

# Transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in the cytoplasm of maturing oocytes

Dawid Wolaniuk

# Cel: Zbadanie zachowania jądra plemnika wewnątrz cytoplazmy oocyty w zależności od ilości wnिकniętych plemników

- Pozbawione otoczki przejrzystej oocyty myszy zostały zapłodnione w prometafazie I lub metafazie I w czasie meiotycznego dojrzewania in vitro
- Jeżeli do oocyty wnिकnęło więcej niż trzy plemniki to dojrzewanie oocyty w późniejszej inkubacji zostało zatrzymane w metafazie II.
- Tymczasem każde jądro plemnika podlegało szeregowi zmian po wnिकnięciu do cytoplazmy oocyty

# Zmiany morfologii chromatyny po wniknięciu plemnika:

- Chromatyna ulega lekkiemu rozproszeniu. Po 6h po zapłodnieniu zaczyna ulegać kondensacji. Pomiędzy 12-18h od zapłodnienia z grudek kondensującej chromatyny powstają chromosomy.
- Jeżeli jednak do oocyty wniknęło 4-6 plemników to oocyt zostanie zatrzymany w metafazie I a każde jądro plemnikowe utworzy grudki chromatyny a nie chromosomy metafazowe.
- Jeżeli do oocyty wniknęło więcej niż 6 plemników to matczyne chromosomy zaczynały dekondensować lub ulegać pyknozie a jądra plemników tworzyły skupienia chromatyny
- W oocytach poddanych ekspozycji na dbcAMP nie zaobserwowano zmian morfologicznych chromatyny
- Jako kontroli użyto dojrzewających lub dojrziałych oocytów zablokowanych w metafazie II które potem zapładniano

# Materiały i metody

- Dojrzałym płciowo myszom podano 5 IU PMSG i zabito je 48h później
- Jajniki przeniesiono do pożywki L-15 zawierającej 15  $\mu\text{g}$  dbcAMP co zapobiega spontanicznemu GVDB
- Oocyty przeniesiono do pożywki Brinstera i inkubowano przez:
  1. 2h (oocyty w prometafazie I)
  2. 8-9h (oocyty w metafazie I)
  3. 18-21h (oocyty w metafazie II)
- Usunięto otoczkę przejrzystą żeby zwiększyć szansę na zapłodnienie trzymając oocyty w 0,005% roztworze  $\alpha$ -chymotrypsyny lub trzymano je w roztworze o pH=3,0 (jednak często pozostawały fragmenty otoczki dlatego korzystano głównie z metody enzymatycznej)
- Oocyty przepłukiwano w pożywce L-15 i pożywce F i przeniesiono je do naczynia z 0,5ml pożywki F (tak traktowano mające być zapłodnione oocyty i plemniki żeby poddać je kapacytacji)

# Zbieranie plemników:

- Wycięto nasieniowody z dojrzałego płciowo samca myszy i umieszczono w naczyniu z pożywką F
- Nasienie wyciśnięto za pomocą szczypiec z każdego nasieniowodu
- Wyekstrahowane plemniki rozproszono i inkubowano przez 15 min
- Pobrano 75  $\mu$ l zawiesiny i rozcieńczono w 0,5 ml pożywki F.
- Tak rozcieńczone plemniki inkubowano przez 45 min aby plemniki mogły ulec kapacytacji

## Inseminacja i dalsza inkubacja:

- Zmierzoną objętość rozcieńczonej zawiesiny plemników rozdzielono do naczyń zawierających oocyty zawieszona w 0,5ml pożywki F
- Każde naczynie zawierało 20-50 oocytów, do każdego naczynia dodawano różne objętości zawiesiny plemników 0,5-50  $\mu$ l.
- Naczynia wstawiono do inkubacji na 45 min. Po tym czasie oocyty przeniesiono do roztworu Whittens'a i trzymano tak przez 3-30h

