

Cytochrome c 단백질과 세포자멸사: 생쥐 3T3 섬유모세포내 Cytochrome c 단백질의 미세주입에 의한 세포자멸사 유발에 대한 연구

이민섭 · 강구

강원대학교 의과대학 병리학교실

A Study of Apoptosis Induced by Microinjection of Cytochrome c Protein into Mouse 3T3 Fibroblast

Min Sup Lee and Gu Kang

Department of Pathology, Kangwon National University College of Medicine, Chunchon, Korea

Background : Microinjectors have been used for cell biology and development, and are useful for the study of cellular morphologic changes with response to the external milieu and intracellularly injected molecules. **Methods :** This study was performed to confirm the apoptotic changes induced by intracytoplasmic microinjection of cytochrome c (5 mg/mL) to mouse 3T3 fibroblasts with and without pretreatment of Ac-DEVD-CHO (100 μ mol/mL), and BSA (bovine serum albumin, 5 mg/mL) as a control, and evaluate the usefulness of microinjection as a method to study apoptosis pathways. **Results :** Mild focal cytoplasmic fragmentation was seen in the cells microinjected with cytochrome c as early as 10 min after the injection. Apoptotic morphology with apoptotic body formation was observed at 60 min after the injection, and then new apoptotic change of the injected cells was not seen. Cytochrome c-injected cells showed about 31% of apoptotic cells of the total injected cells 50-60 min after the injection. BSA-injected cells did not show apoptosis morphology at 50-60 min after the injections. Caspase-3 inhibitor, Ac-DEVD-CHO-treated cells with cytochrome c microinjection exhibited lower apoptosis indices (average apoptosis index; $11.5 \pm 8.6\%$) than non-treated cells of the inhibitor (average apoptosis index; $11.5 \pm 8.6\%$). **Conclusions :** It was observed that intracellular microinjection of cytochromic c induced apoptosis which was inhibited by Ac-DEVD-CHO, although apoptotic cells were so easily detached that further study could not be performed. However it is thought that microinjection should be a method to study apoptosis and signal transduction with the molecular biological techniques currently available.

Key Words : Apoptosis-Caspases-Cytochrome c-Microinjections

접 수 : 2001년 11월 3일
게재승인 : 2002년 1월 25일

책임저자 : 강 구
우 200-701 강원도 춘천시 효자 2동 192-1
강원대학교 의과대학 병리학교실
전화: 033-250-8841
Fax: 033-242-7571
E-mail: guk@cc.kangwon.ac.kr

미세주입술(needle microinjection)은 1900년대 초에 도입된 이래 생물학적 연구에 있어서 하나의 훌륭한 실험기법이 되었으며, 세포소기관, DNA, RNA, 효소, 구조단백, 대사물질, 이온, 그리고 항체 등을 실험관에서 살아 있는 세포에 직접 주입하는 데 이용되고 있다. 이 기법은 인용문헌이 1970년대에 수 개에 불과한 것이 1990년대에는 수 천개에 이른다는 것을 볼 때 그 보편화의 정도를 알 수 있다. 관심있는 유전자를 전달감염시키고 비유전자적 거대분자를 살아있는 세포에 도입하는 소수의 방법중 하나로서 미세주입술은 현재 수많은 살아 있는 세포계를 연구하는 데 통상적으로 사용되고 있다.¹⁻³

세포자멸사는 다양한 내적 및 외적 통제 하에 이루어지고, 고

도로 보존되어 있고 조절되는 세포의 자살이다. 이것은 발생에서부터 성숙과정을 거쳐 생리학적으로 일어나고, 암, 자가면역 및 퇴행성 신경질환, 후천성 면역결핍증후군, 그리고 혈관 질환과 같은 병리학적 상태에서 볼 수 있는 가장 흔한 세포사이다.⁴⁻⁸ 세포자멸사는 세포사 신호, Fas와 같은 TNF 가족 수용체(tumor necrosis factor family receptor), 그리고 granzyme B를 통하여 일어난다.⁹ 세포사 신호는 세포막으로부터 bcl-2 가족의 세포자멸사 촉진 분자인 bid, bax, 그리고 bad를 통하여 사립체에 전달되어 cytochrome c를 유리시키고 Apaf-1-caspase-9의 활성화를 유도할 수 있다. 또한 세포사 신호가 단백질 인산분해효소(protein phosphatase)인 calcineurin에 영향을 주어 14-3-3

