

## 종양억제유전자 p53 결손 인체간암세포에서 Pectenotoxin-2에 의한 Apoptosis 유도

신동역<sup>1,2</sup> · 김기영<sup>3</sup> · 최병태<sup>4</sup> · 강호성<sup>2</sup> · 정지형<sup>5</sup> · 최영현<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 <sup>6</sup>대학원 바이오물질제어학과, 부산대학교 <sup>2</sup>자연과학대학 분자생물학과, <sup>4</sup>한의학전문대학원 해부학교실 및 <sup>5</sup>약학대학 약학과, <sup>3</sup>제주대학교 해양과학대학 해양과학부

Received August 6, 2007 / Accepted August 30, 2007

### Apoptotic Cell Death by Pectenotoxin-2 in p53-Deficient Human Hepatocellular Carcinoma Cells.

Dong Yeok Shin<sup>1,2</sup>, Gi Young Kim<sup>3</sup>, Byung Tae Choi<sup>4</sup>, Ho Sung Kang<sup>2</sup>, Jee H. Jung<sup>5</sup> and Yung Hyun Choi<sup>1,6\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and <sup>6</sup>Department of Biomaterial Control, Dongeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea, <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, <sup>4</sup>Department of Anatomy, School of Oriental Medicine, <sup>5</sup>Department of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, <sup>3</sup>Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju Special Self-Governing Province 690-756, Korea. - Through the screening of marine natural compounds that inhibit cancer cell proliferation, we previously reported that pectenotoxin-2 (PTX-2) isolated from marine sponges exhibits selective cytotoxicity against several cell lines in p53-deficient tumor cells compared to those with functional p53. However, the molecular mechanisms of its anti-proliferative action on malignant cell growth are not completely known. To further explore the mechanisms of its anti-cancer activity and to test whether the status of p53 in liver cancer cells correlates with their chemosensitivities to PTX-2, we used two well-known hepatocarcinoma cell lines, p53-deficient Hep3B and p53-wild type HepG2. We have demonstrated that PTX-2 markedly inhibits Hep3B cell growth and induces apoptosis whereas HepG2 cells are much more resistant to PTX-2 suggesting that PTX-2 seems to act by p53-independent cytotoxic mechanism. The apoptosis induced by PTX-2 in Hep3B cells was associated with the modulation of DNA fragmentation factor (DFF) family proteins, up-regulation of pro-apoptotic Bcl-2 family members such as Bax and Bcl-xS and activation of caspases (caspase-3, -8 and -9). Blockade of the caspase-3 activity by caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, prevented the PTX-2-induced growth inhibition in Hep3B cells. Moreover, treatment with PTX-2 also induced phosphorylation of AKT and extracellular-signal regulating kinase (ERK), but not c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MARK). Specific inhibitors of PI3K inhibitor (LY294002) and ERK1/2 inhibitor (PD98059) significantly blocks PTX-2-induced-anti-proliferative effects, whereas a JNK inhibitor (SP600125) and a p38 MAPK inhibitor (SB203580) have no significant effects demonstrating that the pro-apoptotic effect of PTX-2 mediated through activation of AKT and ERK signal pathway in Hep3B cells.

**Key words** – Pectenotoxin-2, apoptosis, p53, hepatocellular carcinoma

## 서 론

종양억제유전자인 p53은 암의 형성 억제에 중요한 역할을 하며, 많은 암세포에서 p53이 돌연변이 또는 결손되어 있다 [4,10]. p53의 세포내 발현 수준은 DNA damage, ionizing radiation, UV, hypoxia, 성장인자 제거, 종양유전자의 활성화, 세포독성 물질에의 노출 등에 의하여 대부분 증가되어진다 [4,9]. 세포증식 억제 측면에서 p53에 의해 조절받는 대표적인 유전자가 세포주기 억제인자인 cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1)과 pro-apoptotic Bax이다 [8,9,14, 21]. p53에 의한 apoptosis 활성화에 대한 기전은 아직까지 정확하지 않지만 p53의 활성화가 Bax의 발현을 유도하여 미

토콘드리아 막의 교란을 증가시키는 것으로 알려져 있다 [14,21]. 따라서 정상적인 p53을 가지지 않는 암세포의 apoptosis를 유도하는 약물의 발굴은 항암제 개발에서 매우 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다.

