LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

18 JUN 2003

SPERMATOGENESIS AND CHROMATIN ORGANIZATION IN THE MALE GERM CELLS OF RANA TIGERINA

SIRIKUL MANOCHANTR

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

ISBN 974-04-1989-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S619sp
2002
c.2

4038397 SCAN/D : MAJOR : ANATOMY; Ph.D. (ANATOMY)
KEY WORDS : RANA TIGERINA / SPERMATOGENESIS / CHROMATIN

SIRIKUL MANOCHANTR: SPERMATOGENESIS AND CHROMATIN ORGANIZATION IN THE MALE GERM CELLS OF RANA TIGERINA. THESIS ADVISORS: PRASERT SOBHON, Ph.D., PRAPEE SRETARUGSA, Ph.D., JITTIPAN CHAVADEJ, Ph.D. 268 p. ISBN 974-04-1989-5

The aims of this investigation are: (1) to classify the male germ cells in *R. tigerina* and study their chromatin organization and condensation by light and electron microscopy, chromatin decondensation, and digestion with micrococcal nuclease; (2) to study the basic nuclear protein profile in these germ cells by acid/urea/triton X gel electrophoresis; (3) to determine the sequence of changes of basic nuclear proteins by immunoelectron microscopy.

R. tigerina testis is composed of numerous seminiferous tubules surrounded by basement membranes. Each tubule contains various stages of developing male germ cells within a spermatocyst surrounded by processes of follicular cells. Cells in each cyst may be derived from a single spermatogonium. Male germ cells of *R.tigerina,* as studied by light and transmission electron microscopy, can be classified into 14 stages based on the pattern and degree of chromatin condensation. There are two stages of spermatogonia (Sg1, Sg2) containing large spherical nucleus with mostly euchromatin (Sg1), and increasing number of small heterochromatin blocks (Sg2). Primary spermatocytes are divided into 6 stages. Leptotene spermatocyte (LSc) contains fine chromatin threads about 30 nm that start to fold around a single electron dense line, the condensation axis, into loosely packed chromatin blocks. Heterochromatin blocks increase in length and thickness in zygotene spermatocyte (ZSc) which are joined together by synaptonemal complexes. Pachytene spermatocyte (PSc) shows long and thick intertwined heterochromatin blocks or cords. These chromatin blocks are distributed in a cartwheel pattern in diplotene spermatocyte (DSc). Long and large heterochromatin blocks are separating from each other during diakinesis stage and become aligned along the equatorial region in metaphase spermatocyte (MSc). Throughout the transformation of spermatogonia to primary spermatocytes, 30 nm chromatin fibers become increasing condensed into heterochromatin blocks of various sizes, while 10 nm fibers are decreasing in quantity until absent entirely in metaphase spermatocyte. Secondary spermatocyte has a nucleus that contains 4-6 large blocks of heterochromatin along the inner facet of the nuclear envelope, whose 30 nm fibers are loosened up and 10 nm fibers start to reappear. Spermatids can be divided into 4 stages. During the transition of secondary spermatocyte to spermatid I (St1) the dense chromosomes are reorganized into evenly distributed 30 and 10 nm fibers. Thereafter, chromatin fibers (30 nm) are packed together and become increasingly condensed in spermatid II (St2), while its nucleus is decreased in size and becomes oval shape. In spermatid III (St3), the nucleus becomes elongated and its contains 30 nm chromatin fibers which are aggregated more tightly and evenly together, while 10 nm fibers disappear. In spermatid IV (St4), the nucleus becomes highly elongated into cylindrical shape, with a small acrosome covering the anterior pole; and the chromatin is highly condensed but the outline of 30 nm fibers could still be observed. The spermatozoa (Sz) had elongated cylindrical shape head that contains completely electron opaque chromatin. The head is covered by a small acrosome. The midpiece is composed of centriolar complex surrounded by striated cylindrical fibrous sheath and non-helical mitochondrial sheath. The rest of the tail consists of only the axoneme complex surrounded by plasma membrane. The condensation of chromatin in *Rana* spermatozoa is, therefore, similar to the process of heterochromatization in somatic cells, where 30 nm fibers are coalesced together without changing the initial size and nucleosomal organization. This conclusion is supported by the finding that the full set of core histones (H2A, H2B, H3, H4) are still present in sperm chromatin, but with H1 variants replacing H1. Rabbit anti sera were raised against histone H3, H1, H1V, and H5. Anti-histone H1 antiserum cross-reacts with histone H1V which may have a common epitope with H1. Anti-histone H1V and H5 also show cross-reaction with each other but not with histone H1which may be due to the presence of common epitope not shared by histone H1. Immunolocalization of histones in LR White-embedded testis sections indicated that histone H3, H1 are present in all stages of male germ cells including Sertoli cells, Leydig cells and red blood cells. Histone H1V and H5 are detected in spermatids (St1-St4) and spermatozoa whose chromatin are undergoing increasing condensation. They are also detected in metaphase spermatocytes and red blood cells. Thus the nucleosomal organization of chromatin persists until spermatozoa and the complete condensation may be brought about by H1V. Both micrococcal nuclease digestion and electron microscopy of sperm chromatin decondensed by egg cytoplasmic extract and distilled water also provided further supporting evidence that sperm chromatin consists of nucleosomal organization. Chromatin condensation in spermatozoa probably use a similar mechanism as occurring in the process of heterochromatization in fully differentiated somatic cells, such as, in frog and chick erythrocytes, which H5 (another form of H1 variant) initiates the final and complete condensation of 30 nm nucleosomal type fibers.

