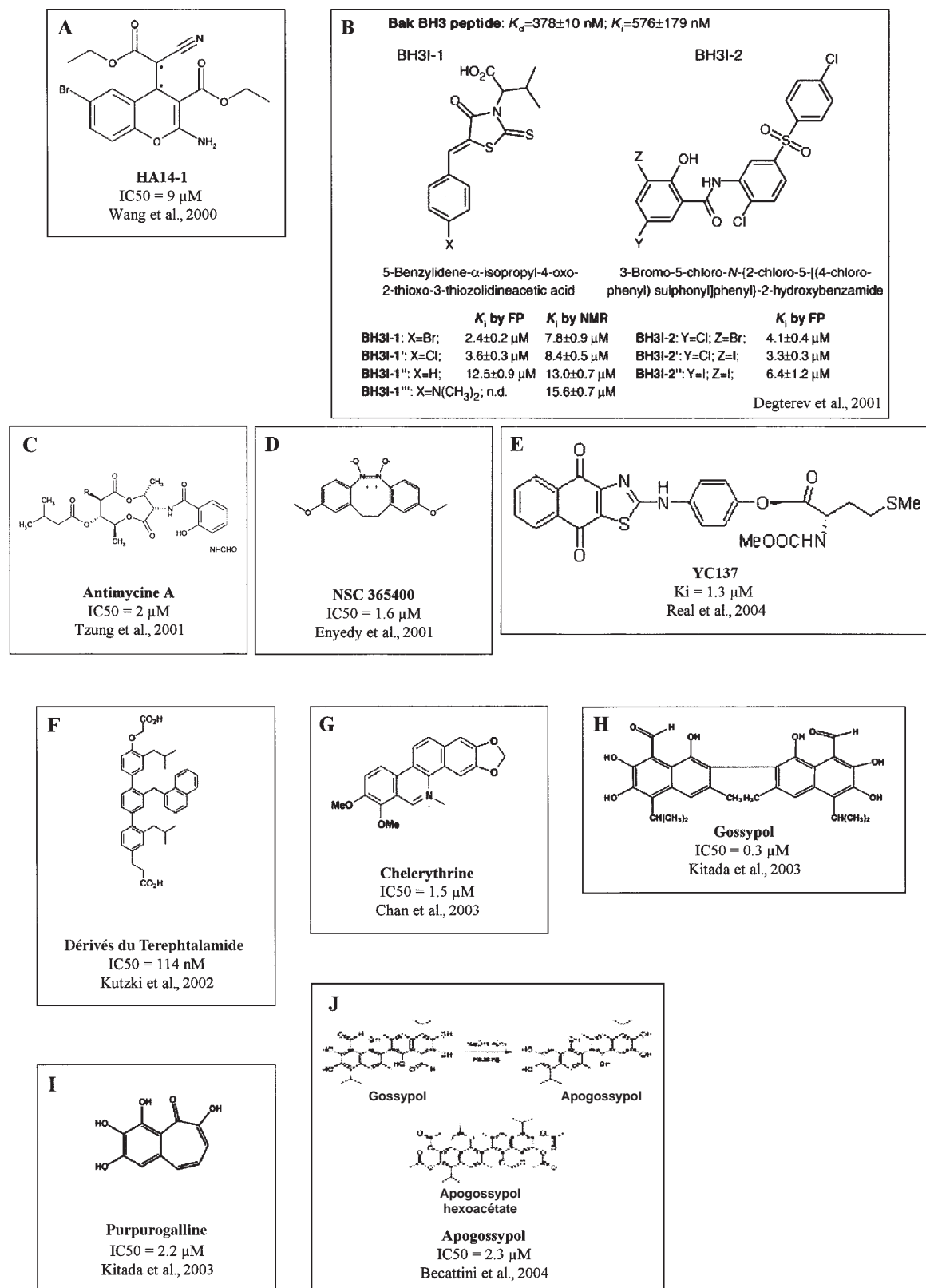


FIG. 3. – Structure de certains inhibiteurs de Bcl-2/Bcl-xL.