본 연구에서는 항암활성이 높은 해양생물 유래 천연물 발굴의 일환으로 해면동물(*Poecillastra* sp. 및 *Jaspis* sp.)에서 분리된 pectenotoxin-2 (PTX-2)가 정상적인 p53이 결손된 인체간암세포에서 apoptosis를 선택적으로 유도하였음을 보고하고자 한다. 이러한 연구를 시도한 이유는 선행연구에서 PTX-2는 인체암세포에 따라 세포독성의 범주가 매우 다양하였으며 [12]. 특히 p53이 결손된 암세포에서 미세소관의 형성을 억제함으로써 세포주기 G2/M arrest를 유발한다고 보고된 바 있으나 [3], apoptosis 유도에 관한 보다 구체적인 자료가 인체간암세포에서 제시된 바 없기 때문이다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

재료 및 방법

세포배양, PTX-2의 처리 및 MTT assay

p53이 결손된 Hep3B 및 정상 p53을 가진 HepG2는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였으며, 100 units/ml penicillin/streptomycin 및 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD)가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. PTX-2는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 1 mg/ml로 stock solution을 만들어 배지에 적정농도로 희석하여 처리하였다. 세포생존도의 측정은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] assay를 이용하여 조사하였다.

Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

정상 및 PTX-2가 함유된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT 프로그램으로 분석하였다.

단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

정상 및 PTX-2가 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

In vitro caspase 활성 측정

Caspase-3, -8 및 -9의 in vitro 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 CLONTECH Lab. (Palo Alto, CA) 및 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였으며, 제시된 방법에 준하여 활성의 증감 여부를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 PTX-2가 처리된 배지에서 배양된 세포에서 각각 20 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

PTX-2에 의한 p53 결손 Hep3B 간암세포의 증식 억제 및 apoptosis 유도

인체간암세포의 증식 억제에 미치는 PTX-2의 영향과 p53과의 상관성을 조사하기 위하여 정상 p53 유전자를 가지는 HepG2 및 p53 결손 Hep3B 세포주를 대상으로 [15], 적정 농도의 PTX-2를 48시간 동안 처리 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 Hep3B 세포는 PTX-2 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 매우 억제되었으며, 특히 4.0 ng/ml의 농도에서 증식억제효과는 약 80% 정도를 보여주었다. 그러나 동일조건에서 HepG2 세포에서의 증식 억제 효과는 상대적으로 거의 나타나지 않았다. 이러한 두 세포주에 따른 차이점이 apoptosis 유발의 정도와 상관성이 있는지를 flow cytometer를 이용하여 조사한 결과, HepG2 세포에서 apoptosis 유발군인 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도는 4.0 ng/ml PTX-2 처리군에서 10% 정도로 나타났으나, Hep3B 세포의 경우 2.0 ng/ml 및 4.0 ng/ml 처리군에서 각

