

# EXPRESSION HSP70 IN GROWING PORCINE OOCYTES

## Expres HSP70 v rostoucích oocytech prasat

Vilma LÁNSKÁ, Jiří ROZINEK, František JÍLEK  
KVD AF ČZU

### Souhrn, klíčová slova

Cílem práce bylo zjistit přítomnost tepelně šokových proteinů HSP70 v prasečích rostoucích oocytech vystavených tepelnému šoku (43,5°C) 1, 4 a 6 hodin. Pro detekci HSP70 jsme použili metodu Western blot. Expres HSP70 rostla od 1 do 4 hodin tepelného šoku, nejvyšší množství bylo pozorováno po 4 hodinách a poté syntéza stresových proteinů postupně klesala.

Rostoucí oocyt; HSP70; tepelný šok; prase; western blot

### Summary, keywords

The aim of this study was to investigate the presence of heat shock proteins HSP70 in porcine growing oocytes submitted to heat shock (43,5°C) during 1, 4 and 6 hours. For the detection of HSP70 we used Western blotting analysis. The expression of HSP70 grows with the length of time from 1 to 4 hours of heat shock, the greatest amount of HSP70 was observed after 4 hours and then the synthesis of stress proteins gradually decreased.

Growing oocyte; HSP70; heat shock; pig; western blotting

### Úvod

Oocyty s ukončeným růstem nejsou schopny reagovat na stres zvýšenou syntézou stresových proteinů (HSPs) (Bienz and Gurdon, 1982; Curci et al., 1987; Edwards and Hansen, 1996). Naopak rostoucí myší oocyty syntetizovaly po tepelném šoku dvě izoformy HSP68, které patří do rodiny HSP70. Ke ztrátě schopnosti reagovat na tepelný šok tvorbou HSPs dochází během vývoje dutiny folikulu. Maximální stresová odpověď byla zjištěna během růstové fáze, se získáváním konečné velikosti oocyty docházelo k jejímu poklesu a s konečnou diferenciací oocyty byla zcela přerušena (Curci et al., 1991). Cílem naší práce bylo potvrdit zda rostoucí oocyty prasat jsou schopné, stejně jako rostoucí oocyty myší, reagovat na tepelný stres expresí HSP70 a zjistit intenzitu produkce stresových proteinů během stresové reakce.

### Metody

Rostoucí oocyty o velikosti 100 až 115 µm byly vystaveny tepelnému šoku 43,5°C o délce 1, 4 a 6 hodin. Část oocytů byla zpracována ihned po odběru a sloužila jako kontrola bez tepelné zátěže stejně jako oocyty kultivované 6 hodin při teplotě 39°C. HSP70 byly detekovány metodou Western blot. Proteiny byly elektroforeticky rozděleny v 10% polyakrylamidovém gelu s SDS a poté přetištěny na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly následně blokovány 5% odtučněným mlékem a inkubovány s primární myší monoklonální protilátkou anti-HSP70 (StressGen, Biotechnologies Corp.) v ředění 1:500. Poté byla aplikována sekundární protilátka anti – myší IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Sigma) ředěná v poměru 1:30 000. Pro vizualizaci byl použit chromogenní roztok BCIP/NBT (ICN Biomedicals, Inc.). Vzniklý precipitát byl vyhodnocován programem pro analýzu a zpracování obrazu LUCIA (Laboratory Imaging, s.r.o.).

### Výsledky - diskuse

Během růstu vykazuje oocyt vysoký stupeň transkripční a translační aktivity. Transkripce je zahájena v sekundárních folikulech a v terciálních folikulech se jaderná aktivita oocyty ještě zvyšuje (Hyttel et al., 2001). Předpokládali jsme tedy, že rostoucí oocyty budou reagovat na tepelný šok podobně jako somatické buňky a že budou schopny, narozdíl od oocytů s ukončeným růstem, zvyšovat expresi stresových proteinů po tepelném šoku.

Již po jedné hodině šoku byla patrná tvorba HSP70. Podle Gabriela et al. (1996) může při krátkodobém stresu dojít k transkripci HSP70, ale nemusí proběhnout translace. Hodinový šok o teplotě 43,5°C byl zřejmě pro expresi HSP70 v rostoucích oocytech dostatečně dlouhý nebo oocyty obsahovaly vyšší bazální hladinu těchto stresových proteinů. Tomu by mohlo odpovídat i určité množství HSP70 detekované v kontrolní skupině. V tomto případě se však mohlo jednat i o zátěž během manipulace s oocyty před jejich zpracováním do vzorku. Poměrně rychlá expres po hodinovém šoku by mohla také souviset s určitou aklimatizací rostoucích oocytů. Maloyan et al. (1999) zjistili, že nejvyšší hladina HSP70 mRNA u buněk, které byly tepelnému šoku vystaveny poprvé, byla po 40 až 60 minutách, zatímco u aklimatizovaných buněk se tato doba zkrátila na 20 až 40 minut. U termotolerantních buněk dochází k rychlejší aktivaci transkripčního faktoru HSF (Theodorakis et al., 1999).

Po hodinové expozici se syntéza HSP70 v rostoucích oocytech dále zvyšovala, maximálních hodnot dosahovala po čtyřech hodinách a poté začala klesat. Expres HSP70 roste v závislosti na čase a podle Gabriela et al. (1996) je maximální 5 hodin od začátku stresového působení. Pokles syntézy HSP70 po 6 hodinovém šoku může souviset s postupnou adaptací buněk.

### Použitá literatura

- Bienz M., Gurdon J.B.: Cell 29, 811-819, 1982.  
Curci A., Bevilacqua A., Mangia F.: Dev. Biol. 123, 154-160, 1987.  
Curci A., Bevilacqua A., Fiorenza M.T., Mangia F.: Dev. Biol. 144, 362-368, 1991.  
Edwards J.L., Hansen P.J.: Biol. Reprod. 55, 340-346, 1996.  
Gabriel J.E., Ferro J.A., Stefani R.M.P., Ferro M.I.T., Gomes S.L., Macary M.: Brit. Poult. Sci. 37, 443-449, 1996.  
Hyttel P., Viuff D., Fair T., Laurincik J., Thomsen P.D., Callesen H., Vos P.L.A.M., Hendriksen P.J.M., Dieleman S.J., Schellander K., Besenfelder U., Greve T.: Reprod. 122, 21-30, 2001.  
Maloyan A., Palmon A., Horowitz M.: Am. J. Physiol. 276, R1506-R1515, 1999.  
Theodorakis N.G., Drujan D., De Maio A.: J. Biol. Chem. 274, 12081-12086, 1999.

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