BH3 I (Fig. 3B)

Ces composés, apparentés à des thiazolines substituées sur des benzyles, interagissent avec la poche hydrophobe de Bcl-xL principalement avec les domaines BH1 et BH2, perturbent le complexe Bcl/xL/Bak dans des cellules en culture (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) et *in vitro* (RMN, polarisation de fluorescence), et induisent l'apoptose (Degterev *et al.*, 2001). Une amélioration de ces composés, basée sur une optimisation structurale couplée à une approche bioinformatique, a permis de trouver de nouveaux composés (Lugovskoy *et al.*, 2002).

Antimycine A (Fig. 3C)

Connue pour être un inhibiteur du transport d'électron au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (ubiquinone cytochrome-c oxydo réductase), cette molécule inhibe Bcl-xL et induit l'apoptose dans des cellules surexprimant Bcl-xL (Tzung *et al.*, 2001). Le dérivé 2-méthoxy de l'antimycine A, ne possède pas la propriété d'inhibition de la respiration mitochondriale, inhibe la liaison d'un peptide BH3 avec Bcl-2 et induit la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose (Kim *et al.*, 2001). L'antimycine A est également capable d'inhiber la capacité de Bcl-xL à former des pores dans des liposomes synthétiques (Tzung *et al.*, 2001).

NSC 365400 (Fig. 3D)

Wang et collaborateurs ont, en combinant un criblage *in silico* et un criblage biochimique, décrit une série de petits composés qui inhibent la liaison de Bcl-2 au peptide BH3 de Bak (IC50 situées entre 1,6 et 14 μ M) et induisent sélectivement l'apoptose de cellules cancéreuses possédant de forts taux d'expression de Bcl-2 mais présentent un moindre effet sur des lignées ayant des taux indétectables ou très faibles de Bcl-2 (Enyedy *et al.*, 2001). Par une approche de RMN, il a été montré, pour un de ces composés, que l'interaction avec Bcl-xL a lieu au niveau du site de fixation des domaines BH3.

YC137(Fig. 3E)

Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence un nouvel inhibiteur, issu d'un criblage *in silico*, nommé YC137 (Real *et al.*, 2004). Ce composé inhibe la liaison du peptide BH3 de Bid à Bcl-2. Il induit l'apoptose dans des progéniteurs hématopoïétiques surexprimant Bcl-2 mais pas Bcl-xL et dans des cellules de cancer du sein à fort taux d'expression de Bcl-2 mais ne déclenche aucune réponse apoptotique dans diverses cultures cellulaires primaires normales. Les auteurs ont réussi à produire une lignée de cancer du sein résistante au YC 137, ces cellules ont une expression de Bcl-2 réduite, corrélée à une faible activation du facteur de transcription Stat3 et une expression amoindrie du récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Ces cellules cancéreuses, capables d'échapper aux effets apoptotiques de YC137, sont devenues plus sensibles aux chimiothérapies conventionnelles. Ce produit semble donc tuer les cellules cancéreuses de façon sélective. C'est le premier exemple de sélection *in vitro* d'une lignée résistante à un inhibiteur de Bcl-2.

"Triphenyl-based peptidomimetics" (Fig. 3F)

Cette famille de composés, mimant des hélices α , sont capables d'interagir avec la poche hydrophobe de Bcl-xL (Kutzki *et al.*, 2002). Une optimisation a été réalisée et a permis d'obtenir un dérivé possédant une forte affinité de l'ordre de 100 nM pour Bcl-xL. Cependant aucune étude montrant une capacité à induire l'apoptose pour ce composé n'a été décrite.

Chelerythrine (alcaloïde benzophenanthridine) (Fig. 3G)

Connu pour être un puissant inhibiteur de PKC, ce composé issu du criblage d'environ 100 000 composés naturels, a été décrit comme inhibant la liaison du domaine BH3 de Bax à Bcl-xL avec une IC50 de 1,5 μ M. Ce composé est capable d'induire l'apoptose dans des cellules de mammifères surexprimant Bcl-xL par un mécanisme qui déclenche directement la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Chan *et al.*, 2003).