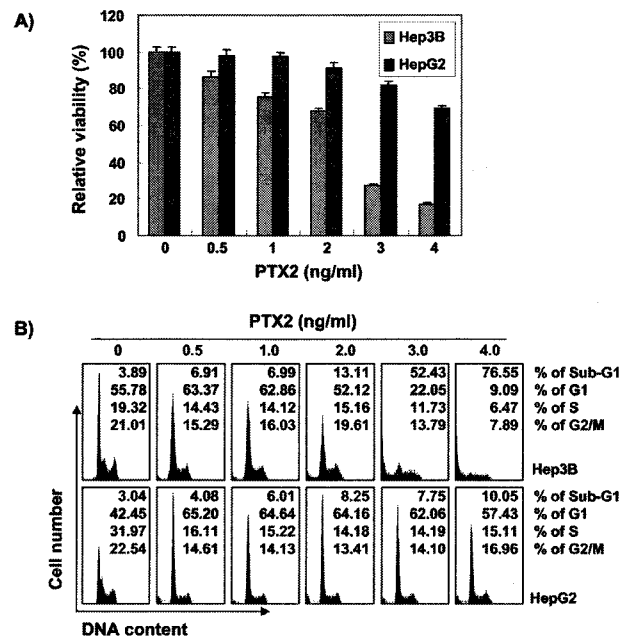


Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by pectenotoxin-2 (PTX-2) in p53-deficient hepatocarcinoma Hep3B cells. HepG2 and Hep3B cells were seeded at an initial density of 2.5 x 10<sup>5</sup> cells per 60 mm plate, incubated for 24 hr and treated with various concentrations of TX-2 for 48 hr. (A) Cell viability was measured via a MTT assay. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The results are expressed as the mean of two independent experiments.

각 13% 및 76% 정도로 관찰되었다. 이상의 결과는 정상 p53 유전자를 가지는 HepG2 세포에 비하여 p53 유전자가 결손된 Hep3B 세포에서 PTX-2에 대한 감수성이 매우 높으며, 이는 강력한 apoptosis 유발 효과와 연관성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 Chae et al.의 보고와는[3] 달리 PTX-2에 의한 증식 억제 효과는 세포주기 특이적 교란은 나타나지 않았다.

**Hep3B 세포의 apoptosis 조절 유전자들의 발현 및 활성화에 미치는 PTX-2의 영향**

Fig. 1의 결과에서 PTX-2는 HepG2 세포에 비하여 Hep3B 세포에서 apoptosis 유발 효과가 매우 높게 나타났으므로, PTX-2에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 유발에 미치는 몇 가지 중요한 apoptosis 조절인자들의 발현 변화를 조사하였다. Apoptosis에서 중요한 현상 중 하나가 염색질 응축을 야기할 수 있는 DNA의 단편화 유발인데 여기에 관여하는 중요한 인자가 caspase-activated DNase인 DFF40/CAD와 inhibitor of caspase-activated DNase인 DFF45/ICAD로 구성되어 있는 DNA fragmentation factor (DFF) family이다[6]. DFF40/CAD와 DFF45/ICAD는 서로 complex를 형성하고 있으며, apoptosis가 유발되면 활성화된 caspase에 의하여 ICAD의 두 군데 Asp 잔기에서 단편화가 일어나면서 활성화되는 것으로 알려져 있다[16]. Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 PTX-2 처리 농도가 증가할수록 DFF40/CAD의 발현이 증가되는 반면, DFF45/ICAD의 경우 단편화가 유도되었음을 알 수 있었다. 즉 PTX-2에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 유발은 caspase의

활성화와 연관된 DFF family의 발현 변화와 연관성이 있을 것으로 추정되어, caspase 활성화와 연관된 Bcl-2 family, Fas/FasL system 및 caspase의 발현변화/활성화 여부를 순차적으로 조사하였다. Apoptosis 조절에 관여하는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2 family member 중 Bcl-2와 Bcl-xL은 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하고, Bax와 Bcl-xS는 pro-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발과 관계가 있다 [17,18]. 이들 두 유전자군은 세포내 소기관중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성화 조절에 관여한다. 따라서 PTX-2에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 Western blotting으로 조사한 결과 Fig. 2A에 나타난 바와 같이 조사된 Bcl-2 family 중 anti-apoptotic 인자들(Bcl-2 및 Bcl-xL)의 발현은 큰 변화가 없었으나, pro-apoptotic Bax와 Bcl-xS 단백질의 발현은 PTX-2 처리 농도 의존적으로 발현이 매우 증가 되었다.

현재 일반적으로 apoptosis를 유발하는 경로는 크게 mitochondrial pathway와 death receptor pathway 두 가지로 구분하고 있다. Death receptor는 세포사멸의 기능을 갖는 tumor necrosis factor (TNF) 수용체군을 의미하며, 가장 잘 알려진 다섯 종류 중의 하나가 APO-1 또는 CD95 라고도 알려진 Fas에 의한 신호전달계이고 TNF 수용체군에 작용하는 대표적인 ligand 중의 하나가 FasL이다[19,20]. FasL는 type II transmembrane protein으로서 Fas와 결합하여 immune homeostasis에 중요한 역할을 하고 apoptosis를 유발한다.