## Przygotowanie i barwienie:

- Oocyty utrwalano przez kilka minut i wybarwiane barwnikiem Giemzy

# Wyniki:

- **MONOSPERMIA:**

- Prześlędzono i zbadano czy penetracja dojrzałych oocytów przez plemniki może oddziaływać z postępem mejozy lub zatrzymaniem w metafazie II.
- Oocyty były zapładniane w prometafazie I lub metafazie I i inkubowane przez różną długość czasu (Oocyty niezapłodnione posłużyły jako kontrola)
- Oocyty zapłodnione w **prometafazie I**:
  1. **9h** inkubacji-19% osiągnęło metafazę II ( aż 44% oocytów kontrolnych osiągnęło metafazę II)
  2. **12h** inkubacji- 82% osiągnęło metafazę II ( 89% oocytów kontrolnych osiągnęło metafazę II)
- **Penetracja plemników w prometafazie I może opóźnić mejozę ale nie osłabia możliwości dokończenia dojrzewania i zatrzymania w metafazie II**

- Oocyty zapłodnione w **metafazie I**:
- 9h inkubacji- ponad 90% w każdej z grup osiągnęło stadium metafazy II  
(Wniknięcie plemników nie opóźnia pierwszego podziału meiotycznego)
- Po 18h większość oocytów miała matczyne chromosomy podobne morfologicznie do tych z grupy kontrolnej (fig. 1a)

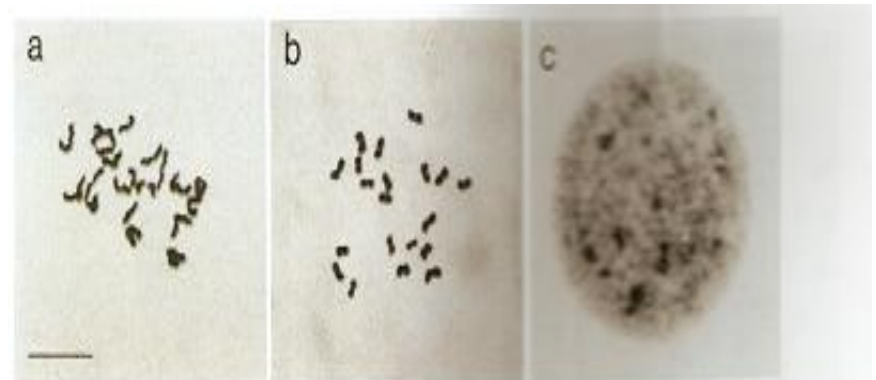
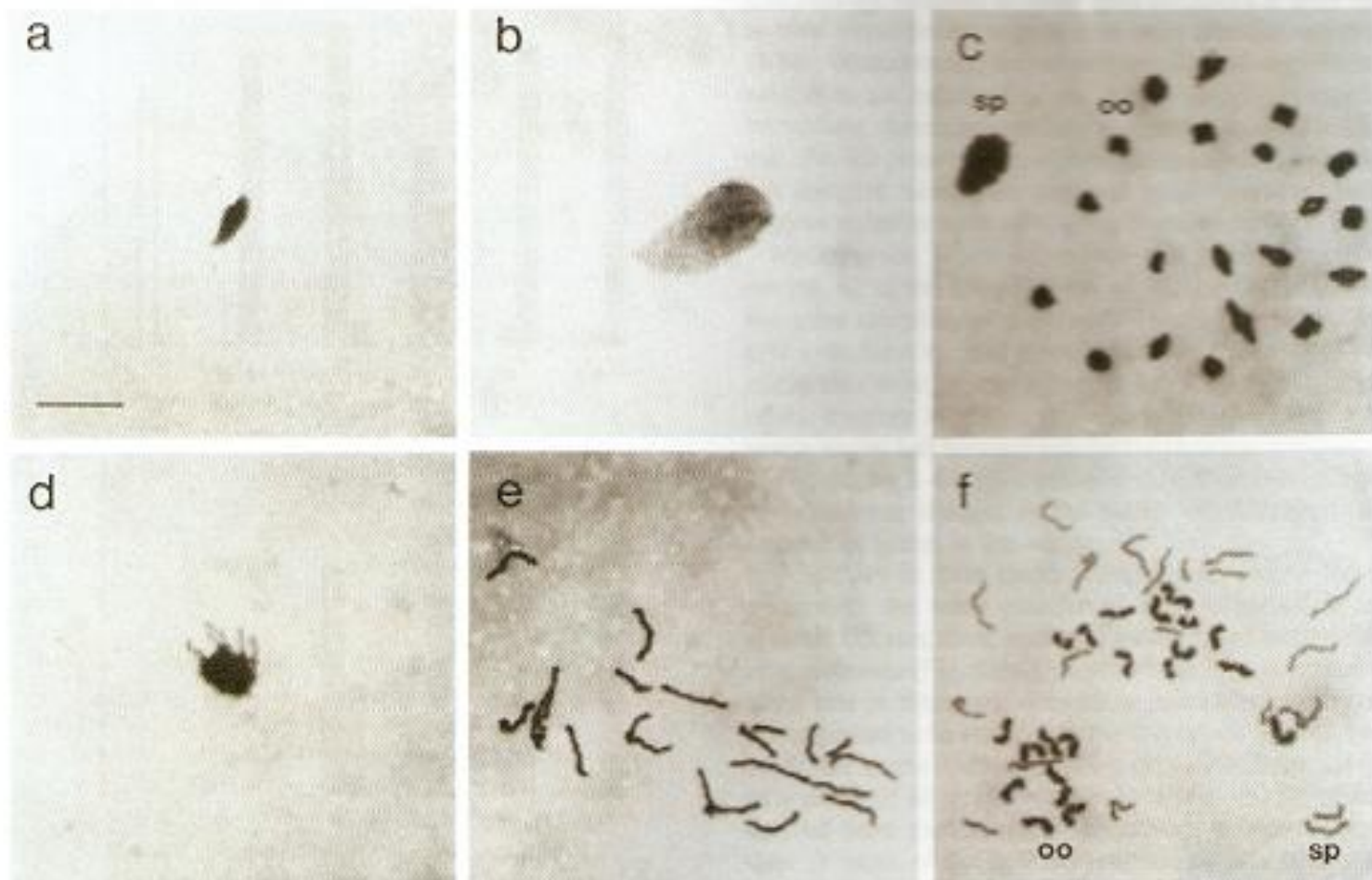