Polyphénols naturels

Gossypol (contraceptif masculin extrait du coton, Fig. 3H) et Purpurogalline (anti-oxydant et inhibiteur de tyrosine kinases, Fig. 3I)

Ces composés, issus d'un criblage de molécules naturelles, caractérisés à l'aide de la polarisation de fluorescence et RMN, se lient à la poche hydrophobe de Bcl-xL, réduisent la croissance des cellules tumorales, induisent l'apoptose *in vitro* de lignées cellulaires tumorales humaines (gossypol dans des cellules surexprimant Bcl-xL, IC50 = 0,3 μ M Bcl-xL/Bad BH3, Purpurogalline IC50 = 2,2 μ M Bcl-xL/Bak BH3) et présentent une activité anti-tumorale chez des souris athymiques portant des xéno-greffes (Kitada *et al.*, 2003). Le gossypol a été testé dans des essais cliniques chez des patients atteints de différentes pathologies. Il présente l'inconvénient majeur d'importants effets secondaires, probablement dus à deux groupements aldéhydes qui réduisent sa stabilité *in vivo*. Des modifications ont été apportées à ce composé, il est devenu moins affiné *in vitro* mais plus efficace *in vivo*.

Un autre dérivé du gossypol, le (-) gossypol vient d'être décrit (Oliver *et al.*, 2004). Cet isomère du gossypol naturel se lie à la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-xL et induit l'apoptose plus efficacement dans des cellules exprimant p53 sauvage que dans des cellules possédant une protéine p53 mutée. Par ailleurs ce composé reste très efficace dans des cellules résistantes au cisplatine. C'est un puissant agent cytotoxique *in vitro* pour des cellules issues de carcinomes de la tête et du cou (HNSCC head and neck squamous cell carcinomas).

Apogossypol (Fig. 3J)

Ce dérivé du gossypol a été découvert après combinaison de diverses approches : la modélisation moléculaire, des études structurales en RMN, des essais de polarisation de fluorescence, des tests cellulaires et de la microscopie confocale permettant de détecter en temps réel des interactions avec Bcl-xL dans des cellules intactes (Becattini *et al.*, 2004). Ce composé se lie à Bcl-

2 et Bcl-xL avec une forte affinité, les inhibe et induit l'apoptose de lignées cellulaires tumorales. Des cellules issues de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique, traitées avec l'apogossypol, sont sensibilisées au cytotoxique F-ara-A.

Polyphenols du thé

- Catéchines (thé vert)
- Theaflavines (thé noir)

Ces deux molécules se lient à Bcl-xL et présentent un mode d'interaction défini par RMN proche de celui du gossypol (Leone *et al.*, 2003).

En conclusion, la cartographie détaillée des sites de liaison de ces ligands, combinée à l'exploration des relations structure-activité des composés, pourrait permettre la classification de ces inhibiteurs, une meilleure connaissance de la topologie membranaire, de la flexibilité de conformation de ces domaines, de la fonction moléculaire des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et l'amélioration des stratégies pour cibler ces protéines.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Actuellement, il n'est pas certain que des antagonistes de Bcl-2 puissent être capables d'induire l'apoptose de façon efficace dans tous les types de cellules cancéreuses. Si de tels antagonistes agissent en tant que mimétiques du motif BH3, alors l'activation de Bax (et de Bak), par changement de conformation, translocation à la mitochondrie et oligomérisation, doit être une étape nécessaire pour l'initiation de l'apoptose par de telles molécules. Cependant, il a été montré que ces étapes d'activation de Bax ne sont pas suffisantes pour induire l'apoptose dans une lignée de neuroblastome résistante au taxol (Makin *et al.*, 2001). Par ailleurs, la protéine Drp-1 (de la famille des dynamines) normalement impliquée dans la fission mitochondriale, semble jouer un rôle dans l'exécution de l'apoptose. En effet, une forme dominante négative de Drp-1 est capable d'interférer avec l'induction de l'apoptose (Frank *et al.*, 2001). Il est donc probable que des défauts dans les mécanismes de remodelage des mitochondries peuvent affecter l'efficacité des antagonistes de Bcl-2 à induire l'apoptose.

Une autre limitation possible à l'efficacité des antagonistes de Bcl-2 est liée au fait que certaines caspases puissent jouer un rôle essentiel dans l'induction de l'apoptose par de telles molécules. Dans beaucoup de tumeurs humaines, des protéines appelées IAPs (inhibitor-of-apoptosis proteins) réprimant l'activité des caspases sont surexprimées (Imoto *et al.*, 2001 ; Hasegawa *et al.*, 2003 ; Krajewska *et al.*, 2003 ; Deveraux & Reed, 1999 ; Wagenknecht *et al.*, 1999), constituant ainsi un frein à l'efficacité des antagonistes de Bcl-2.