단백질과 결합한 인산화 Bad를 탈인산화하여 Bad를 세포질로부터 사립체막으로 전위케 하거나, 사립체막의 AIF (apoptosis-inducing factor)에 영향을 주거나 세포질내의 Bax에 영향을 주어 사립체막의 cytochrome c를 유리시킬 수 있다.¹⁰⁻¹⁷ 세 가지 Apaf-1-3 (apoptotic protease activating factors-1-3)가 정상적으로 성장하는 세포질로부터 무세포계(cell-free system)를 이용하여 정제되었는데 이들 중 Apaf-2는 cytochrome c로 확인되었다. 이것은 사립체가 세포자멸사 중 cytochrome c를 유리한다는 것을 암시해 준다.¹⁸ 반대로 Bcl-2는 이 cytochrome c의 전위를 억제하여 세포질의 caspase 활성화와 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁹

본 연구에서 세포 안에 어떤 물질을 직접 주입하면 그 물질의 기능을 이해하는 데 도움이 될 것이라고 생각하여, 세포자멸사의 기전에서 중요하고 구입하기 쉬운 cytochrome c 단백을 세포 내에 주입하는데 이용하고 caspase-3 억제제인 Ac-DEVD-CHO의 전처리 여부에 따른 세포의 변화를 관찰하여, 미세주입법이 다양한 세포의 기능을 이해하는 데 어떤 도움을 얻을 수 있으며 기술적인 문제점 및 한계는 무엇인지 알아보려고 하였다.

재료와 방법

미세주입을 위한 시약

우혈청 알부민(BSA, bovine serum albumin, Sigma, U.S.A.)을 1× PBS (phosphate buffered saline)에 녹여 5 mg/mL의 농도로 10 mL을 만든 후 1,500 g로 5분간 원심분리를 하고 상층액 1 mL을 취했다. 생쥐 심장 cytochrome c (Sigma, U.S.A.)를 1× PBS로 녹여 5 mg/mL의 농도로 만들었다. Caspase-3 억제제인 Ac-DEVD-CHO (Sigma, U.S.A.)은 10% FBS를 함유한 DMEM에 100 μmol/mL의 농도로 만들었다.

미세주입을 위한 세포 준비

생쥐 3T3 섬유모세포를 penicillin-streptomycin (각각 100 U/mL, 100 μg/mL, GibcoBRL, U.S.A.)을 함유한 DMEM 배양액(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, U.S.A.)에 10% FBS (fetal bovine serum, GibcoBRL, U.S.A.)를 첨가하여 37°C, 95% air, 5% CO₂의 환경 하에서 배양하였다. Petri 접시에서 배양액을 제거한 후 1× PBS로 1회 씻어냈다. 0.05% trypsin 용액(GibcoBRL, U.S.A.)으로 접시에 붙어 있는 세포를 떼어내어 DMEM 용액을 첨가하고 1,300 g에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 다시 DMEM을 첨가하여 세포수가 5-10×10⁴/mL이 되게 하였다. Polylysine으로 코팅된 cover slip에 다이아몬드 펜슬로 표시를

하고 cover slip을 petri 접시에 놓은 후 상기 분리된 세포를 약 30-40 μL를 떨어뜨려 2-4시간 동안 배양기에 넣고 세포가 cover slip에 붙기를 기다렸다. 배양기에서 꺼낸 petri 접시에 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액을 넣었다. 약 12시간에서 24시간이 지난 후 혈청이 없는 DMEM에 2-3시간 배양하였다. 미세주입을 위한 세포군을, cytochrome c만 주입할 군, Ac-DEVD-CHO (100 μmol/mL)로 2시간 동안 배양한 후 cytochrome c를 주입할 군, 그리고 대조군으로 BSA (5 mg/mL)를 주입할 군으로 나누었으며, 각 군마다 10회씩 미세주입을 시행하였다.

