

VYUŽITÍ METODY WESTERN BLOT PRO DETEKCI PROTEINŮ SOUVISEJÍCÍCH S APOPTÓZOU NEUTROFILŮ

P. Sláma

Došlo: 19. prosince 2008

Abstract

SLÁMA, P.: *Application of Western Blot for detection of neutrophil apoptosis-related proteins*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2009, LVII, No. 1, pp. 97–104

The aim of this study was to evaluate suitability of using Western Blot for detection of neutrophil apoptosis and neutrophil apoptosis-related proteins, respectively. Neutrophils were isolated from blood of healthy adult donors and incubated with G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), ATP (adenosine triphosphate) and FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). The neutrophils were incubated 4, 8 and 20 hours at 37 °C. In this assay, an expression of Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) and gelsolin was analysed by Western Blot method. The results showed that Western Blot is a suitable method for detection of neutrophil apoptosis-related proteins and detection of neutrophil apoptosis, respectively.

Western Blot, neutrophil, apoptosis, cytokines, Mcl-1, XIAP, gelsolin

Neutrofilní granulocyty (neutrofily) představují významnou komponentu nespecifického obranného systému organismu vůči bakteriální infekci, tvoří první linii buněčné obrany proti vnikajícím mikroorganismům (Paape et al., 2003). V krvi přežívají neutrofily pouze několik hodin. Z krve vycestovávají do tkání, kde plní své funkce a poté podléhají apoptóze (Fadeel et al., 1998). Spontánní apoptóza neutrofilů je oddalována nebo urychlována za přítomnosti různých činitelů, např. cytokinů, jako jsou G-CSF, GM-CSF a TNF- α (Avdi et al., 2001; Epling-Burnette et al., 2001; Hasegawa et al., 2003; Sakamoto et al., 2003; Derouet et al., 2004). Modulace apoptózy neutrofilů cytokiny může být úzce spjata s průběhem zánětu. Mechanismy, kterými cytokiny uplatňují proapoptotický nebo protiapoptotický účinek na neutrofily, však nejsou zcela známy. Je však známo, že se v těchto procesech uplatňují některé proteiny, které souvisejí s apoptózou buněk (Hasegawa et al., 2003; Kato et al., 2006; Kato et al., 2008).

Proteiny související s apoptózou buněk se dají rozdělit do následujících skupin. Skupina Bcl-2 proteinů (Mcl-1, A1, Bcl-X_L a Bax), IAP proteiny (XIAP, cIAP1, cIAP2 a survivin) (Moulding et al., 1998; Epling-Burnette et al., 2001; Kobayashi et al., 2002;

Hasegawa et al., 2003; Kato et al., 2006) a gelsolin (Oh-tsui et al., 1997; Koya et al., 2000; Silacci et al., 2004).

Skupina Bcl-2 proteinů hraje ústřední roli ve zprostředkování proapoptotických a antiapoptotických signálů. Klíčovým mechanismem, kterým tyto proteiny zprostředkovávají apoptózu, je regulace uvolňování mitochondriálního cytochromu c. Cytochrom c je kofaktorem při aktivaci kaspázy-9, která aktivuje efektor kaspázy, včetně kaspázy-3. Proapoptotické Bcl-2 proteiny podporují uvolňování cytochromu c, zatímco antiapoptotické proteiny zabírají transportu cytochromu c z mitochondrií (Adams a Cory, 1998; Antonsson a Martinou, 2000). G-CSF zvyšuje expresi A1 (Chuang et al., 1998) a snižuje expresi Bax (Dibbert et al., 1999), dále pak GM-CSF zvyšuje expresi Mcl-1 (Moulding et al., 1998; Moulding et al., 2001; Epling-Burnette et al., 2001) a snižuje expresi Bax- α , zatímco TNF- α snižuje expresi Bcl-X_L (Weinmann et al., 1999).

Bylo zjištěno, že IAP proteiny inhibují přímou cestou kaspázu-3 a kaspázu-7 a inhibují aktivaci prokaspázy-9 (LaCasse et al., 1998; Deveraux a Reed, 1999). U humánních neutrofilů dochází k expresi XIAP, cIAP1 a cIAP2. Expresí cIAP2 je u neutrofilů

zvyšována stimulací prostřednictvím G-CSF skrze aktivaci JAK2-STAT3 dráhy (Hasegawa et al., 2003).

