29 JUL 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

STUDIES OF MAMMLIAN SPERM MEMBRANE MOLECULES INVOLVING IN FERTILIZATION AND CHROMATIN ORGANIZATION DURING SPERMATOGENESIS

WATTANA WEERACHATYANUKUL

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTORAL OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1708-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W344s
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4037886 SCAN/D : MAJOR: ANATOMY; Ph.D. (ANATOMY)
KEY WORDS : FERTILIZATION/ SPERM-EGG INTERACTION/ SPERM/ SULFOGLYCOLIPID/ ARYLSULFATASE A/ CHROMATIN CONDENSATION/ HISTONE/ PROTAMINE

WATTANA WEERACHATYANUKUL: STUDIES OF MAMMALIAN SPERM SURFACE MOLECULES INVOLVING IN FERTILIZATION AND CHROMATIN CONDENSATION DURING SPERMATOGENESIS. THESIS ADVISOR: PRASERT SOBHON, Ph.D.; JISNUSON SVASTI, Ph.D.; PRAPEE SRETARUGSA, Ph.D. 166 p. ISBN 974-04-1708-6

Possession of zona pellucida (ZP) binding ligand(s) on the sperm head surface and the normal degree of chromatin condensation in the nucleus are the fundamental factors of the fertilizing ability for mammalian sperm. In this study, we localize and characterize the properties of two ZP binding ligands on the sperm surface, i.e., arylsulfatase-A (AS-A) and sulfogalactosylglycerolipid (SGG). We also define the detailed organization of chromatin in differentiating spermatids in correlation to the deposition of protamines. We previously described the existence of AS-A on pig sperm surface and its novel role in homologous ZP interaction. This finding prompted us to search for the mechanism of how AS-A targeted to the sperm surface.

Immunolocalization studies revealed the existence of AS-A in the developing acrosome of spermatogenic cells, yet it was found to be absent on the surface of testicular sperm. In contrast, epididymal sperm possessed AS-A on the surface with an increasing amount in caput compared to cauda epididymal sperm. This finding corroborated immunoblotting results which revealed the higher concentration of AS-A in cauda epididymal fluid. Since AS-A had a high affinity to germ cell specific SGG, we tested the plausibility that AS-A in the epididymal fluid was adsorbed onto the sperm surface via its affinity with sperm surface SGG. This was the case as evidenced by the ability of monoclonal antiSGG IgM to block the adsorption of AS-A from epididymal fluid onto testicular sperm surface. Our results have indicated a tight binding between AS-A and SGG with a K_d in nM level without AS-A desulfation activity. These results suggested that the binding of AS-A to SGG may not be through an active pocket, but rather through other binding sites, possibly the exposed clusters of basic amino acids. The results also indicated that AS-A was co-localized with SGG on the sperm surface. Supporting this hypothesis were the results of indirect immunoflurescence using antiAS-A or antiSGG that localized the two molecules to the same area on mouse sperm heads, i.e., the postacrosome and convex ridge over the acrosome. These antibodies were able to inhibit sperm-ZP interaction in the concentration dependent manner. The binding of fluorescently labeled AS-A or SGG liposomes to unfertilized ZP (but not to fertilized ones) approached the plateau with the K_d = 0.21 μM for AS-A binding. All of these results implicated the fundamental role of AS-A and SGG, that may act synergistically, in ZP binding.

Dr. P Sobhon and his colleagues have previously shown the cord-like chromatin fibers in chemically decondensed rat sperm, which appear different to other mammals (toroidal type). To confirm the presence of a cord-like chromatin unit in situ, the detailed ultrastructure of chromatin fibers in rat spermatids was performed in correlation with the deposition of protamines. The results revealed 30-nm nucleosomal chromatin fibers of spermatid steps 1-8. The chromatin fibers became 50-nm cord-like fibers, in spermatid steps 10-12 and became thicker until reaching the maximum diameter of 100 nm in spermatid steps 15-17. This cord-like chromatin organization correlated with the onset of protamine deposition in spermatid steps 10-11 and it also suggested that more compaction of rat sperm chromatin than that in humans which may be due in part to the cord-like rather than toroidal organization of chromatin fibers.

©Copyright by Mahidol University

4037886 SCAN/D : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; ปร.ค. (กายวิภาคศาสตร์)

วัฒนา วีรชาติยานุกูล : การศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิบนผิวเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และการเรียงตัวของเส้นใยโครมาตินในขบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (STUDIES OF MAMMLIAN SPERM MEMBRANE MOLECULES INVOLVING IN FERTILIZATION AND CHROMATIN ORGANIZATION DURING SPERMATOGENESIS). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประเสริฐ โศภน, Ph.D., ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, Ph.D., ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph.D. 166 หน้า ISBN 974-04-1708-6

ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือการที่เซลล์ดังกล่าว จะต้องมีโมเลกุล ที่จำเป็นต่อการเกาะเกี่ยวกับ zona pellucida (ZP) ของไข่ และมีการขดตัว ของเส้นใยโครมาตินที่ปกติ ในการศึกษาครั้งนี้เรามุ่งเน้นการทดลองไปที่โมเลกุลที่อยู่บนผิวของอสุจิหนู rat และมนุษย์ คือ arylsulphatase-A (AS-A) และ sulfogalactosylglycerolipid (SGG) ซึ่งเราตั้งสมมติฐานไว้ว่าโมเลกุลทั้งสองชนิดนี้ มีหน้าที่เกาะเกี่ยวกับ ZP ของไข่ นอกจากนี้เรายังทำการศึกษาการขดตัวของเส้นใยโครมาตินของเซลล์ในขั้นตอนการสร้างอสุจิ ร่วมกับการย้อมเซลล์เหล่านี้ด้วยแอนติบอดีต่อ protamine เพื่อดูความสอดคล้องของโปรตีนชนิดนี้กับการหดตัวของเส้นใยโครมาติน

การศึกษาที่ผ่านมาเราพบว่า AS-A ปรากฏอยู่บนผิวของเซลล์อสุจิหมู และทำหน้าที่ในการเกาะเกี่ยว ZP ของไข่หมู ผลการทดลองนี้นำไปสู่การค้นหากลไกในการสร้างและปรากฏของ AS-A บนผิวเซลล์อสุจิและหน้าที่ของโปรตีนนี้ใน ขั้นตอนการปฏิสนธิ การศึกษาตำแหน่งของ AS-A ในเซลล์ขั้นตอนการสร้างเซลล์อสุจิ เราพบ AS-A เฉพาะในส่วนของ Acrosome การปรากฏของ AS-A บนผิวเซลล์อสุจิเริ่มพบได้ในเซลล์อสุจิบริเวณ caput epididymis และปรากฏมากขึ้นเมื่อเซลล์อสุจิเคลื่อนไปอยู่ใน cauda epididymis ซึ่งสอดคล้องกับผลของการย้อมโปรตีนบนแผ่นเยื่อ (immunoblotting) ที่สามารถพบ AS-A ในของเหลวที่อยู่ใน caput และพบมากขึ้นใน cauda epididymis โมเลกุล AS-A ที่อยู่ในของเหลวนี้สามารถซึมซาบไปยังผิวของเซลล์อสุจิที่นำมาจากอัณฑะ (ซึ่งไม่เคยปรากฏ AS-A บนผิวมาก่อน) และขบวนการซึมซาบนี้ถูกควบคุมโดย SGG บนผิวเซลล์อสุจิ ข้อมูลนี้บ่งบอกถึงการปรากฏร่วมกัน (co-localization) ของโมเลกุลทั้งสองชนิดบนผิวเซลล์อสุจิ โดยไม่มีการย่อยสลายกลุ่มซัลเฟตของ SGG ซึ่งนำไปสู่สมมติฐานที่ว่า AS-A ไม่ได้อาศัย active site ในการซึมซาบบน SGG การทดลองโดยใช้แอนติบอดีต่อ AS-A หรือ SGG บดบังโมเลกุลทั้งสองชนิดนี้บนผิวเซลล์อสุจิ เพื่อทดสอบหน้าที่ของ AS-A ในการเกาะเกี่ยว ZP ของไข่ พบว่าประสิทธิภาพการเกาะของเซลล์อสุจิลดลงตามการเพิ่มจำนวนของแอนติบอดี เราทำการทดลองเพื่อยืนยันหน้าที่ของทั้งสองโมเลกุล โดยใช้ AS-A หรือ SGG ที่ติดฉลากสารเรืองแสง และพบว่าโมเลกุลทั้งสองสามารถเกาะเกี่ยวกับ ZP ของไข่ที่ยังไม่ปฏิสนธิ แต่ไม่เกาะเกี่ยวกับไข่ที่ปฏิสนธิแล้ว ค่า K_d ของการเกาะเกี่ยวสำหรับ AS-A มีค่าเท่ากับ 0.21 μM

การศึกษาที่ผ่านมาของ ดร. ประเสริฐ โศภน และคณะ พบว่าเส้นใยโครมาตินของหนู rat ที่เซลล์อสุจิถูกย่อยด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ มีลักษณะเป็นแบบเส้นครงทึบ (cord-like) ซึ่งแตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ที่เป็นแบบชนิดขดกลมทึบ (toroidal หรือ nodular) ในการศึกษาครั้งนี้ เรามุ่งหวังที่จะพิสูจน์ว่า ลักษณะของเส้นใยโครมาตินดังกล่าว ปรากฏในขั้นตอนการขดตัวของเส้นใยโครมาติน ของเซลล์ในระยะการสร้างเซลล์อสุจิ ผลการทดลองเราพบว่า รูปแบบการขดตัวของโครมาตินดังกล่าวเกิดขึ้นใน spermatids ระยะ 10-12 และจะเปลี่ยนแปลงเป็นแบบเส้นใยหนาทึบที่อัดกันแน่นตามลำดับในเซลล์ของขั้นตอนการสร้างอสุจิระยะ 15-17 จากการย้อมดูการกระจายตัวของ protamine พบว่าโปรตีนดังกล่าวเริ่มปรากฏขึ้นใน spermatids ระยะที่ 10-11 ซึ่งสอดคล้องกับการขดตัวของเส้นใยโครมาตินแบบเส้นตรงทึบ ในเซลล์ระยะดังกล่าว สิ่งที่ยังคงเป็นคำถามต่อไปคือ กลไกการควบคุมของ protamine ที่ทำให้เกิดการขดตัวของโครมาตินในสัตว์ชนิดต่าง ๆ เป็นอย่างไร

Copyright by Mahidol University