4038397 SCAN/D : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์; ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)

ศิริกุล มะโนจันทร์ : กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการจัดระดับของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนา (SPERMATOGENESIS AND CHROMATIN ORGANIZTION IN THE MALE GERM CELLS OF RANA TIGERINA). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประเสริฐ โศภน, Ph.D., ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph.D., จิตติพันธ์ ชวเดช, Ph.D. 268 หน้า. ISBN 974-04-1989-5

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ (1) การศึกษากระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และลักษณะการจัดระดับการเรียงตัวของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนา โดยการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และศึกษาใยโครมาตินที่ถูกคลี่ออกโดยสารสกัดจากไข่และน้ำกลั่น และศึกษาลักษณะ DNA ของเซลล์อสุจิโดยการย่อยด้วย micrococcal nuclease (2) การศึกษาเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนา (3) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของเบสิกนิวเคลียโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ด้วยวิธี immunocytochemmistry โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษาโครงสร้างของต่อมอัณฑะกบนาตัวโตเต็มวัย ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา พบว่าต่อมอัณฑะประกอบด้วยท่ออัณฑะขนาดเล็กจำนวนมาก แต่ละท่อบรรจุเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ ซึ่งถูกโอบรอบโดยไซโตปลาสซึมของ folliculo - Sertoli cell ที่กลายเป็น spermatocyst เซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละ cyst น่าจะเป็นเซลล์รุ่นเดียวกันที่มีกำเนิดมาจากเซลล์ spermatogonium ขั้นตอนของกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถแยกตามขนาด, รูปร่างของนิวเคลียส และตามลักษณะการจัดลำดับการขดตัวของใยโครมาตินได้ 14 ขั้นดังนี้ เซลล์ spermatogonia มีสองระยะ (Sg1, Sg2) Sg1 มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนมาก ใยโครมาตินมีการจัดเรียงตัวเป็นสองระดับ คือ 10 และ 30 นาโนเมตร Sg2 มีการเกาะกลุ่มของก้อน heterochromatin ขนาดเล็กที่ด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียสและกระจายอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียส primary spermatocyte แบ่งเป็น 6 ระยะ คือ leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), diakinesis (DiSc) และ metaphase (MSc) นิวเคลียสของ LSc บรรจุใยโครมาตินขนาด 30 นาโนเมตร กระจายอยู่ทั่วไปและบางแห่งเริ่มขดพันรอบๆ แกนการขดตัว (condensation axis) กลายเป็นก้อน hetrochromatin ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีจำนวนมากขึ้นในระยะท้ายของ LSc ก้อนโครมาตินมีขนาดใหญ่มากขึ้นในระยะ ZSc และบางส่วนยึดติดกันโดย synaptonemal complex ก้อน heterchromatin ขดแน่นเป็นท่อนขนาดใหญ่ต่อเนื่องกันและกลายเป็นท่อนยาวในระยะ PSc และ DSc ท่อน heterochromatin กลายเป็นโครโมโซมในขั้น DiSc ขยายใหญ่ขึ้นและท่อนโครโมโซมนี้จะถูกแยกออกจากกันและเคลื่อนไปอยู่ที่แนวกลางในขั้น MSc ในช่วงต่างๆ ของ primary spermatocyte ใยโครมาตินขนาด 30 นาโนเมตร มีการขดตัวจัดเป็นก้อน heterochromatin ขนาดต่าง ๆ กัน ในขณะที่ใยโครมาตินขนาด 10 นาโนเมตร มีจำนวนลดลงและไม่ปรากฏในระยะ MSc Secondary spermatocyte (SSc) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีก้อน heterchromatin ขนาดใหญ่ เกาะกลุ่มตามขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและที่บริเวณส่วนกลางของนิวเคลียส