Figure 1. Morphology of the maternal chromosomes in oocytes inseminated at pro-metaphase I and incubated for 18 h. (a) Control oocyte; (b) monospermic oocyte; (c) highly polyspermic oocyte (7 sperm). Bar, 10  $\mu$ m.



# Zmiany morfologiczne chromatyny w przypadku monospermii

- 3h po zapłodnieniu chromatyna plemnikowa zaczęła się rozpraszać (ale nie tak rozlegle jak żeńskie przedjądrze) zachował się prostokątny kształt nienaruszonego plemnika.
- 6h po zapłodnieniu rozproszona chromatyna zaczęła kondensować tak że można było zauważyć małe zgrupowania chromatyny (fig. 4c) oraz po kilku godzinach możnabyło zaobserwować małe ramiona wyłaniające się z tej masy (fig. 4d)
- 12-18h po zapłodnieniu można obserwować chromosomy (fig. 4 e, f)
- Plemnikowe chromosomy można było łatwo wyróżnić nawet jeśli mieszały się z chromosomami matczynymi (chromosomy plemnikowe były dłuższe i cieńsze; były zbudowane z jednej chromatydy a matczyne z dwóch)



*Figure 4.* Changes in the morphology of the sperm chromatin in monospermic oocytes, inseminated at prometaphase I and incubated for the indicated lengths of time. (*a*) Untransformed sperm nucleus (0 h); (*b*) dispersed chromatin (3 h); (*c*) mass of recondensed chromatin (*sp*), with maternal chromosomes (*oo*) at metaphase I (9 h); (*d*) chromosomal arms projecting from the mass (12 h); (*e*) individually separated sperm chromosomes (18 h); (*f*) individually separated sperm chromosomes (*sp*), mingled with darker-stained maternal chromosomes (*oo*) at metaphase II (18 h). Bar, 10  $\mu$ m.