미세주입

외경이 1 mm, 내경이 0.78 mm인 유리 모세관(Brossilicate with filament, Sutter instrument Co., U.S.A.)을 puller (PN-30, Narishige, Japan)로 늘여서 그 끝의 내경이 약 0.2-0.4 μm인 유리 주사바늘을 만들었다. Microloader (Eppendorf, Germany)를 이용하여 cytochrome c 및 BSA 용액 1-2 μL를 바늘 끝에 주입하였다(back-filling). 현미경(Olympus IX70, Japan)에 부착된 micromanipulator 및 microinjector (Transjector 5,246, Eppendorf, Germany)를 이용하여 혈청이 없는 DMEM 용액 내에 있는 cover slip에 부착된 생쥐 3T3 섬유모세포의 세포질내에 상기 시약을 주입하였다. 200-400개의 세포에 미세주입을 시행하였으며 상온에서 수십 분에서 수 시간 동안 현미경에 부착된 디지털 카메라(Leica, DC100, Germany)로 사진을 찍었다. 또한 미세주입을 시행하기 시작한 후 50-60분이 지난 후에는 새로이 세포자멸사가 일어난 세포가 거의 관찰되지 않았고, 장시간 관찰 시 이미 고사된 세포가 떨어져 나가 확인하기 곤란하여 미세주입 50-60분 후에 Petri 접시를 배양기에서 꺼내어 주입부위를 촬영하였다(미세주입이 끝난 뒤에 즉시 배양기에 두었음). 세포자멸사의 판정은 Fig. 1에서 보이는 바와 같이 세포질의 분절화와 더불어 세포자멸사체의 형성을 보이는 것을 기준으로 하였다. 세포자멸사 지수는 미세주입이 시행된 세포들로 세포자멸사된 세포수/전체 세포수 × 100으로 하였다. 미세세포내 주입술로 인한 외상으로 갑작스런 세포부종이 발생하고 cover slip에서 떨어져 나간 세포는 세는 것에서 제외되었다. 그러나 세포부종은 있으나 부착되어 있는 세포(소수이기는 하지만 괴사되었거나 괴사될 세포로 추정됨)는 세포자멸사가 일어나지 않은 세포로 간주되었다. 각 군간 세포자멸사 지수의 차이에 대한 통계학적 유의성을 알아보기 위하여 독립표본 T검정을 이용하였다.