Gelsolin je protein patřící do skupiny „gelsolin superfamily proteins“. Tato skupina proteinů má několik zástupců (gelsolin, villin, adseverin, capG, advillin, supervillin a flightless), avšak doposud byla prokázána pouze účast gelsolinu v procesu apoptózy (Silacci et al., 2004).

Detekci apoptózy buněk je vhodné provádět alespoň dvěma nezávislými technikami, což zajišťuje objektivnější posouzení incidence tohoto procesu (Darzynkiewicz et al., 1992; Vermes et al., 2000; Sláma et al., 2006). Detekce výše zmíněných proteinů, jejich exprese a degradace, může hrát roli při objektivizaci detekce apoptózy. Jednou z metod, která se používá pro detekci proteinů, je metoda Western Blot. Jedná se o metodu hojně používanou v molekulární biologii. Jeví se jako metoda, která je vhodná pro rozšíření škály metod, prostřednictvím kterých se zjišťuje apoptóza neutrofilů.

Z výše uvedených důvodů bylo cílem práce zjistit vhodnost použití metody Western Blot pro detekci apoptózy neutrofilů, respektive proteinů souvisejících s apoptózou neutrofilů.

MATERIÁL A METODY

Příprava neutrofilů

Humánní krev byla získána od pěti zdravých dospělých dárců. Neutrofilů byly izolovány z krve metodou dle Hasegawa et al. (2003) sedimentací použitím dextranu, centrifugací s Conray-Ficoll (Mallinckrodt, St. Louis, USA) a hypotonickou lýzou kontaminujících erytrocytů. Buňky byly resuspendovány v HBSS. Frakce neutrofilů obsahovala > 98% neutrofilů.

Experimentální uspořádání

Neutrofilů (2×10^6 /ml) byly inkubovány s rekombinantními humánními G-CSF (50 ng/ml) a GM-CSF (5 ng/ml) (Scherling-Plough, Osaka, Japonsko), ATP (250 μ M) a FMLP (10^{-7} M) (Sigma Chemical, St. Louis, USA). Inkubace probíhala 4, 8 a 20 hodin při teplotě 37 °C. Byla sledována exprese proteinů Mcl-1 (rabbit polyclonal antibody against Mcl-1, BD Pharmingen, San Diego, USA), XIAP (mouse monoclonal antibody against XIAP, BD Transduction Laboratories, San Diego, USA) a gelsolin (mouse monoclonal antibody against gelsolin, Sigma Chemical, St. Louis, USA) metodou Western Blot.

Metoda Western Blot

Western blotting byl proveden metodou dle Hasegawa et al. (2003). Buňky byly fixovány 10% TCA (Wako, Tokio, Japonsko) jako prevence proteolýzy granulárními enzymy během přípravy buněčného lysátu a byly promyty acetonem obsahujícím 10 mM dithiotreitolu. Dále byly buňky lyzovány pufrem, který obsahuje 2% SDS, 10% glycerolu, 5% 2-mercaptoethanolu a stopové množství bromophenol blue dye v 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8). Poté byly neutrofilů

považeny po dobu 5 minut. Vzorky byly podrobeny gelové elektroforéze (4–20% SDS). Po elektroforéze byly proteiny přeneseny (opět elektroforeticky) z gelu na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly inkubovány s příslušnými primárními a sekundárními protilátkami konjugovanými HRP a komplex protilátek byl vizualizován metodou ECL (Enhanced chemiluminescence Western Blotting system, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Anglie). Denzita bandů byla zjišťována programem Image Gauge 3.2 (FujiFilm, Tokio, Japonsko).

Statistika

Denzita bandů byla vyjádřena procenticky, byl stanoven průměr a směrodatná odchylka denzity bandů. Statistická významnost byla zjišťována párovým *t*-testem. Data byla zpracována programem STATISTIKA 7.1 (StatSoft ČR, s. r. o., Praha, Česká republika).