•Rysunek 5 pokazuje czasową sekwencję zmian morfologii jądra plemnikowego w dojrzałym oocyte (chromosomy zostały zaklasyfikowane jako metafazowe)

- 18h po zapłodnieniu plemnikowe chromosomy metafazowe widać w 90% spenetrowanych oocytów.
- Formowanie się chromosomów może być nieco szybsze w oocytach zapłodnionych w metafazie I niż w prometafazie I
- Chromosomy znajdujące się w oocytach zapłodnionych w prometafazie I wydają się jednak lepiej skondensowane (nawet jeśli inkubowano je przez ten sam okres czasu)

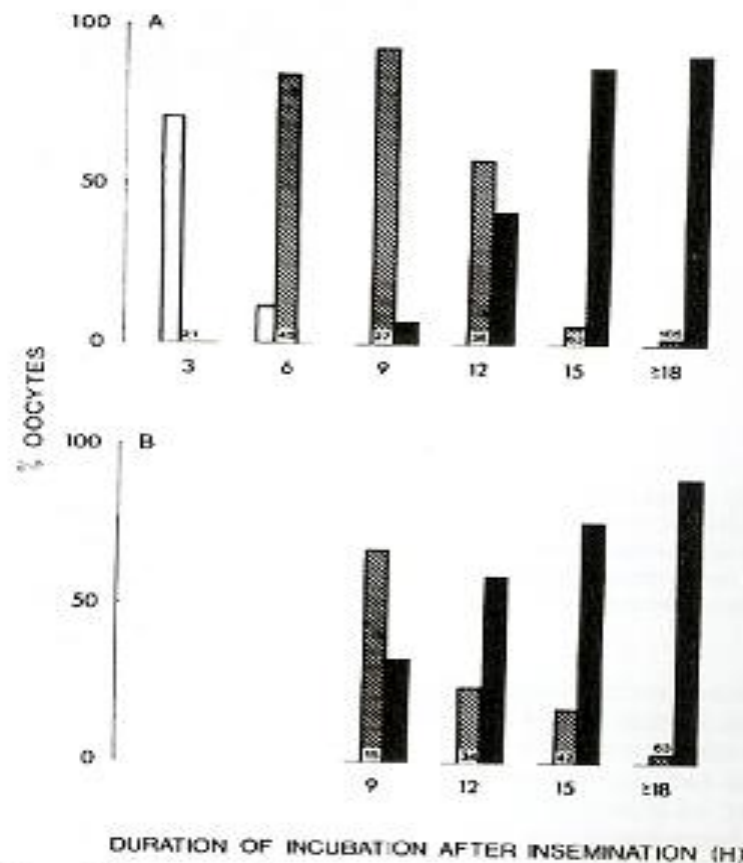


Figure 5. Sequence of changes in sperm chromatin morphology in monospermic oocytes. Oocytes at prometaphase I (A) or metaphase I (B) were inseminated and incubated for 3–18 h. The sperm chromatin was classified according to criteria described in the text. The bars do not sum to 100% at every time point, since the sperm in some oocytes could not be classified into any of these categories. The numbers of oocytes examined are shown along the abscissa. □, Dispersed chromatin; ▨, mass of recondensed chromatin; ■, metaphase chromosomes.

- W oocytach zapłodnionych w **prometafazie I** mieszanie się chromosomów plemnikowych i matczynych obserwowano w  $\frac{2}{3}$  przypadków (inkubacja przez 15h lub nawet dłużej 24h po zapłodnieniu)
- W oocytach zapłodnionych w **metafazie I** obserwowano tworzenie się osobnych zgrupowań matczynych i plemnikowych chromosomów (15-18h inkubacji po zapłodnieniu), mieszanie się chromosomów obserwowano dopiero po 20-24h po zapłodnieniu.
- **Świadczy to o wpływie cytoplazmy oocyta która sprowadza chromosomy metafazowe do tego samego położenia**

- **POLISPERMIA:**

- Oocyty zapłodnione w prometafazie I inkubowano przez 18h:
- Oocyty do których wniknęły więcej niż dwa plemniki zostały zatrzymane w mejozie w sposób zależny od ilości wnikniętych plemników:
  - Oocyty spenetrowane przez 3, 4 lub 5 plemników zazwyczaj zatrzymywały się w metafazie I. Skracanie się i grubienie matczynych chromosomów które rzadko zdarzało się w wypadku monospermii teraz pojawiało się znacznie częściej (czasami nie można było wyróżnić chromatyd)
  - W oocytach spenetrowanych przez więcej niż 6 plemników matczyne chromosomy dekondują i przybierają formę granularną lub postać nitkowatą (fig. 1c). Powinny być widoczne po 6h inkubacji ale nawet po 9h nie obserwuje się ich.