De plus, il semble difficile de prédire l'ensemble des effets biologiques des antagonistes de Bcl-2, notamment en dehors des effets apoptotiques. En effet, la poche hydrophobe des protéines Bcl-2/Bcl-xL est capable

d'interagir avec des protéines impliquées dans des fonctions cellulaires différentes de l'apoptose.

Récemment, il a été montré que la protéine SphK2 (sphingosine kinase 2), impliquée dans le métabolisme des sphingolipides, interagit avec Bcl-xL *via* un motif de type BH3 (Liu *et al.*, 2003), il est par conséquent envisageable que l'inhibition de cette interaction par des antagonistes de Bcl-xL puisse avoir des effets inattendus, en particulier sur le métabolisme des sphingolipides.

Par ailleurs, la protéine Beclin est également capable de se lier à Bcl-2 et Bcl-xL, et des expériences de mutagenèse dirigée indiquent que cette interaction a lieu au niveau de la poche hydrophobe de Bcl-2/Bcl-xL. Des mutations dans les domaines BH1 de Bcl-2 et Bcl-xL qui bloquent l'interaction avec le motif BH3 de Bax inhibent également la liaison avec Beclin (Liang *et al.*, 1998). Des antagonistes occupant cette poche hydrophobe sont donc potentiellement capables d'inhiber l'interaction entre Beclin et Bcl-2/Bcl-xL. La protéine Beclin est un régulateur d'un processus pouvant conduire à un type de mort cellulaire programmée (de type II) différent de l'apoptose appelé autophagie (Liang *et al.*, 1999). L'autophagie est un processus cellulaire induit par un stress (notamment la privation en élément nutritif) qui se caractérise par la formation de vésicules membranaires, contenant des organites endommagés et des protéines, appelées autophagosomes. Après fusion avec les lysosomes, le contenu de ces autophagosomes est dégradé (Edinger & Thompson, 2003). La protéine Beclin est impliquée dans les étapes précoces de la réponse autophagique. De plus, le gène *beclin 1* fait partie des gènes suppresseurs de tumeurs à haploinsuffisance (Qu *et al.*, 2003 ; Yue *et al.*, 2003). Il est à noter qu'à ce jour, le rôle de l'interaction Beclin/Bcl-2 dans la fonction autophagique ou suppresseur de tumeur de Beclin n'a pas été établi. Cependant, une récente étude a montré que des cellules où l'apoptose est réprimée soit par la perte des protéines Bax et Bak soit par la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-xL meurent par un processus autophagique en réponse à des agents cytotoxiques (étoposide et staurosporine), cette mort autophagique étant dépendante de la protéine Beclin (Shimizu *et al.*, 2004). Cette étude indique donc que les protéines de la famille Bcl-2 peuvent jouer un rôle dans la régulation de la mort autophagique. Il apparaît donc important d'étudier les effets que pourraient avoir des antagonistes de Bcl-2/Bcl-xL sur ce type de mort cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams J. M. & Cory S., The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 1998, 281, 1322-1326.
- Akao Y., Otsuki Y., Kataoka S., Ito Y., Tsujimoto Y., Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, 1994, 54, 2468-2471.
- Baell J. B. & Huang D. C., Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 2002, 64, 851-863.

