

EXPRESSION AND LOCALIZATION OF HSP 70 IN PORCINE GRANULOSA CELLS

Expres a lokalizace HSP70 v granulózniích buňkách prasat

Vilma LÁNSKÁ, Marie KOUBKOVÁ
KVD AF ČZU

Souhrn, klíčová slova

Cílem práce bylo zjistit vývoj exprese a lokalizace stresových proteinů (HSP70) v granulózniích buňkách prasat při prodlužujícím se odpočinku po tepelném šoku. Expres HSP70 se zvyšovala do 4 hodin po tepelném šoku, poté postupně klesala a po 24 hodinách již nebyly detekovány žádné HSP70. Ihned po tepelném šoku byly HSP70 soustředěny zejména v jádrech a po 4 hodinách odpočinku se přemístily do perinukleární oblasti cytoplazmy.

Granulózní buňky; HSP70; tepelný šok; prase; imunocytochemie

Summary, keywords

The aim of this work was to investigate the development of HSP70 expression and localization in granulosa cell of a pig after heat shock and in an elongated recovery. Expression of HSP70 in granulosa cells increased by 4 hours after heat shock and then gradually decreased and after 24 hours no HSP70 was detected. Immediately after heat shock was HSP70 concentrated especially in nuclei and after 4 hour recovery relocated to perinuclear area of cytoplasm.

Granulosa cells; HSP70; heat shock; pig; immunocytochemistry

Úvod

Při vysokých teplotách nebo při působení jiných stresorů reagují buňky zvýšenou expresí stresových proteinů. Tyto proteiny se podílejí na ochraně buněk před následným poškozením a pomáhají při obnově buněčných funkcí. Zaměřili jsme se na indukční stresové proteiny o molekulové hmotnosti 70 kDa označované jako HSP70. Tyto proteiny brání agregaci poškozených proteinů a napomáhají opětovnému získání jejich funkční konformace (Mestrl and Dillmann, 1995). Cílem práce bylo zjistit vývoj exprese HSP70 a jejich lokalizaci v buňce během odpočinku po tepelném šoku.

Metody

Granulózní buňky byly získány z prasečích folikulů bez známek atrezie, o velikosti 3 až 5 mm. Kultivace probíhala 48 – 72 hodin při teplotě 39°C, při které granulózni buňky vytvořily monolayer, jenž byl vystaven 4 hodinovému tepelnému šoku 43,5°C. Několik vzorků bylo okamžitě po tepelném šoku fixováno a ostatní vzorky byly dále kultivovány při teplotě 39°C po dobu 1, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hodin. Stresové proteiny byly detekovány imunocytochemickou metodou. Jako primární byla použita specifická monoklonální myši protilátka anti-HSP70 (StressGen) v ředění 1:200. K průkazu vazby anti-HSP70 s antigenem jsme použili Vectastain ABC kit (Vector Laboratories), tj. sekundární biotinylovanou protilátku a vazbu avidinu s křenovou peroxidázou. K vizualizaci peroxidázové reakce byl použit diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB).

Výsledky - diskuse

Expres HSP70 se po tepelném šoku postupně zvyšovala do 4 hodin po tepelném šoku, poté byl zaznamenán pozvolný pokles a po 24 hodinách nebyly detekovány téměř žádné HSP70 v jádrech ani v cytoplasmě. Liu-Sheng a Fox (1996) sledovali tepelně šokovou reakci u buněk ovárií křečička čínského a zjistili vrchol kumulace HSP70 6 hodin po 15 minutové

zátěži. Dix (1997) udává maximum HSP70 po 4 hodinách a postupný pokles během 24 hodin na původní hodnotu, což se shoduje s našimi výsledky.

HSP70 byly těsně po šoku soustředěny zejména v buněčných jádrech a v menším množství v cytoplasmě. Přítomnost HSP70 v jádrech buněk souvisí zřejmě s morfologickými změnami, ke kterým dochází po tepelném šoku, jako je akumulace perichromatinových granúl (Yost and Lindquist, 1986), agregace preribozómů a jiných ribonukleoproteinových komplexů a výskyt filament (Welch, 1992). Jak uvádějí Coss a Linnemans (1996) HSP70 urychlují opravu agregovaných jaderných proteinů.

V průběhu kultivace při 39°C byla patrná změna lokalizace HSP70, zejména jejich přesun z jádra do perinukleární oblasti cytoplazmy. Při tepelném šoku jsou mikrotubuly, mikrofilamenta i intermediální filamenta přeskupena do blízkosti jádra (Welch, 1992). Výskyt HSP70 v perinukleárním prostoru by mohl souviset s jejich úlohou při stabilizaci a přetváření cytoskeletu (Šíma and Trebichavský, 1999). Cytoskelet se obnovuje asi 4 hodiny po tepelném šoku či v jeho dlouhodobém průběhu (Coss and Linnemans, 1996), proto je možné pozorovat pozitivní reakci vláknitých struktur v cytoplasmě granulózniích buněk při delším odpočinku po tepelné expozici.

Použitá literatura

- Coss R.A., Linnemans W.A.M.: Int. J. Hyperthermia. 12 (2): 173-196, 1996.
Dix D.J.: Cell Stress Chaperon 2: 73-77, 1997.
Liu-Sheng H., Fox M.H.: Cytometry 25: 280-286, 1996.
Mestrl R., Dillmann W.H.: J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 45-52, 1995
Šíma P., Trebichavský I.: Vesmír 78: 372-374, 1999.
Welch W.J.: Physiol. Rev. 72 (4): 1063-1081, 1992.
Yost H.J., Lindquist S.: Cell 45: 185-193, 1986.

Řešeno v rámci vnitřního grantu 236/10/46801/10 a projektu MSM 412100003.