

HSP-72 DETECTION IN CHINESE HAMSTER TISSUE CULTURES AFTER A HEAT STRESS

Detekce HSP-72 v tkáňových kulturách křečička čínského po tepelné zátěži

Radko RAJMON¹, Jiří ROZINEK¹, Jaroslav PETR²

¹KVD AF ČZU, ²VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, ODDĚLENÍ REPRODUKČNÍ BIOLOGIE

Souhrn, klíčová slova

Kultury ovariálních a oviduktálních buněk křečička čínského byly vystaveny různě silnému tepelnému šoku (42°C) a různě dlouhé době následného odpočinku. Metodou imunoperoxidázové reakce bylo dokumentováno, že došlo k indukci a kumulaci HSP 72 v míře úměrné zátěži a době odpočinku.

Stres – tepelný šok - HSP-72 – křečička čínská – tkáňové kultury

Summary, keywords

Zde pište souhrn (anglicky), max. 4 řádky

Stress - heat shock - HSP-72 – Chinese hamster – tissue culture

Introduction - Úvod

Živé buňky reagují na řadu stresových podnětů indukcí syntézy specifických bílkovin ze skupiny tzv. proteinů tepelného šoku – HSP. K nejvýznamnějším stresorům navozujícím tvorbu HSPs patří vedle tepelného šoku, hypoxie, hladovění či zánětu také toxické látky (Welch, 1992). Nejsnáze indukovatelnou skupinou stresových proteinů je rodina HSP 70, resp. přímo HSP-72 (Craig, 1985). Cílem experimentu bylo ověřit využitelnost zvolené metodiky pro detekci HSP-72 v buňkách křečička čínského.

Methods - Metody

Buněčné kultury získané z ovarií, resp. sliznice oviduktů křečička čínského byly podrobeny zátěži: - *ovariální buňky*: varianta V_K - 37°C 6 hodin; V₁ - 42°C 2 hodiny + 37°C 2 hodiny; V₂ - 42°C 2 hodiny + 37°C 4 hodiny; V₃ - 42°C 4 hodiny + 37°C 2 hodiny; *oviduktální buňky*: varianta O_K - 37°C 6 hodin; O₁ - 42°C 3 hodiny + 37°C 2 hodiny; O₂ - 42°C 3 hodiny + 37°C 4 hodiny. HSP-72 byly detekovány imunoperoxidázovou reakcí s využitím myši monoklonální anti-HSP 70 protilátky fy Stressgen Biotechnologies Corp., Canada.

Results - discussion – Výsledky - diskuse

Ovariální buňky: u varianty V₃ výrazně reagovala buněčná jádra, u některých buněk i cytoplazma. Cytoplazma ostatních buněk se barvila slabě, ale odlišně od V_K. Varianty V₂ a V₁ reagovaly velmi slabě - výrazněji se barvila pouze cytoplazma jednotlivých buněk, nebylo možné vyloučit, že se jedná o buňky nepřisedlé. U V₂ reagovala zřetelně ojedinělá jádra.

Oviduktální buňky: u O_K se projevila značná variabilita v hladinách HSP 72. Některé buňky se nebarvily vůbec, u některých reagovala jádra a v různé intenzitě cytoplazma. V buňkách O₁ slabě, ale relativně vyrovnaně reagovala jádra, místy výrazněji cytoplazma. O₂ se vyznačovala uniformní výraznou reakcí buněčných jader se zřetelně ohraničenými jádry a místy silnější reakcí cytoplasmy.

Výsledky ukazují, že hladina HSP 72 se zvyšuje jak s délkou tepelného šoku, tak s časem následného odpočinku. Zároveň byla reakce výraznější u buněk se 4-hodinovým tepelným šokem a 2-hodinovým odpočinkem než u buněk s 2-hodinovým šokem a 4-hodinovým odpočinkem. Liu-Sheng a Fox (1996), u CHO buněk po 15-minutové zátěži konstatovali vrchol kumulace HSP 72 za 6 hodin. Dix (1997) udává maximum HSP 72 po 4 hodinách a postupný pokles během 24 hodin

na původní hodnotu. V obou případech byly buňky vystaveny teplotě 45°C. Protože rektální teplota křečka se pohybuje okolo 37°C a CHO buňky coby ustálené linie mohly získat poněkud odlišné vlastnosti, volili jsme v našem sledování zátěžovou teplotu pouze 42°C s delší dobou expozice. Obdobný režim volili např. Multhoff (1995) nebo Richard et al. (1995). Z jejich prací vyplynulo, že při zátěži 42°C je výhodnější delší doba expozice, neboť při časech pod 2 hodiny se nárůst HSP 72 buď neprojeví vůbec, nebo má velmi krátkodobý charakter. Naopak expozice 2-3 hodiny navozovala reakci s vrcholem za 2-4 hodiny. Naproti tomu Wiegant et al. (1996) dosahovali podobného efektu již po 30-minutové expozici při 42°C

Mizivá reakce kontrolních ovariálních buněk a zřetelná reakce buněk po tepelném šoku ukazují, že si užitá primární protilátka i v buňkách křečička čínského zachovává specifitu vazby k induktivnímu typu HSP. Výskyt pozitivní reakce u části kontrolních oviduktálních buněk lze vysvětlit jednak těmito buňkám méně vyhovujícími kultivačními podmínkami, neboť ve srovnání s buňkami ovariálními rostly hůře, jednak se pravděpodobně jednalo o heterogenní buněčné kultury.

References - Použitá literatura

- Craig E.A.: The heat shock response. CRC Crit. Rev. Biochem. 18: 239 - 280, 1985.
- Dix D.J. Hsp70 expression and function during gametogenesis. Cell Stress. Chaperones 2: 73-77, 1997.
- Liu-Sheng H., Fox M.H.: Comparison of flow cytometry and Western blotting to measure HSP 70. Cytometry 25: 280 - 286, 1996.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Müller E., Meier T., Wilmanns W., Issels R.F.: A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP 72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. Int. J. Cancer. 61: 272 - 279, 1995.
- Richards E.H., Hickman J.A., Masters J.R.W.: Heat shock protein expression in testis and bladder cancer cell lines exhibiting differential sensitivity to heat. Br. J. Cancer. 72:620-626, 1995.
- Welch W.J.: Mammalian stress response: Cell physiology, Structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol. Rev. 72 (4): 1063 - 1081, 1992.
- Wiegant F.A.C., Spieker, N., Vandermaast C.A., Vanwijk R.: Is heat shock protein re-induction during tolerance related to the stressor-specific induction of heat shock proteins? J. Cell Physiol. 169: 364-372, 1996.

Řešeno v rámci výzkumného záměru MŠMT 41 21 00003.