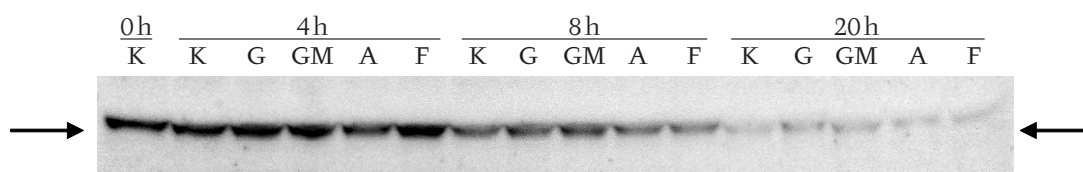
VÝSLEDKY A DISKUSE

Apoptóza buněk je proces, který je možné zjišťovat velkou škálou metod. Volba správných metod hraje klíčovou roli pro objektivní posouzení tohoto procesu (Sgong a Gruber, 1998; Willingham, 1999; Stadelmann a Lassmann, 2000; Otsuki et al., 2003; Sláma et al., 2006).

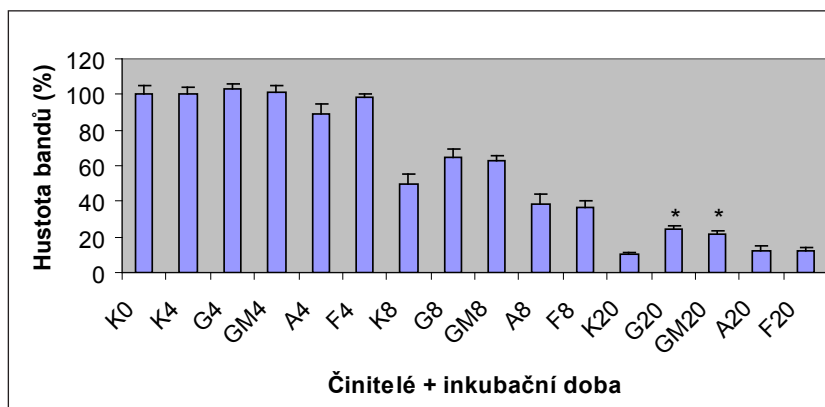
Při odhalování procesu apoptózy neutrofilů prostřednictvím detekce proteinů souvisejících s apoptózou se jeví jako velmi vhodné detekovat alespoň jeden protein z každé ze tří skupin těchto proteinů (Bcl-2, IAP, „gelsolin superfamily proteins“), protože každá skupina těchto proteinů má svoje specifika (Deveraux a Reed, 1999; Edwards et al., 2004; Silacci et al., 2004). Do experimentu byli zvoleni následující zástupci výše zmíněných skupin proteinů: Mcl-1, XIAP a gelsolin, které byly analyzovány metodou Western Blot.

Jak je z Obr. 1 patrné, dochází k degradaci proteinu Mcl-1 v závislosti na čase, což je vidět jak u kontroly, tak u pokusných vzorků, dále pak v závislosti na použitých činitelích. Degradace Mcl-1 je úzce spjata s apoptózou neutrofilů (Kato et al., 2006). Z denzity bandů (Obr. 2) je zřetelný účinek G-CSF a GM-CSF na oddělení apoptózy neutrofilů. Byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi kontrolou a vzorky s G-CSF a GM-CSF po 20 hodinách inkubace. G-CSF a GM-CSF mají antiapoptotický efekt na humánní neutrofilů. G-CSF zprostředkovaný antiapoptotický účinek je zcela závislý na syntéze proteinů (Sakamoto et al., 2003). GM-CSF má antiapoptotický účinek na humánní neutrofilů jak indukci syntézy Mcl-1, tak jeho stabilizaci. Stabilizace Mcl-1 indukovaná GM-CSF je zprostředkována aktivací ERK a PI3K (Derouet et al., 2004). GM-CSF zvyšuje expresi Mcl-1 (Moulding et al., 1998; Moulding et al., 2001; Epling-Burnette et al., 2001). Degradace proteinu Mcl-1 se tak jeví jako vhodný marker apoptózy neutrofilů.