결 과

Cytochrome c를 생쥐 3T3 섬유모세포의 세포질내로 주입한

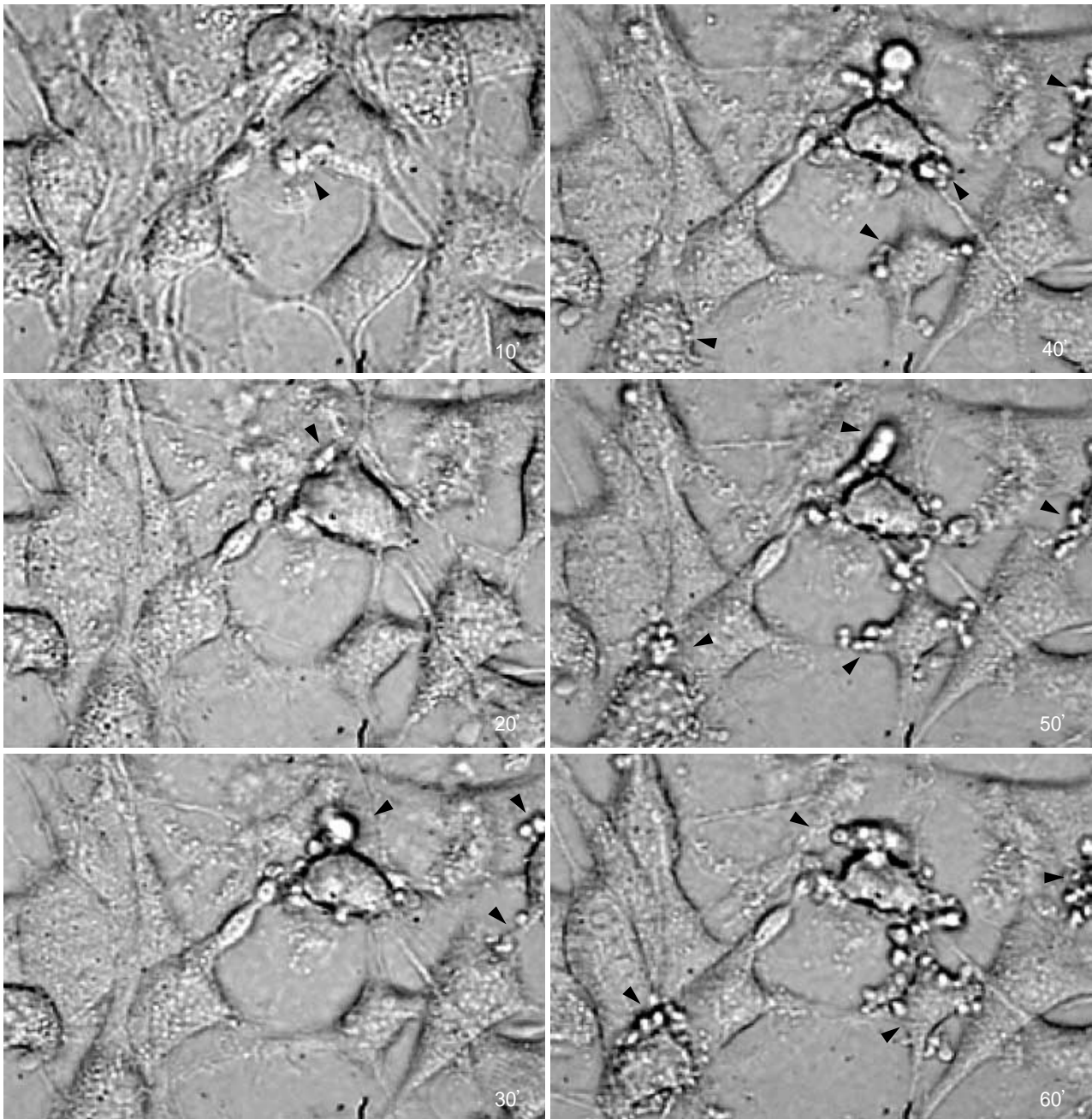


Fig. 1. Serial photographs of the mouse 3T3 fibroblasts 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes after microinjection of cytochrome c. Some cells show continuous cytoplasmic fragmentations (arrow heads) with apoptotic body formation.

결과는 Fig. 1과 같다. Cytochrome c의 세포 내 주입 후 빠르면 10분 안에 경미한 세포질의 분절화(Fig. 1-10')가 관찰되었고, 시간이 지남에 따라 세포질의 분절화가 증가하는 소견을 보였다(Fig. 1-20'-60'). 특히 도립현미경상 같은 시야에서 cytochrome c 주입 후 약 90분간 관찰해 보았을 때 주입 1시간 뒤에는 새로운 세포자멸사의 소견이 거의 관찰되지 않았다. 과량의 주입액이 세포에 들어간 경우에는 바로 세포의 종창이 발

생하고 coverslip에서 떨어져 나가거나 약하게 붙어 있었다(Fig. 2). BSA (bovine serum albumin)을 주입한 세포에서는 일부 세포의 종창 및 괴사가 관찰되었으나 세포자멸사체를 동반한 세포자멸사는 거의 발견되지 않았다.

전체적인 실험 결과는 cytochrome c 주입군에서 $31.5 \pm 6.8\%$ 의 평균 세포자멸사 지수를 나타낸 반면, caspase-3 억제제인 Ac-DEVD-CHO로 처리한 후에 cytochrome c를 주입한 군에

Table 1. Apoptosis indices in microinjection of bovine serum albumin and cytochrome c with and without pretreatment of DEVD

Case	No. of Apo/Total ^a			Apoptosis Index (%)		
	Cyto-C	DEVD	BSA	Cyto-C*	DEVD**	BSA
1	43/135	8/229	0/168	32	3	0
2	46/132	8/46	0/257	35	17	0
3	40/92	44/169	0/84	43	26	0
4	38/127	6/102	2/214	30	6	1
5	81/268	3/34	2/140	30	9	1
6	83/216	17/75	3/83	38	22	4
7	94/257	35/326	3/172	37	11	2
8	48/202	3/141	7/169	24	2	4
9	61/268	77/439	0/81	23	17	0
10	49/212	6/277	0/70	23	2	0
Mean ^b				31.5±6.8	11.5±8.6	1.2±1.6

^a: numbers of apoptotic cells/total cells microinjected. Cyto-C: cytochrome c microinjection only, DEVD: cytochrome c microinjection after treatment of AC-DEVD-CHO, BSA: microinjection of bovine serum albumin as a control, Mean^b: average±standard deviation, p-value<0.05 (Cyto-C*, DEVD**).