- Beccattini B., Kitada S., Leone M., Monosov E., Chandler S., Zhai D., Kipps T. J., Reed J. C. & Pellicchia M., Rational design and real time, in-cell detection of the proapoptotic activity of a novel compound targeting Bcl-X(L). *Chem. Biol.*, 2004, *11*, 389-395.
- Blagosklonny M. V., Schulte T., Nguyen P., Trepel J. & Neckers L. M., Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res.*, 1996, *56*, 1851-1854.
- Boise L. H. & Thompson C. B., Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94*, 3759-3764.
- Boyd J. M., Gallo G. J., Elangovan B., Houghton A. B., Malstrom S., Avery B. J., Ebb R. G., Subramanian T., Chittenden T., Lutz R. J. *et al.*, Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*, 1995, *11*, 1921-1928.
- Chan S. L., Lee M. C., Tan K. O., Yang L. K., Lee A. S., Flotow H., Fu N. Y., Butler M. S., Soejarto D. D., Buss A. D. & Yu V. C. Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *J. Biol. Chem.*, 2003, *278*, 20453-20456.
- Chang B. S., Minn A. J., Muchmore S. W., Fesik S. W. & Thompson C. B., Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J.*, 1997, *16*, 968-977.
- Chen G., Ray R., Dubik D., Shi L., Cizeau J., Bleackley R. C., Saxena S., Gietz R. D. & Greenberg A. H. The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1997, *186*, 1975-1983.
- Chen Y. N., Sharma S. K., Ramsey T. M., Jiang L., Martin M. S., Baker K., Adams P. D., Bair K. W. & Kaelin W. G., Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 4325-4329.
- Chen J., Freeman A., Liu J., Dai Q. & Lee R. M., The apoptotic effect of HA14-1, a Bcl-2-interacting small molecular compound, requires Bax translocation and is enhanced by PK1195. *Mol. Cancer Ther.*, 2002, *1*, 961-967.
- Cheng E. H., Wei M. C., Weiler S., Flavell R. A., Mak T. W., Lindsten T. & Korsmeyer S. J., Bcl-2, Bclx(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.*, 2001, *8*, 705-711.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A. B., Ebb R. G., Gallo G. J., Elangovan B., Chinnadurai G. & Lutz R. J., A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.*, 1995, *14*, 5589-5596.
- Choi S. S., Park J. C., Yun J. W., Sung Y. C., Hong S. J. & Shin H. S., A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, 1995, *11*, 1693-1698.
- Cory S. & Adams J. M., The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, *2*, 647-656.
- Deckwerth T. L., Elliott J. L., Knudson C. M., Johnson E. M. Jr, Snider W. D. & Korsmeyer S. J., Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*, 1996, *17*, 401-411.
- Degterev A., Lugovskoy A., Cardone M., Mulley B., Wagner G., Mitchison T. & Yuan J., Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, *3*, 173-182.
- Derenne S., Monia B., Dean N. M., Taylor J. K., Rapp M. J., Harousseau J. L., Bataille R. & Amiot M., Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, 2002, *100*, 194-199.
- Deveraux Q. L. & Reed J. C., IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 1999, *13*, 239-252.
- Edinger A. L. & Thompson C. B., Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003, *4*, 422-424.
- Enyedy I. J., Ling Y., Nacro K., Tomita Y., Wu X., Cao Y., Guo R., Li B., Zhu X., Ruang Y. *et al.*, Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening. *J. Med. Chem.*, 2001, *44*, 4313-4324.
- Felsher D. W. & Bishop J. M., Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 3940-3944.
- Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E. S., Leitner W. W., Robert E. G., Catez F., Smith C. L. & Youle R. J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell.*, 2001, *1*, 515-525.
- Gibson L., Rolmgreen S. P., Ruang D. C., Bernard A., Copeland N. G., Jenkins N. A., Sutherland G. R., Baker E., Adams J. M. & Cory S., bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, 1996, *13*, 665-675.
- Gu J., Kagawa S., Takakura M., Kyo S., Inoue M., Roth J. A. & Fang B., Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.*, 2000, *60*, 5359-5364.
- Haldar S., Jena N. & Croce C. M., Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, *92*, 4507-4511.
- Han J., Sabbatini P. & White E., Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, *16*, 5857-5864.
- Hanahan D. & Weinberg R. A., The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, *100*, 57-70.
- Hasegawa T., Suzuki K., Sakamoto C., Ohta K., Nishiki S., Hino M., Tatsumi N. & Kitagawa S., Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia. *Blood*, 2003, *101*, 1164-1171.
- Hegde R., Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Ainemri T. & Ainemri E. S., Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 7783-7786.
- Hsu S. Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M. & Hsueh A. J. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94*, 12401-12406.
- Hsu Y. T., Wolter K. G. & Youle R. J., Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94*, 3668-3672.
- Huettner C. S., Zhang P., Van Etten R. A. & Tenen D. G., Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat. Genet.*, 2000, *24*, 57-60.
- Imoto I., Yang Z. Q., Pimkhaokham A., Tsuda H., Shimada Y., Imamura M., Ohki M. & Inazawa J., Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 2001, *61*, 6629-6634.
- Inohara N., Ding L., Chen S. & Nunez G., Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-xL. *EMBO J.*, 1997, *16*, 1686-1694.
- Inohara N., Ekhterae D., Garcia J., Carrio R., Merino J., Merry A., Chen S. & Nunez G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.*, 1998a, *273*, 8705-8710.
- Inohara N., Gourley T. S., Carrio R., Muniz M., Merino J., Garcia J., Koseki T., Hu Y., Chen S. & Nunez G. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J. Biol. Chem.*, 1998b, *273*, 32479-32486.