# Zmiany morfologiczne chromatyny w przypadku polispermii:

- Wniknięcie 2 plemników powoduje te same zmiany w strukturze chromatyny co w przypadku monospermii (każdy z nich przekształcił się w metafazowe chromosomy; fig. 6a)
- Wniknięcie 3 plemników opóźnia nieco transformację w metafazowe chromosomy (jeden lub więcej zestawów chromosomów plemnikowych mieszał się z chromosomami matczynymi)
- Wniknięcie 4 plemników powoduje spadek ilości transformacji w metafazowe chromosomy-  $\frac{1}{3}$  przypadków (fig. 7); w pozostałych  $\frac{2}{3}$  przypadków nie obserwowano transformacji w metafazowe chromosomy.
- Wniknięcie więcej niż 4 plemników skutkuje brakiem transformacji chromatyny jąder plemnikowych w metafazowe chromosomy nawet po 24h inkubacji.

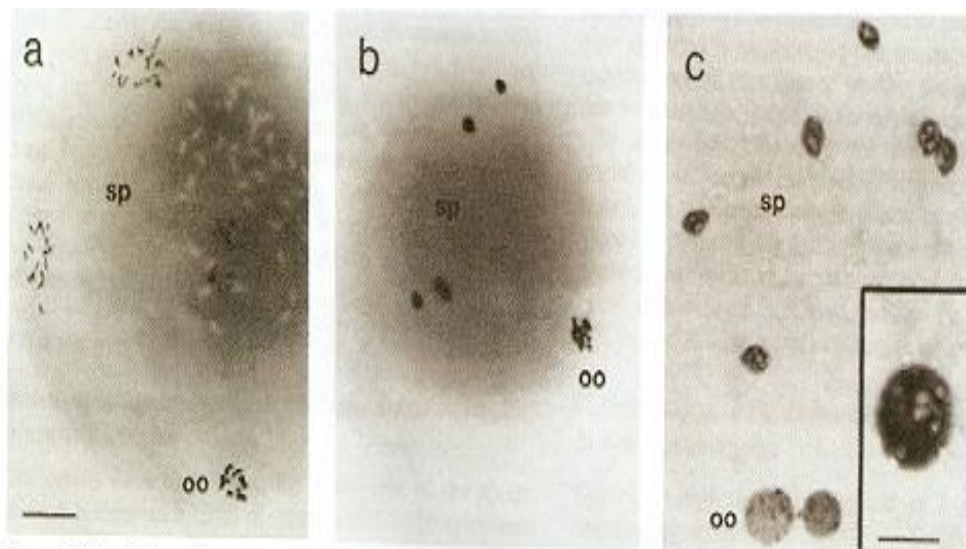


Figure 6. Morphology of sperm chromatin in polyspermic oocytes, inseminated at prometaphase I and incubated for  $\approx 18$  h. (a) Oocyte penetrated by three sperm. Metaphase sperm (*sp*) and maternal (*oo*) chromosomes are visible. (b) Oocyte penetrated by five sperm. Sperm chromatin masses (*sp*) and metaphase maternal chromosomes (*oo*) are visible. (c) Oocyte penetrated by seven sperm. Six sperm chromatin masses (*sp*) and decondensed maternal chromatin (*oo*) are visible. Bar, 25  $\mu$ m. (Inset) Higher magnification of sperm chromatin within another highly polyspermic oocyte. Bar in inset, 10  $\mu$ m.