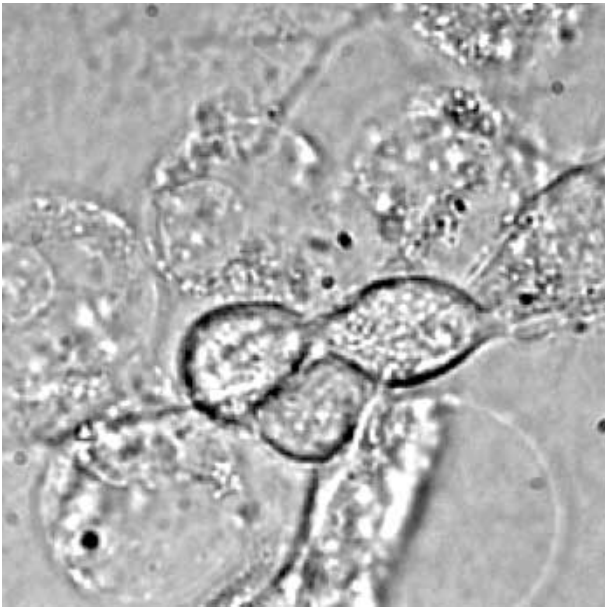


Fig. 2. Immediate cellular swelling is seen after microinjection of excessive volume of solution.

서는 11.5±8.6%의 평균 세포자멸사 지수를 나타내어 의미 있는 감소를 보였다(p<0.05). BSA를 주입한 대조군은 1.2±1.6%의 평균 세포자멸사 지수를 보였다(Table 1, Fig. 3).

고찰

본 연구에서 생쥐 3T3 섬유모세포내 cytochrome c의 미세 주입이 세포자멸사를 유발하는 것을 관찰하였고, 세포자멸사가 진행되는 세포들은 시간이 지남에 따라 계속해서 세포질의 분절화에 이은 세포자멸사체의 형성을 보여주었으며, 이 세포자멸사

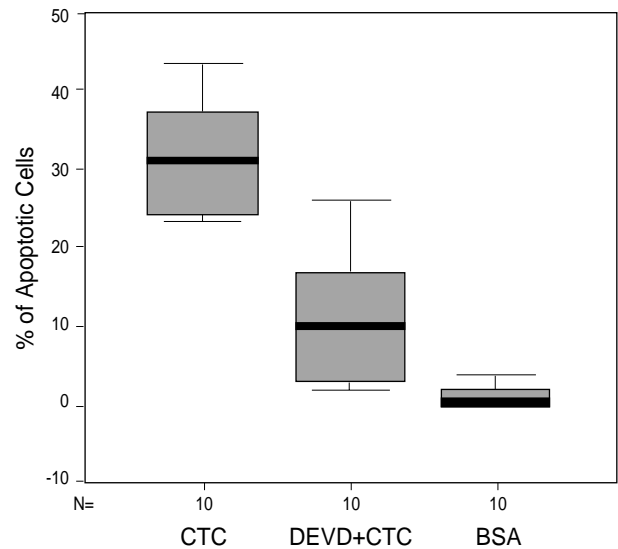


Fig. 3. Percent changes in apoptotic cells after microinjection of cytochrome c without and with pretreatment of Ac-DEVD-CHO, and BSA as a control. CTC: cytochrome c, DEVD: Ac-DEVD-CHO, BSA: bovine serum albumin.

체들은 세포로부터 떨어져 나갔다. Cytochrome c의 미세주입으로 인한 세포자멸사는 매우 빠르게 진행되어 주입 후 50-60분 안에 형태학적으로 세포자멸사의 유무가 거의 결정되었다(Fig. 1). 세포의 세포자멸사 여부를 연구하는데 흐름세포측정법(flow cytometry), Rhodamine 123, propidium iodide, Hoechst342 염색이나 TUNEL (TdT-mediated dUTP biotin nick end-labelling)법이 흔히 이용되고 있다.^{20,21} 그러나 본 실험에서 미세주입 후 Rhodamine 123, propidium iodide, Hoechst342 염색, 그리고 TUNEL을 시도해 보았으나 주사된 세포들이 다수 떨어져 나갔고, 특히 자멸사된 세포들이 잘 떨어져 나갔기 때문에 배양액 속의 세포를 정해진 시간 동안 형태학적으로 관찰하

였다.