- Jiang M. & Milner J., Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes & Development*, 2003, 17, 832-837.
- Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Brown L., Korsmeyer S. & Evan G., c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, 6158-6169.
- Kagawa S., Pearson S. A., Ji L., Xu K., McDonnell T. J., Swisher S. G., Roth J. A. & Fang B., A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene *bax*. *Gene Ther.*, 2000, 7, 75-79.
- Kamada S., Shimono A., Shinto Y., Tsujimura T., Takahashi T., Noda T., Kitamura Y., Kondoh H. & Tsujimoto Y., 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.*, 1995, 55, 354-359.
- Kelekar A. & Thompson C., Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell. Biol.*, 1998, 8, 324-330.
- Kelekar A., Chang B. S., Harlan J. E., Fesik S. W., Thompson C. B., Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 7040-7046.
- Kiefer M. C., Brauer M. J., Powers V. C., Wu J. J., Umansky S. R., Tomei L. D. & Barr P. J., Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 1995, 374, 736-739.
- Kim K. M., Giedt C. D., Basanez G., O'Neill J. W., Hill J. J., Han Y. H., Tzung S. P., Zimmerberg J., Hockenbery D. M. & Zhang K. Y., Biophysical characterization of recombinant human Bcl-2 and its interactions with an inhibitory ligand, antimycin A. *Biochemistry*, 2001, 40, 4911-4922.
- Kitada S., Leone M., Sareth S., Zhai D., Reed J.C. & Pellecchia M., Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia2 proteins. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 4259-4264.
- Knudson C. M., Tung K. S., Tourtellotte W. G., Brown G. A. & Korsmeyer S. J., Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 1995, 270, 96-99.
- Kozopas K. M., Yang T., Buchan H. L., Zhou P. & Craig R. W., MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 3516-3520.
- Krajewska M., Krajewski S., Banares S., Huang X., Turner B., Bubendorf L., Kallioniemi O. P., Shabaik A., Vitiello A., Peehl D., Gao G. J. & Reed J. C., Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9, 4914-4925.
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W. & Reed J. C., Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondria membranes. *Cancer Res.*, 1993, 53, 4701-4714.
- Kutzki O., Park H. S., Emst J. T., Omer B. P., Yin H. & Hamilton A. D., Development of a potent Bcl-x(L) antagonist based on alpha-helix mimicry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 11838-11839.
- Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J. E., Bonzon C., Sullivan B. A., Green D. R. & Newmeyer D. D., BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell.*, 2005, 17, 525-535.
- Leone M., Zhai D., Sareth S., Kitada S., Reed J.C. & Pellecchia M., Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.*, 2003, 63, 8118-8121.
- Letai A., Bassik M. C., Walensky L. D., Sorcinelli M. D., Weiler S. & Korsmeyer S. J., Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, 2, 183-192.
- Letai A., Sorcinelli M. D., Beard C. & Korsmeyer S. J. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell*, 2004, 6, 241-249.
- Liang X. H., Kleeman L. K., Jiang H. H., Gordon G., Goldman J. E., Berry G., Herman B. & Levine B., Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.*, 1998, 72, 8586-8596.
- Liang X. H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H. & Levine B., Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999, 402, 672-676.
- Lickliter J. D., Wood N. J., Johnson L., McHugh G., Tan J., Wood F., Cox J. & Wickham N. W., HA14-1 selectively induces apoptosis in Hcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia*, 2003, 17, 2074-2080.
- Lin E. Y., Orlofsky A., Herger MS. & Prystowsky M. H., Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J. Immunol.*, 1993, 151, 1979-1988.
- Liu H., Toman R. E., Goparaju S. K., Maceyka M., Nava V. E., Sankala H., Payne S. G., Hektas M., Ishii I., Chun J., Milshtien S. & Spiegel S., Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 40330-40336.
- Lugovskoy A. A., Degterev A. J., Fahmy A. F., Zhou P., Gross J. D., Yuan J. & Wagner G., A novel approach for characterizing protein ligand complexes: molecular basis for specificity of small molecule Hcl-2 inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 1234-1240.
- Makin G. W., Corfe H. M., Griffiths G. J., Thistlethwaite A., Hickman J. A. & Dive C., Damage-induced Hax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Hax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J.* 2001, 20, 6306-6315.
- Martinou J. C., Desagher S. & Antonsson H., Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell. Biol.*, 2000, 2, E41-E43.
- Maudrell K., Antonsson H., Magnenat E., Camps M., Muda M., Chabert C., Gillieron C., Hoschert U., Vial-Knecht E., Martinou J. C. & Arkinstall S., Hcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Racl. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 25238-25242.
- Moreau C., Cartron P. F., Hunt A., Meflah K., Green D. R., Evan G., Vallette F. M. & Juin P., Minimal HH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 19426-19435.
- Motoyama N., Wang F., Roth K. A., Sawa H., Nakayama K., Nakayama K., Negishi J., Senju S., Zhang Q., Fujii S. *et al.*, Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Hcl-x-deficient mice. *Science*, 1995, 267, 1506-1510.
- Nakayama K., Nakayama K., Negishi J., Kuida K., Sawa H. & Loh D. Y., Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3700-3704.
- Nguyen M., Millar D. G., Yong V. W., Korsmeyer S. J. & Shore G. C. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 25265-25268.
- Oakes S. A., Opferman I. T., Pozzan T., Korsmeyer S. J. & Scorrano L., Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 66, 1335-1340.