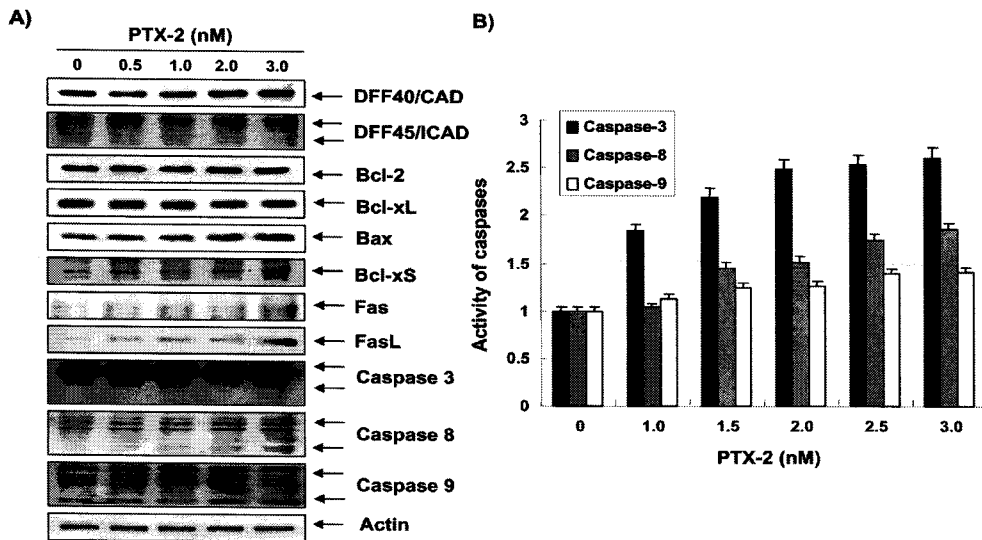


Fig. 2. Effects of PTX-2 on the expression of apoptosis-related proteins and caspases activity in Hep3B cells. (A) The cells were incubated with PTX-2 for 48 hr, lysed and equal amount of proteins was then separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and detected via ECL. To confirm equal loading, the blots were stripped of the bound antibodies and reprobed with the anti-actin antibody. (B) After treatment with PTX-2 for 48 hr, the cell lysates were assayed for *in vitro* caspase-3, -8 and -9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA, respectively, as substrates. The released fluorescent products were measured. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

PTX-2에 의한 apoptosis 유발에 이와 같은 death receptor가 관여하는지의 여부를 조사한 결과, Fig 2A에 나타난 바와 같이 PTX-2의 농도 의존적으로 Fas 및 FasL의 발현은 매우 증가하는 경향성을 보여, PTX-2에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 유발에 Fas/FasL system의 관여 가능성을 보여주었다.

한편 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 caspase는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성형태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의하여 활성화 되고, 활성화된 caspase는 세포 내 다양한 표적 단백질의 단편화를 유발하며 apoptosis를 유도한다[19]. 따라서 caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 또 다른 증거가 될 수 있으며 많은 선행 연구 등에서 검증되어 왔다. 본 연구에서 caspase-3, -8 및 -9를 대상으로 PTX-2에 의하여 활성화되는지의 여부를 조사한 결과, Fig. 2A에서 볼 수 있듯이 조사된 3가지 caspase 모두 PTX-2 처리농도 의존적으로 비활성형 단백질의 발현이 감소 또는 활성형 단백질의 발현 증가를 보여주었기에 *in vitro* caspase 활성화의 정도를 직접 분석한 결과, Fig. 2B에서 나타난 바와 같이 PTX-2 처리농도 의존적으로 caspase-3, -8 및 -9의 활성이 모두 증가하였음을 확인하였다.

