ENRICHMENT AND IDENTIFICATION OF SURFACE MARKERS OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN NEONATAL MOUSE TESTES

ANYANEE BUAGEAW

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (PHYSIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6795-4
COPY RIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ENRICHMENT AND IDENTIFICATION OF SURFACE MARKERS OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN NEONATAL MOUSE TESTES

ANYANEE BUAGEAW 4436722 SCPS/D

Ph.D. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHUMPOL PHOLPRAMOOL, Ph.D., STEFAN SCHLATT, Ph.D., YINDEE KITIYANANT, D.V.M., M.Sc., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., KULAWEE SUJARIT, Ph.D.

ABSTRACT

Spermatogenesis is a complex process that occurs throughout adulthood. This process is due to the presence of spermatogonial stem cells (SSCs) on the basement membrane of seminiferous tubules. Although SSCs are important for spermatogenesis, little is known about their biology. The study is hampered by the scarcity of the cell number and the lack of specific biomolecule or surface protein antigen for their enrichment. In this study, Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family receptor α1 (GFRα1), which is believed to be expressed on undifferentiated spermatogonia including SSCs, was used as a surface marker for enrichment of SSCs from the testis of day-10 neonatal CD1/ICR mice by magnetic activated cell sorting (MACS). Cell suspension was obtained after two-step enzymatic digestion of the testes with collagenase and hyaluronidase. Immunocytochemistry with GFRα1, CD9, α6 integrin, and c-kit was performed to determine the number of differentiated and undifferentiated spermatogonia before and after sorting. The stemness of GFRα1 positive cells was confirmed by germ cell transplantation using donor cells from ROSA26 mice whose ages correspond to CD1/ICR mice and contain *Lac Z* transgens. The results showed 4 fold enrichment of GFRα1 positive cells in the sorted fraction. The GFRα1 enriched fraction was co-enriched with the stem cell markers, CD9, and α6 integrin. On the other hand, this fraction was depleted of differentiating germ cell marker, c-kit. In addition, germ cell transplantation analysis showed significantly higher stem cell colonization of the GFRα1 enriched fraction when compared to depleted fraction. The sorted fraction also showed a great enrichment of Oct-4 to nearly 15 fold compared to depleted fraction. It is concluded that GFRα1 can be used as a surface marker for SSCs. The enriched cells exhibit the heterogeneity of developmental potential within the stem cell pool.

KEYWORDS: SPERMATOGONIAL STEM CELLS (SSCs)/ GLIA CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF) FAMILY RECEPTOR α1 (GFRα1)/ ENRICHMENT/ GERM CELL TRANSPLANTATION

138 P. ISBN 974-04-6795-4

การเพิ่มจำนวนและการหาโปรตีนบ่งชี้เฉพาะบนผิวของเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิในอัณฑะของลูกหนูเมาส์ (ENRICHMENT AND IDENTIFICATION OF SURFACE MARKERS OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN NEONATAL MOUSE TESTES)

อัญญานีย์ บัวแก้ว 4436722 SCPS/D

ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชุมพล ผลประมูล, Ph.D., Stefan Schlatt, Ph.D., ยินดี กิติยานันท์ D.V.M., M.Sc., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., กุลวีณ์ สุจริต, Ph.D.

บทคัดย่อ

การสร้างเชื้ออสุจิเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและเกิดขึ้นตลอดช่วงชีวิตของเพศชายหลังเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์โดยอาศัยเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิที่อยู่บริเวณเยื่อบุท่ออสุจิ ถึงแม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจะมีความสำคัญต่อการผลิตเชื้ออสุจิ แต่ความรู้เชิงชีววิทยาของเซลล์ชนิดนี้มีจำกัดทั้งนี้เนื่องจากยังมีอุปสรรคในการศึกษา ตัวอย่างเช่น จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิในลูกอัณฑะมีน้อย ประกอบกับยังขาดความรู้เกี่ยวกับโปรตีนบ่งชี้เฉพาะบนผิวของเซลล์ชนิดนี้ เพื่อใช้ในการแยกและเพิ่มจำนวนเซลล์

การศึกษานี้ใช้โปรตีน GFRα1 ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้เฉพาะบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิเพื่อแยก และ เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิจากอัณฑะของลูกหนูเมาส์สายพันธุ์ CD1/ICR อายุ 10 วัน โดยใช้กระบวนการแยกเซลล์ด้วยลูกปัดแม่เหล็ก (MACS) หลังการเตรียมเซลล์จากอัณฑะลูกหนูให้แขวนลอยในสารละลาย DMEM ด้วยวิธีการย่อยแบบ 2 ขั้นตอน โดยใช้เอนซัยม์ collagenase และ hyaluronidase ย้อมเซลล์แขวนลอยที่ได้ทั้งก่อนและหลังกระบวนการแยกเซลล์ด้วยลูกปัดแม่เหล็กด้วยเทคนิค immunocytochemistry เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีน GFRα1, CD9, α6 integrin และ c-kit บนผิวเซลล์เพื่อบ่งชี้เซลล์สเปอมาโตโกเนีย ชนิดที่เข้าสู่กระบวนการสร้างเชื้ออสุจิแล้ว (differentiated spermatogonia) และที่ยังไม่เข้าสู่กระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (undifferentiated spermatogonia) และทดสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิ ด้วยการปลูกถ่ายเซลล์โดยใช้เซลล์จากหนูสายพันธุ์ ROSA26 อายุเดียวกับหนู สายพันธุ์ CD1/ICR ซึ่งมี *Lac Z* transgene ผลจากการศึกษาพบว่าการใช้โปรตีน GFRα1 เป็นโปรตีนจำเพาะในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ถึง 4 เท่า และยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีนบ่งชี้เฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิชนิดอื่น คือ CD9 และ α6 integrin ร่วมด้วย ในทางกลับกัน สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีน c-kit ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้เฉพาะว่าไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิออกไปจากเซลล์กลุ่มนี้ สำหรับผลการวิเคราะห์จากการปลูกถ่ายเซลล์พบว่าเซลล์กลุ่มนี้มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิมากอย่างมีนัยสำคัญ และยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีน Oct-4 ได้สูงถึง 15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ถูกคัดแยกออก ผลการศึกษาแสดงว่าสามารถใช้โปรตีน GFRα1 เป็นโปรตีนบ่งชี้เฉพาะบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดเชื้ออสุจิได้และเซลล์ที่แยกได้นี้มีความหลากหลายในศักยภาพของการพัฒนากระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ

138 หน้า. ISBN 974-04-6795-4