ใยโครมาตินขนาด 30 นาโนเมตร เริ่มคลี่ตัวออกและเริ่มปรากฏเส้นใยขนาด 10 นาโนเมตรอีกครั้ง จากช่วง SSc ไป St1 พบว่า โครมาตินที่เคยพันกันแน่นจะมีการจัดเรียงตัวใหม่ประกอบด้วยใยโครมาตินขนาด 10 และ 30 นาโนเมตรกระจายตัวอยู่อย่างหลวมๆ แต่สม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส หลังจากนั้นในระยะ St2 ใยโครมาตินเริ่มมีการขดตัวเข้าหากันจนทำให้นิวเคลียสมีขนาดเล็กลงและเปลี่ยนรูปร่างจากทรงกลมเป็นทรงรี ในระยะ St3 นิวเคลียสมีรูปร่างยาวมากขึ้นและใยโครมาตินขนาด 30 นาโนเมตรขดพันกันหนาแน่นมากขึ้นแต่ยังกระจายอยู่เกือบสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียสและไม่พบใยโครมาติน ขนาด 10 นาโนเมตร ระยะ St3 นิวเคลียสมีรูปร่างยาวมากจนกลายเป็นรูปทรงกระบอก โครมาตินขดแน่นทั่วทั้งนิวเคลียสแต่ยังสามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเส้นใยขนาด 30 นาโนเมตรแต่ละเส้นอยู่ เซลล์อสุจิขั้นสมบูรณ์ มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกระบอกเรียวยาว ภายในบรรจุโครมาตินที่มีการขดตัวแน่นทึบ มี acrosome คลุมอยู่ทางด้านหน้า ส่วน midpiece ประกอบด้วย centriole ที่ถูกล้อมรอบด้วย cylindrical fibrous sheath ที่มีลักษณะลาย และมีไมโตคอนเดรียกระจายอยู่รอบๆ ส่วนหางที่เหลือประกอบด้วย axoneme ที่ล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษาโดยใช้ AUT PAGE พบว่าโครมาตินของเซลล์อสุจิยังมี nucleosomal core histone (H2A, H2B, H3, H4) และ variant of H1 (H1V) ซึ่งแทนที่ H1 เมื่อทดสอบปฏิกริยาข้ามชนิดของแอนติบอดีต่อ H3, H1, H1V และ H5โดยวิธี immunoblotting พบว่าแอนติบอดีต่อ H1 มีปฏิกิริยาข้ามชนิด กับ H1V ในขณะที่ แอนติบอดีต่อ H1V ไม่มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับ H1 ซึ่งหมายความว่าแอนติบอดีต่อ H1 สามารถจับกับ epitope ร่วมของ H1V และ H1 ในขณะที่แอนติบอดีต่อ H1V จับกับ epitope ของ H1V ที่ไม่มีใน H1 นอกจากนั้นยังพบปฏิกิริยาข้ามชนิดระหว่าง H1V และ H5 จึงหมายถึงการมี epitope ร่วมกันระหว่างโปรตีนสองชนิดนี้ ดังนั้น H1, H1V และ H5 ซึ่งอาจเป็นโปรตีนกลุ่มเดียวกันที่มีกำเนิดมาจากยีนอันเดียวกัน เมื่อย้อมเนื้อเยื่อของต่อมอัณฑะของกบนาด้วยแอนติบอดีต่อ H3 และ H1 พบว่า H3 และ H1 มีการกระจายอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ทุกระยะ รวมทั้ง folliculo-Sertoli cell, Leydig cell, และเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ H1V และ H5 พบว่า H1V และ H5 มีการกระจายอยู่เฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์ในระยะ spermatids และ spermatozoa รวมทั้ง MSc และเม็ดเลือดแดง การกระจายของ H3 ในเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatids (I – IV) และ spermatozoa แสดงว่า nucleosomal organization ยังคงรูปอยู่ในเซลล์ทุกระยะและ H1V อาจเป็นตัวกระตุ้นการขดตัวของใยโครมาติน การศึกษาการคลี่ของใยโครมาตินจากเซลล์อสุจิด้วยสารสกัดจากไข่และน้ำกลั่น พบว่า มีใยโครมาติน ขนาด 10 และ 30 นาโนเมตร ปรากฏอยู่ การย่อย ด้วยเอนไซม์ micrococcal nuclease ยังแสดงว่ามี nucleosome อยู่ในโครมาตินของเซลล์สืบพันธุ์ทุกระยะรวมทั้งเซลล์อสุจิ ดังนั้น การขดตัวของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนาซึ่งคล้ายกับการขดตัวของใยโครมาตินที่สร้างเป็นแท่งโครโมโซมขณะที่เซลล์แบ่งตัวหรือการขดของใยโครมาตินที่กลายเป็นโครมาตินแน่นทึบ (heterochromatin) ในนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายที่ปรับสภาพเต็มที่แล้ว เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงของกบและไก่ ซึ่งใช้ H5 ที่มีลักษณะคล้าย H1V มาก และเป็น H1V อีกชนิดหนึ่ง