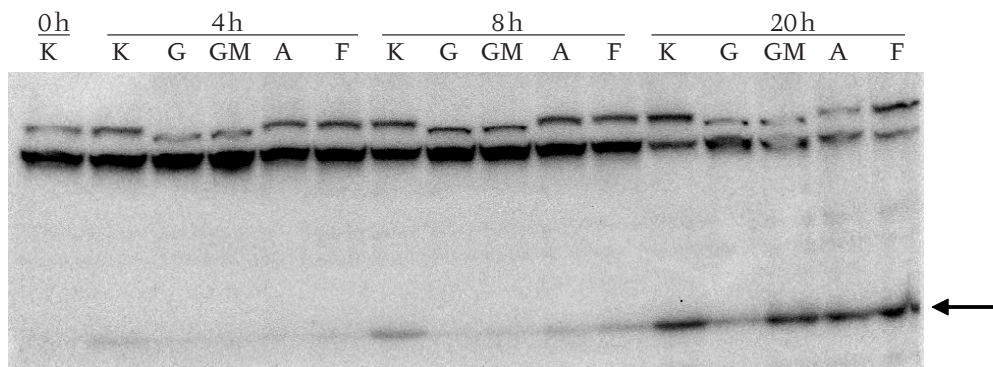
Z Obr. 3 je zřejmé, že dochází k degradaci XIAP v závislosti na čase a použitých činitelích. Zároveň s degradací tohoto proteinu (degradace proteinu je



1: Expres proteinu Mcl-1 detekovaná metodou Western Blot. Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Šipky ukazují na bandy znázorňující expresi proteinu Mcl-1 u jednotlivých vzorků.



2: Denzita bandů proteinu Mcl-1 zjišťovaná programem Image Gauge 3.2. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. Za 100 % byla brána denzita bandu u kontroly v časovém bodě 0.



3: Expres proteinu XIAP detekovaná metodou Western Blot. Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Na obrázku jsou vidět bandy znázorňující expresi proteinu XIAP u jednotlivých vzorků. Šipka ukazuje fragment, který je markerem apoptózy.

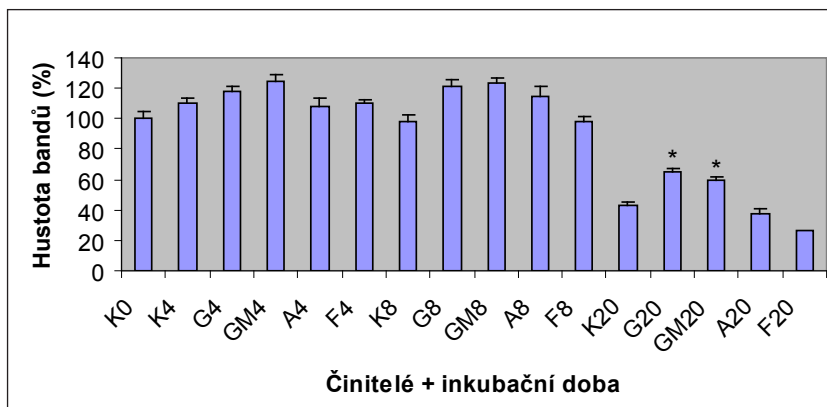
doložena denzitou bandů na Obr. 4) se objevuje jeho fragment, který vytváří samostatný band (Obr. 3), který jasně ukazuje nastupující apoptózu neutrofilů především po 20 hodinách inkubace. Čím je tento band výraznější, tím intenzivnější je apoptóza v populaci neutrofilů. Při detekci XIAP je tak apoptóza neutrofilů metodou Western Blot ještě čitelnější než u proteinu Mcl-1. Degradace XIAP se může účastnit v procesu spontánní apoptózy neutrofilů a zhoršená degradace tohoto proteinu je spojena s prodloužením přežívání neutrofilů, například při chronických

myeloidních leukémiích (Kobayashi, et al., 2002; Hasegawa et al., 2003).

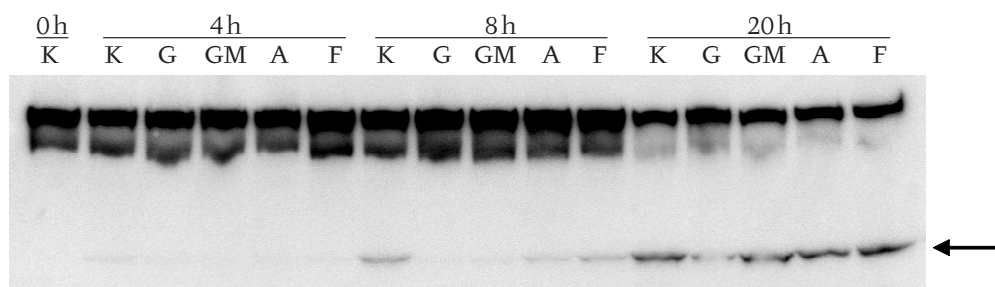
Také při detekci gelsolinu dochází ke snižování denzity bandů v závislosti na čase a použitých činitelích (Obr. 5 a 6) a vytvářejí se další bandy (fragmenty), které jsou markerem apoptózy. Vznik fragmentu, který by se dal označit jako „apoptotický band“, zaznamenali u humánních neutrofilů Suzuki et al. (2001) a Kato et al. (2008). Ke vzniku tohoto bandu dochází díky rozštěpení daného proteinu (Suzuki et al., 2001; Kato et al., 2008).