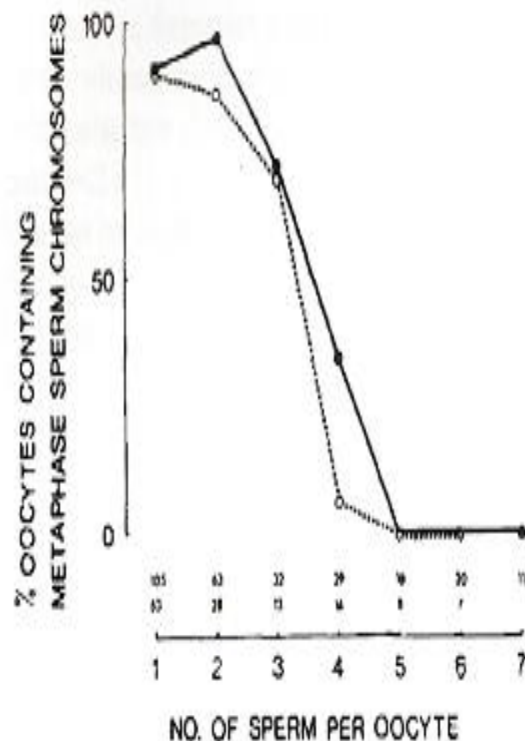


Figure 7. Effect of polyspermy on transformation of sperm  $n$  into metaphase chromosomes. Oocytes at prometaphase I (solid line) or metaphase I (dotted line) were inseminated and incubated for 18 h. Within each oocyte, either all or none of the sperm nuclei formed metaphase chromosomes. The numbers of oocytes examined are shown along the abscissa.

- Wniknięcie **4-6 plemników** skutkuje uformowaniem jedynie **skondensowanej masy chromatyny** (fig. 4c)
- Wniknięcie **więcej niż 6 plemników** powoduje **problemy z utrzymaniem matczynych chromosomów w stadium chromosomów metafazowych**, lub ulegała **pyknozie**.



# Dyskusja i wnioski:

- Dojrzewające oocyty zawierają cytoplazmatyczny czynnik aktywujący do formowania metafazowych chromosomów
- Pojedynczy oocyt może transformować do 4 jąder plemnikowych w metafazowy chromosomy (limit pojemności cytoplazmy kiedy możliwa jest transformacja)
- Czynnik transformujący reaguje w stosunku stechiometrycznym z plemnikową chromatyną którego zapasy wystarczają na transformację 3-4 jąder plemnikowych (ten czynnik jest akumulowany w czasie inkubacji w ograniczonej ilości i nawet po 24h jego ilość nie zwiększa się). Jest rozkładany równomiernie pomiędzy jądra plemnikowe.

# Porównanie wyników z wcześniejszymi eksperymentami zachowania się jąder komórek somatycznych wprowadzonych do oocytu:

- Formowanie się plemnikowych chromosomów wymaga przynajmniej 12h inkubacji, podczas gdy transformacja somatycznych jąder w metafazowe chromosomy wymaga mniej niż 2h.
- Liczba jąder plemnikowych mogących ulec transformacji to 3-4, podczas gdy ponad 15 jąder tymocytów zostało transformowanych po fuzji z oocytem.
- Strukturalne i molekularne różnice pomiędzy chromatyną plemnikową a somatyczną ma znaczenie. Chromatyna somatyczna zawiera histony a plemnikowa protaminy które musi dopiero wymienić na białka histonowe co wymaga więcej czasu.

# Porównanie z zachowaniem plemnikowej chromatyny w pełni dojrzałych oocytach:

- W pełni dojrzałych oocytach plemnikowa chromatyna ulega ekstremalnej dekondensacji w męskie przedjądrze, co wskazuje, że czynnik który indukuje transformację w metafazowe chromosomy jest nieobecny (wyjaśnia to fakt, że w pełni dojrzałe oocyty są aktywowane przez wniknięcie plemnika na co wskazuje rozwój przedjądrza żeńskiego)
- Po aktywacji oocytu plemnikowa chromatyna ulega rozproszeniu a potem kondensacji w małą masę, co ma związek z wymianą protamin na białka histonowe obecne w cytoplazmie oocytu.

# Porównanie z wcześniejszymi doświadczeniami:

- We wcześniejszych doświadczeniach nie obserwowano formowania się metafazowych chromosomów ponieważ inkubowano oocyty przez mniej niż 9h, co jest wystarczające do pojawienia się przedjądrza plemnikowego ale w dojrzewających oocytach metafazowe chromosomy pojawiają się przynajmniej po 12h inkubacji.

Dziękuję za uwagę.