Chang 등²²에 의하면 NRK-52E 정상 신장세포주(CRL 1571)에 cytochrome c를 주입하였는데 세포자멸사가 빠르면 주입 후 30분에 시작되었고, 형태학적으로 미세주입된 세포의 60-70%에서 2-3시간 내에 세포자멸사가 일어났다. 그리고 Zhivotovsky 등²³의 실험에서 cytochrome c의 미세주입 후 90분에 세포자멸사 형태가 정상 쥐 신장 상피세포주(NRK) 46.7 ± 4.7%, 부신피질 중앙세포주(Y-1)에서 52.6 ± 7.2%, 생쥐 배아 Swiss 3T3 섬유모세포에서 43.5 ± 15.5%였음을 보여 주었다. Cytochrome c의 세포내 주입에 의하여 세포자멸사가 일어난 세포의 비율이 다른 것은 세포주의 종류와 미세주입 기술에 기인한 것으로 사료되었다. 그러나 Chang 등과 Zhivotovsky 등의 논문에는 미세주입시 과량의 주입으로 인한 세포의 변화에 대한 서술이 없다. 일정량의 주입을 위하여 미세주입 압력과 시간을 조정하여 자동식으로 시행하지만, 실제로 10-20개 정도의 세포에 미세주입이 시행되면 일정량의 미세주입이 불가능할 경우가 많아 본 실험에서는 수동식으로 시행하였다. 본 실험에서 기술적으로 가장 어려운 점은 적절한 양을 세포에 주입하는 것이었다. 주입된 양이 조금만 지나쳐도 쉽게 세포의 증창이 오고 세포가 죽었다. 생쥐 3T3 섬유모세포는 배양 시 층을 이루지 않고 납작하게 자라 미세주입을 하기에 적절하였으나 적절한 양의 주입이 곤란하였다. 유방암종 세포주인 MCF-7이나 결장암종 세포주인 HCT-15와 같은 세포들은 미세주입으로 인한 스트레스로 세포가 죽는 경우는 매우 드물었다(data not shown).

본 실험에서 caspase-3 억제제인 Ac-DEVD-CHO를 미세주입 전에 생쥐 3T3 섬유모세포에 처치하여 cytochrome c의 세포내 주입으로 인한 세포자멸사의 억제 효과를 알아보았다. Chang 등²²은 Ac-DEVD-CHO가 cytochrome c의 미세주입으로 인한 NRK-52E 세포(정상 쥐 신장세포주)의 세포자멸사를 완전히 억제하였다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 평균 세포자멸사 지수가 cytochrome c 주입군에서 31.5%이고 Ac-DEVD-CHO 전처리 후 cytochrome c 주입군에서 11.5%로 통계학적 차이는 있었으나, caspase-3 억제제가 세포자멸사를 완전히 억제하지는 않았다. Li 등²⁴은 인간 신장 293 세포질내 cytochrome c의 미세주입으로 용량-의존적인 세포자멸사를 유발하였으나, caspase-3가 검출되지 않는 인간 유방암종 MCF-7 세포는 cytochrome c의 미세주입에 반응하지 않았다고 하였다. 그러나 pro-caspase-3 유전자를 가진 plasmid로 MCF-7 세포에 전달 감염시켜 cytochrome c에 대한 세포의 민감성이 회복됨을 증명하였다. 연구자는 MCF 세포와 인간 결장암종 HCT-15 세포질내 생쥐 심장 cytochrome c의 미세주입을 시행해 보았는데, HCT-15 세포에서는 세포자멸사 형태가 1시간 안에 관찰되었으나 MCF-7 세포에서는 세포자멸사가 일어나지 않았다(data not shown). 따라서 세포자멸사의 경로에서 caspase-3가 cytochrome c의 하류(downstream)에 있음을 확인할 수 있었다.