Jak je z výsledků zřejmé, metoda Western Blot je velmi vhodná pro detekci proteinů souvisejících s apoptózou neutrofilů (Mcl-1, XIAP, gelsolin), tzn. že je vhodná i pro posouzení výskytu apoptózy neu-

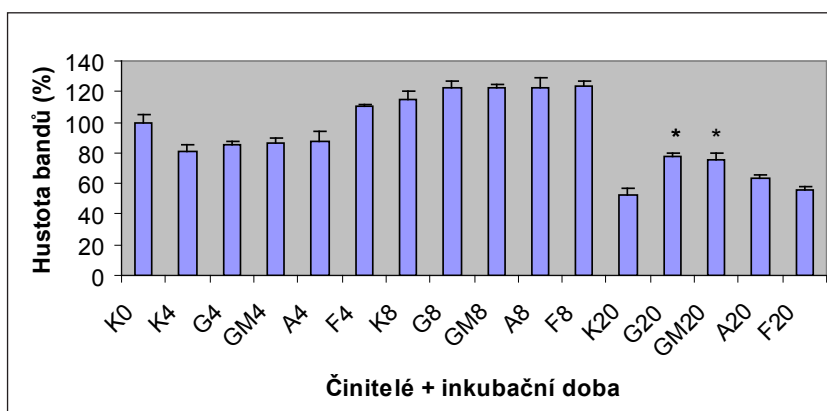
trofilů. Stává se tak další významnou metodou studia apoptózy neutrofilů. Také v oblasti veterinární medicíny by se mohla stát běžně používanou metodou pro detekci apoptózy neutrofilů.



4: Denzita bandů proteinu XIAP zjišťovaná programem Image Gauge 3.2. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. Za 100 % byla brána denzita bandu u kontroly v časovém bodě 0.



5: Expres proteinu gelsolin detekovaná metodou Western Blot. Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Na obrázku jsou vidět bandy znázorňující expresi proteinu gelsolin u jednotlivých vzorků. Šipka ukazuje fragment, který je markerem apoptózy.



6: Denzita bandů proteinu gelsolin zjišťovaná programem Image Gauge 3.2. K – kontrola (suspenze neutrofilů), dále pak jednotlivé vzorky: G – G-CSF (50 ng/ml), GM – GM-CSF (5 ng/ml), A – ATP (250 μ M) a F – FMLP (10^{-7} M). Inkubační doba 0, 4, 8 a 20 hodin. Za 100 % byla brána denzita bandu u kontroly v časovém bodě 0.

SOUHRN

Práce byla zaměřena na zjištění vhodnosti použití metody Western Blot pro detekci proteinů souvisejících s apoptózou neutrofilů, jako doplňkové metody pro detekci apoptózy neutrofilů. Neutrofilů byly izolovány z humánní krve pěti zdravých dospělých dárců. Dále byly inkubovány s G-CSF (50 ng/ml), GM-CSF (5 ng/ml), ATP (250 μ M) a FMLP (10^{-7} M). Inkubace probíhala 4, 8 a 20 hodin při teplotě 37 °C. Byla sledována exprese proteinů Mcl-1, XIAP a gelsolin. V experimentech docházelo k degradaci proteinu Mcl-1 v závislosti na čase jak u kontrolních vzorků, tak u pokusných vzorků, dále pak v závislosti na použitých činitelích. G-CSF a GM-CSF oddalují apoptózu neutrofilů, což dobře dokládá denzita bandů proteinu Mcl-1. Detekce exprese proteinu Mcl-1 se jeví jako vhodný marker apoptózy neutrofilů. K degradaci XIAP docházelo také v závislosti na čase a použitých činitelích. Zároveň s degradací tohoto proteinu se objevil jeho fragment, který vytvářel samostatný band, který zřetelně ukazuje nastupující apoptózu neutrofilů především po 20 hodinách inkubace. Čím je tento band výraznější, tím intenzivnější je apoptóza neutrofilů. Také při detekci gelsolinu docházelo ke snižování denzity bandů v závislosti na čase a použitých činitelích a vytvářely se další bandy (fragментy), které jsou markerem apoptózy.