**MAPK 신호전달계에 미치는 PTX-2의 영향**

세포 신호전달계의 핵심적인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family는 크게 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK), p38 kinase 로 구성되어 있는데, ERK1/2는 세포의 성장이나 분화를 촉진하는 신호전달 과정에 관여하고, JNK 및 p38 kinase는 TNF, interleukin-1 $\beta$  등의 proinflammatory cytokine이나 여러 스트레스 자극의 신호전달 과정에 참여한다. ERK1/2와 JNK 그리고 p38 kinase들은 모두 전사조절인자들을 인산화시켜 여러 유전자들의 발현을 조절할 수 있다 [1,2,7,11,13]. 또한 AKT는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)의 표적으로, inositol phospholipid를 인산화시키는 lipid kinase로써 2차 신호전달물질인 phosphatidyl-3,4,5-triphosphate의 생성을 유도한다. 많은 system에서 PI3K의 활성화로 인한 AKT의 활성화는 세포의 증식, 성장 및 생존을 촉진함이 보고된 바 있다[5]. 따라서 이러한 신호전달계에 미치는 PTX-2의 영향 및 apoptosis 조절과의 연계성을 조사한 결과, Fig. 3A에서 볼 수 있듯이 Hep3B 세포에서 AKT 및 ERK1/2가 PTX-2의 처리에 의하여 인산화가 유도되었으나,

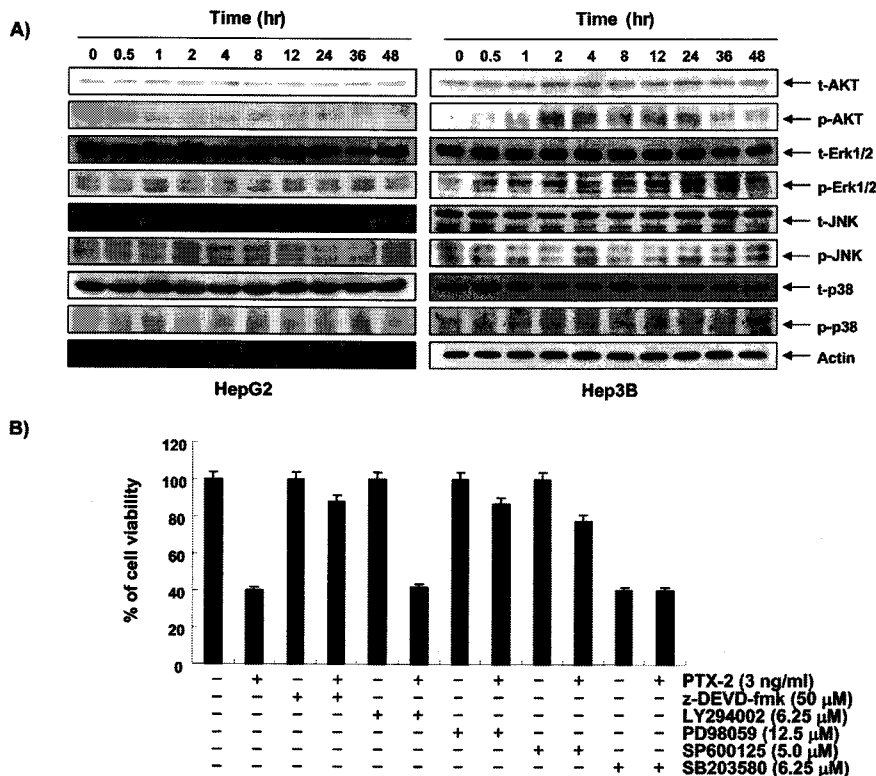


Fig. 3. Roles of MAPK signaling pathway on the PTX-2-induced anti-proliferative effects in hepatocarcinoma cells. (A) The cells were treated with 3.0 ng/ml PTX-2 for the indicated amounts of time. An equal amount of cell lysates was resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with specific antibodies. Actin was used as an internal control. (B) A caspase-3 inhibitor (z-DEVD-fmk), a PI3K inhibitor (LY294002), an ERK1/2 inhibitor (PD98059), a JNK inhibitor (SP600125) and/or a p38 MAPK inhibitor (SB203580) were used for pretreatment for 1 hr before treatment with 3.0 ng/ml of PTX-2 for 48 hr. Cell viability was measured via MTT assay. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