미세주입에는 일차적인 혹은 기존의 세포주, 섬유모세포, 그

리고 수축하는 심근세포를 포함한 다양한 조직의 세포들이 이용된다. 생물학적 물질을 세포내 주입하는 방법 중 미세주입법의 장점은 다음과 같다. 1) 주입 물질의 경제성: 미세주입에 소량(10^{-13} - 10^{-15} L)의 물질이 이용된다. 2) 세포손상이 적다. 3) 핵산, 단백질, 크고 작은 분자와 같이 주입될 물질에 제한이 없다. 4) 두 가지 이상의 단백질을 시간을 두고 같은 세포에 주입할 수 있다. 5) 유전암호 해독 후 변화의 효과를 결정하기 위하여 시험관 안에서 변형된 분자를 주입할 수 있다. 6) 주입된 물질의 효과를 다른 조건의 세포들과 직접 비교할 수 있다.²⁵ 또한 미세주입법은 정확하게 물질을 주입할 수 있고(소수의 세포라도 확실하게), 결과를 신속하게 볼 수 있으며, 현미경 하에 직접 세포를 관찰할 수 있다. 뇌 피질과 같은 조직에서 분리된 세포에 여러 종류의 세포가 섞여 있는 경우, 미세주입은 관심 있는 세포들을 선택하여 주입할 수 있게 해 준다.² 그러나 미세주입법은 힘들고 지루하며, 정확한 양을 주입하기 어렵고(많은 수의 세포에 주입할 경우), 부착해서 자라는 세포에서만 가능하고, 다수의 세포에서 시행할 수 없으며, 특히 소수의 세포를 가지고 실험을 할 수밖에 없기 때문에 발현을 보는 데 한계가 있다.

세포내 미세주입술의 과정은 (1) 주입할 물질을 제조하고, (2) 배지의 조건(세포외 환경)을 정하고, (3) 미세주입을 시행하고, (4) 세포의 발현을 보는 것이다. 본 실험에서 구입이 용이한 cytochrome c 및 Ac-DEVD-CHO를 이용하였고, 세포의 발현을 형태학적 변화로 관찰하였다. 따라서 미세주입술이 세포생물학의 연구에 유용한 기법임을 확인할 수 있었다. 그러나 gene cloning, 단 클론 항체 및 anti-sense oligomer 등의 제조를 통하여 미세주입할 물질을 준비하고, 단세포 혹은 소수의 세포에서 발현을 보기 위하여 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) 및 면역세포화학적 검사 등을 시행하는 것이 미세주입술을 세포생물학의 연구에 이용하는 데 있어서 선결조건이라고 생각되었다.

참고문헌

1. Feramisco J, Perona R, Lascal JC. Needle microinjection: A brief history. In: Lascal JC, Perona R, Feramisco J. Microinjection. 1st ed., Basel: Birkhauser Verlag, 1999; 9-15.
2. Mulderry PK. Intracellular Microinjection: A Powerful Tool in the Study of Neuronal Gene Expression and Function. *Methods* 1996; 10: 292-300.
3. Yi JY, Yi SJ, Kim KH, Choi JE, Jhun BH. Cellular function of Rac1 in the insulin signal transduction pathway. *J Korean Assoc Cancer Prevention* 1999; 4: 93-101.
4. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
5. Oyaizu N, Pahwa S. Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis.

- J Clin Immunol 1995; 15: 217-31.
6. Shi B, De Girolami U, He J, *et al.* Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. J Clin Invest 1996; 98: 1979-90.
 7. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liau G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. Am J Pathol 1995; 147: 267-77.
 8. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. Cell Mol Life Sci 1998; 54: 427-45.
 9. Porter AG. Protein translocation in apoptosis. Trends Cell Biol 1999; 9: 394-401.
 10. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281: 1322-6.
 11. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 1998; 94: 491-501.
 12. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 1998; 94: 481-90.
 13. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3668-72.
 14. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. EMBO J 1998; 17: 3878-85.
 15. Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. 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: 7440-4.
 16. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. Science 1999; 284: 339-43.
 17. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. Cell 1998; 94: 695-8.
 18. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 1996; 86: 147-57.
 19. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997; 275: 1132-6.
 20. Ramachandra S, Studzinski GP. Morphological and biochemical criteria of apoptosis. In: Studzinski GP. Cell growth and apoptosis. A practical approach. 1st ed. Oxford: Oxford University Press, 1998; 119-40.
 21. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J, Hara S, Traganos F. Analysis of cell death by flow cytometry. In: Studzinski GP. Cell growth and apoptosis. A practical approach. 1st ed. Oxford: Oxford University Press, 1998; 143-66.
 22. Chang SH, Phelps PC, Berezsky IK, Ebersberger ML Jr, Trump BF. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). Am J Pathol 2000; 156: 637-49.
 23. Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Døskeland SO. Injected cytochrome c induces apoptosis. Nature 1998; 391: 449-50.
 24. Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC. Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. J Biol Chem 1997; 272: 30299-305.
 25. Perona R, Dolfi F, Feramisco J, Lascal JC. Microinjection of macromolecules into mammalian cells in culture. In: Lascal JC, Perona R, Feramisco J. Microinjection. 1st ed., Basel: Birkhauser Verlag, 1999; 17-30.