Jak je z výsledků zřejmé, metoda Western Blot je velmi vhodná pro detekci proteinů souvisejících s apoptózou neutrofilů (Mcl-1, XIAP, gelsolin), tzn. že je vhodná i pro posouzení výskytu apoptózy neutrofilů. Stává se tak další významnou metodou studia apoptózy neutrofilů.

Western Blot, neutrofil, apoptóza, cytokiny, Mcl-1, XIAP, gelsolin

SUMMARY

The present study was focused on the evaluation of Western Blot method for detection of neutrophil apoptosis-related proteins as a supplemented method for detection of neutrophil apoptosis. Neutrophils were isolated from blood of five healthy adult donors and incubated with G-CSF (50 ng/ml), GM-CSF (5 ng/ml), ATP (250 μ M) and FMLP (10^{-7} M). The neutrophils were incubated 4, 8 and 20 hours at 37 °C. An expression of Mcl-1, XIAP and gelsolin was detected in the study by Western Blot method. The results showed that the degradation of Mcl-1 is depended on time and agents. The fact that the G-CSF and GM-CSF delay neutrophil apoptosis was documented by density of protein bands. Degradation of XIAP also depended on time and agents. The fragmentation of this protein was presented as a separated band during the incubation. This band is a marker of neutrophil apoptosis. Almost the same band arised during detection of gelsolin and showed apoptosis of neutrophils too. These results indicate Western Blot as a suitable method for detection of neutrophil apoptosis-related proteins, i.e. this method is suitable for examination of neutrophil apoptosis incidence.

Poděkování patří prof. Seiichi Kitagawa a Dr. Takayuki Kato za odborné vedení při stáži na Department of Physiology, Osaka City University Medical School, kde jsem měl možnost studovat metodu Western Blot v souvislosti s apoptózou neutrofilů. Dále bych chtěl poděkovat Japan Society for the Promotion of Science za finanční podporu během této stáže.

LITERATURA

- AVDI, N. J., NICK, J. A., WHITLOCK, B. B., BILLSTROM, M. A., HENSON P. M., JOHNSON, G. L., WORTHEN, G. S., 2001: Tumor necrosis factor- α activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in human neutrophils. Integrin involvement in a pathway leading from cytoplasmic tyrosine kinases to apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276: 2189–2199.
- ADAMS, J. M., CORY, S., 1998: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322–1326.
- ANTONSSON, B., MARTINOU, J. C., 2000: The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.*, 256: 50–57.
- CHUANG, P. I., YEE, E., KARSAN, A., WINN, R. K., HARLAN, J. M., 1998: A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 361–365.
- DARZYŃKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DELBINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P., TRAGANOS, E., 1992: Features of apoptotic cells as measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13: 795–808.
- DEROUET, M., THOMAS, L., CROSS, A., MOOTS, R. J., EDWARDS, S. W., 2004: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem.*, 279: 26915–26921.
- DEVERAUX, Q. L., REED, J. C., 1999: IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13: 239–252.
- DIBBERT, B., WEBER, M., NIKOLAIZIK, W. H., VOGT, P., SCHONI, M. H., BLASER, K., SIMON, H. U., 1999: Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis.

- tosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 13330–13335.
- EDWARDS, S. W., DEROUET, M., HOWSE, M., MOOTS, R. J., 2004: Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 489–492.
- EPLING-BURNETTE, P. K., ZHONG, B., BAI, F., JIANG, K., BAILEY, R. D., GARCIA, R., JOVE, R., DJEU, J. Y., LOUGHRAN Jr. T. P., WEI, S., 2001: Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.*, 166: 7486–7495.
- FADEEL, B., AHLIN, A., CENTER, J. I., ORRENIUS, S., HAMPTON, M. B., 1998: Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, 92: 4808–4818.
- HASEGAWA, T., SUZUKI, K., SAKAMOTO, C., OHTA, K., NISHIKI, S., HINO, M., TATSUMI, N., KITAGAWA, S., 2003: 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*, 101: 1164–1171.
- KATO, T., KUTSUNA, H., OSHITANI, N., KITAGAWA, S., 2006: Cyclic AMP delays neutrophil apoptosis via stabilization of Mcl-1. *FEBS Lett.*, 580: 4582–4586.
- KATO, T., NOMA, H., KITAGAWA, M., TAKAHASHI, T., OSHITANI, N., KITAGAWA, S., 2008: Distinct role of c-Jun N-terminal kinase isoforms in human neutrophil apoptosis regulated by tumor necrosis factor- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Interferon Cytokine Res.*, 28: 235–243.
- KOBAYASHI, S., YAMASHITA, K., TAKEOKA, T., OHTSUKI, T., SUZUKI, Y., TAKAHASHI, R., YAMAMOTO, K., KAUFMANN, S. H., UCHIYAMA, T., SASADA, M., TAKAHASHI, A., 2002: Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J. Biol. Chem.*, 277: 33968–33977.
- KOYA, R. C., FUJITA, H., SHIMIZU, S., OHTSU, M., TAKIMOTO, M., TSUJIMOTO, Y., KUZUMAKI, N., 2000: Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*, 275: 15343–15349.
- LACASSE, E. C., BAIRD, S., KORNELUK, R. G., MACKENZIE, A. E., 1998: The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247–3259.
- MOULDING, D. A., QUAYLE, J. A., HART, A., EDWARDS, S. W., 1998: Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*, 92: 2495–2502.
- MOULDING, D. A., AKGUL, C., DEROUET, M., WHITE, M. R. H., EDWARDS, S. W., 2001: BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, 70: 783–792.
- OHTSU, M., SAKAI, N., FUJITA, H., KASHIWAGI, M., GASA, S., SHIMIZU, S., EGUCHI, Y., TSUJIMOTO, Y., SAKIYAMA, Y., KOBAYASHI, K., KUZUMAKI, N., 1997: Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J.*, 16: 4650–4656.
- OTSUKI, Y., LI, Z., SHIBATA, M. A., 2003: Apoptotic detection methods—from morphology to gene. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 38: 275–339.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X., LEE, J.-W., 2003: The bovine neutrophils: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 34: 597–627.
- SAKAMOTO, C., SUZUKI, K., HATO, F., AKAHORI, M., HASEGAWA, T., HINO, M., KITAGAWA, S., 2003: Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanism and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *Int. J. Hematol.*, 77: 60–70.
- SGONC, R., GRUBER, J., 1998: Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.*, 33: 525–533.
- SILACCI, P., MAZZOLAI, L., GAUCI, C., STERGIOPOULOS, N., YIN, H. L., HAYOZ, D., 2004: Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 2614–2623.
- SLÁMA, P., SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D., 2006: Využití metod detekce apoptózy a nekrózy neutrofilních granulocytů krve skotu *in vitro*. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 54: 107–116.
- STADELMANN, C., LASSMANN, H., 2000: Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res.*, 301: 19–31.
- SUZUKI, K., HASEGAWA, T., SAKAMOTO, C., ZHOU, Y.-M., HATO, F., HINO, M., TATSUMI, N., KITAGAWA, S., 2001: Cleavage of mitogen-activated protein kinase in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 166: 1185–1192.
- VERMES, I., HAANEN, C., REUTELINGSPERGER, C., 2000: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, 243: 167–190.
- WEINMANN, P., GAEHTGENS, P., WALZOG, B., 1999: Bcl-XL- and Bax- α -mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood*, 93: 3106–3115.
- WILLINGHAM, M., 1999: Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 47: 1101–1109.

Seznam zkratk

ATP – adenosine triphosphate
Bax – Bcl-2-associated X
Bcl-2 – B cell lymphoma 2
Bcl-X_L – basal cell lymphoma-extra large
cIAP1 – cellular IAP1
cIAP2 – cellular IAP2
capG – macrophage capping protein
ECL – enhanced chemiluminiscence
ERK – extracellular signal-regulated kinase
FMLP – N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF – granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HBSS – Hanks' balanced salt solution
HRP – horseradish peroxidase
IAP – inhibitor of apoptosis
JAK2 – Janus kinase 2
Mcl-1 – myeloid cell leukemia 1
PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase
SDS – sodium dodecyl sulfatu
STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3
TCA – trichloracetic acid
TNF- α – tumor necrosis factor-alpha
XIAP – X-linked IAP

Adresa

Ing. Petr Sláma, Ph.D., Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Oddělení imunologie, Hudcova 70, 621 00 Brno, Česká republika, e-mail: xslama@node.mendelu.cz