JNK 및 p38의 활성화에는 큰 영향이 없었으며, HepG2 세포에서는 조사된 모든 유전자들의 활성화는 관찰되지 않았다. 또한 Hep3B 세포에서 PTX-2에 의한 세포증식 억제에 미치는 MAPK 특이적 inhibitor와 caspase-3 inhibitor의 영향을 조사한 결과(Fig. 3B), caspase-3 inhibitor (z-DEVD-fmk), PI3K inhibitor (LY294002) 및 ERK1/2 inhibitor (PD98059)의 선처리에 의하여 PTX-2에 의한 증식억제를 보호할 수 있는 효과를 보여주었다. 이는 Hep3B 세포에서 PTX-2에 의한 apoptosis 유발에는 caspase-3, AKT 및 ERK1/2 등이 중요하게 관여하고 있음을 보여주는 결과이다.

## 요 약

해양생물 유래 항암활성을 가지는 천연물의 탐색과정에서 해면동물에서 유래된 PTX-2는 p53 결손 암세포에서 세포독성 효과가 높은 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 인체 간암세포 모델을 이용하여 PTX-2의 효능을 조사한 결과는 p53 결손 Hep3B 세포에서 p53 정상 HepG2에 비하여 항암활성이 매우 높았으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 확인하였다. PTX-2에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 유발은 DFF family의 발현 변화, pro-apoptotic Bax 및 Bcl-xS 단백질의 발현 증가, caspases (-3, -8 및 -9)의 활성화 등이 관여함을 알 수 있었다. PTX-2는 또한 Hep3B 세포에서 AKT 및 ERK1/2의 활성화를 유도하였으며, caspase-3, AKT 및 ERK1/2의 특이적 저해제에 의하여 PTX-2에 의한 세포증식 억제 효능이 유의적으로 감소되었다. 본 연구는 PTX-2에 의한 Hep3B 세포에서의 apoptosis 유도에 AKT 및 ERK1/2 신호 전달 경로가 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 결과이다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스연구단 연구비 지원(과제관리번호 M2007-11)에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Baeuerle, P. A. and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-151.
- Baldwin, A. 1996. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-658.
- Chae, H. D., T. S. Choi, B. M. Kim, J. H. Jung, Y. J. Bang and D. Y. Shin. 2005. Oocyte-based screening of cytotoxicity inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors. *Oncogene* **24**, 4813-4819.
- Coutts, A. S and L. A. Thangue. 2006. The p53 response during DNA damage: impact of transcriptional cofactors. *Biochem. Soc. Symp.* **73**, 181-189.
- Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927.
- Degen, W. G., G. J. Pruijn, J. M Raats and W. J. van Venrooij. 2000. Caspase dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Differ.* **7**, 616-627.
- Derjard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathway defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682-685.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, T. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. E. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
- Giono, L. E and J. J. Manfredi. 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. Cell Physiol.* **209**, 13-20.
- Halaby, M. J. and D. Q. Yang. 2007. p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene* **395**, 1-7.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs and R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811.
- Jung, J. H., C. J. Sim and C. O. Lee. 1995. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* **58**, 1722-1726.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.
- Moll, U. M., S. Wolff, D. Speidel and W. Deppert. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 631-636.
- Murakami, Y., K. Hayashi, S. Hirohashi and T. Sekiya. 1991. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **51**, 5520-5525.
- Nagata, S., H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae and H. Fukuyama. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 108-116.
- Osford, S. M., C. L. Dallman, P. W. Johnson, A. Ganesan and G. Packham. 2004. Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1031-1039.
- Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-499.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.
- Sheikh, M. S. and Y. Huang. 2004. Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets* **4**, 97-104.
- Zinkel, S., A. Gross and E. Yang. 2006. Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* **13**, 1351-1359.