- O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L. A., Hausmann G., Adams J. M., Cory S. & Huang D. C., Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.*, 1998, 17, 384-395.
- Oliver C. L., Bauer J. A., Wolter K. G., Ubell M. L., Narayan A., O'Connell K. M., Fisher S. G., Wang S., Wu X., Li M., Carey T. E. & Bradford C. R., *In vitro* effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 7757-7763.
- Oltvai Z. N., Milliman C. L. & Korsmeyer S. J., Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, 74, 609-619.
- Oltvai Z. N. & Korsmeyer S. J., Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 1994, 79, 189-192.
- O'Neill J. W. & Hockenbery D. M., Bcl-2-related proteins as drug targets. *Curr. Med Chem.*, 2003, 10, 1553-1562.
- Pelengaris S., Littlewood T., Khan M., Elia G. & Evan G., Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol. Cell.*, 1999, 3, 565-577.
- Pelengaris S., Khan M. & Evan G. I., Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, 2002, 109, 321-334.
- Petros A. M., Medek A., Nettesheim D. G., Kim D. H., Yoon H. S., Swift K., Matayoshi E. D., Oltersdorf T. & Fesik S. W., Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 3012-3017.
- Print C. G., Loveland K. L., Gibson L., Meehan T., Stylianou A., Wreford N., de Kretser D., Metcalf D., Kontgen F., Adams J. M. & Cory S., Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 12424-12431.
- Qu X., Yu I., Bhagat G., Furuya N., Hibshoosh H., Troxel A., Rosen I., Eskelinen E. L., Mizushima N., Ohsumi Y., Cattoretti G. & Levine B., Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.*, 2003, 112, 1809-1820.
- Real P. J., Cao Y., Wang R., Nikolovska-Coleska Z., Sanz-Ortiz I., Wang S. & Fernandez-Luna I. L., Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res.*, 2004, 64, 7947-7953.
- Rutledge S. E., Chin I. W., Schepartz A., A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6, 479-485.
- Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows R. P., Harlan J. E., Eberstadt M., Yoon H. S., Shuker S. B., Chang B. S., Minn A. J. *et al.*, Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 1997, 275, 983-986.
- Schmitt C. A. & Lowe S. W., Apoptosis and therapy. *J. Pathol.*, 1999, 187, 127-137.
- Schmitt C. A., Rosenthal C. T. & Lowe S. W., Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat. Med.*, 2000, 6, 1029-1035.
- Scorrano L., Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell. Death Differ.*, 2003, 10, 1287-1289.
- Sedlak T. W., Oltvai Z. N., Yang E., Wang K., Boise L. H., Thompson C. B. & Korsmeyer S. J., Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 7834-7838.
- Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B. & Tsujimoto Y., Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell. Biol.*, 2004, 6, 1221-1228.
- Simonen M., Keller H. & Heim J., 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.*, 1997, 249, 85-91.
- Srivastava R. K., Srivastava A. R., Korsmeyer S. J., Nesterova M., Cho-Chung Y. S. & Longo D. L., Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 3509-3517.
- Strasser A., Hans A. W., Jacks T. & Cory S., DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells *via* p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, 1994, 79, 329-339.
- Taylor J. K., Zhang Q. Q., Wyatt J. R. & Dean N. M., Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 1097-1100.
- Tsujimoto Y., Finger L. R., Yunis J., Nowell P. C., Croce C. M., Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 1984, 226, 1097-1099.
- Tsuruta Y., Mandai M., Konishi I., Kuroda H., Kusakari T., Yura Y., Hamid A. A., Tamura I., Kariya M. & Fujii S., Combination effect of adenovirus-mediated pro-apoptotic bax gene transfer with cisplatin or paclitaxel treatment in ovarian cancer cell lines. *Eur. J. Cancer*, 2001, 37, 531-541.
- Tzung S. P., Kim K. M., Basanez G., Giedt C. D., Simon J., Zimmerberg J., Zhang K. Y., Hockenbery D. M., Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3, 183-191.
- Vaux D. L., Cory S. & Adams J. M., Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with cmyc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988, 335, 440-442.
- Weis D. I., Sorenson C. M., Shutter I. R. & Korsmeyer S. J., Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 1993, 75, 229-240.
- Wagenknecht B., Glaser T., Naumann U., Kugler S., Isenmann S., Bahr M., Komeluk R., Liston P. & Weller M., Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell Death Differ.*, 1999, 6, 370-376.
- Walensky L. D., Kung A. L., Escher I., Malia T. I., Barbuto S., Wright R. D., Wagner G., Verdine G. L. & Korsmeyer S. J., Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, 2004, 305, 1466-1470.
- Wang H. G., Miyashita T., Takayama S., Sato T., Torigoe T., Krajewski S., Tanaka S., Hovey L. 3rd, Troppmair I., Rapp U. R. *et al.*, Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene*, 1994, 9, 2751-2756.
- Wang H. G., Rapp U. R. & Reed J. C., Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 1996, 87, 629-638.
- Wang K., Yin X. M., Chao D. T., Milliman C. L. & Korsmeyer S. J., Bill: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.*, 1996, 10, 2859-2869.
- Wang J. L., Liu D., Zhang Z. I., Shan S., Han X., Srinivasula S. M., Croce C. M., Alnemri E. S. & Huang Z., Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000a, 97, 7124-7129.
- Wang J. L., Zhang Z. I., Choksi S., Shan S., Lu Z., Croce C. M., Alnemri E. S., Komgold R. & Huang Z., Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res.*, 2000b, 60, 1498-1502.
- Waters J. S., Webb A., Cunningham D., Clarke P. A., Raynaud F., di Stefano F. & Cotter F. E., Related Articles, Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 2000, 18, 1812-1823.

- Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K.A., MacGregor G. R., Thompson C. B. & Korsmeyer S. J., Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001, 292, 727-730.
- Wolter K. G., Hsu Y. T., Smith C. L., Nechushtan A., Xi X. G. & Youle R. J., Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 1997, 139, 1281-1292.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B. & Korsmeyer S. J., Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, 80, 285-291.
- Yang E. & Korsmeyer S. J., Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 1996, 88, 386-401.
- Yasuda M., Theodorakis P., Subramanian T. & Chinnadurai G., Adenovirus E1B-19K/Bcl-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 12415-12421.
- Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A. J. & Heintz N., Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003, 100, 15077-15082.
- Zangemeister-Wittke U., Leech S. H., Olie R. A., Simoes-Wüst A. P., Gautschi O., Luedke G. H., Natt F., Hane, R., Martin P., Hall J. *et al.*, A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6, 2547-2555.
- Zha H., Aime-Sempe C., Sato T. & Reed J. C., Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 7440-7444.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. & Korsmeyer S. J., Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x(L). *Cell*, 1996, 87, 619-628.
- Zha I., Harada H., Osipov K., Jockel I., Waksman G. & Korsmeyer S. J., BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-xL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 24101-24104.
- Zhou P., Qian L., Kozopas K. M. & Craig R. W., Bcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*, 1997, 89, 630-643.
- Zong W. X., Lindsten T., Ross A. I., MacGregor G. R. & Thompson C. B., BH3-only proteins that bind prosurvival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.*, 2001, 15, 1481-1486
-