

Transformation of Sperm Nuclein to Metaphase Chromosomes in the Cytoplasm of Maturing Oocytes of the Mouse.

Hugh J. Clarke and Yoshio Masui

Prezentacja: Agata Kulczycka

Wstęp

- rozpoczęcie dojrzewania mejotycznego w oocytach kręgowców zapoczątkowane jest rozpadem błony jądrowej w pęcherzykach zarodkowych (GVBD) i kondensacją chromatyny do stadium metafazy. Oocyty przechodzą pierwszy podział mejozy, a następnie zostają zablokowane w metafazie II - aż do zapłodnienia.
- Mechanizm odpowiedzialny za utrzymanie chromosomów w stadium skondensowanym u dojrzewających oocytów został zbadany przez wprowadzenie do cytoplazmy oocytu jądra interfazowego z komórki somatycznej.
- Wyniki pokazały, że u wielu gatunków wzrost oocytów indukowany jest przez aktywność cytoplazmatyczną, która powoduje transformację jądra interfazowego do chromosomów metafazowych.
- Przeprowadzono inseminację lub iniekcję dojrzewających oocytów - jądra plemników nie uformowały chromosomów metafazowych. Zamiast tego powiększyły się lub utworzyły przedjądrze.
- Brak aktywności cytoplazmatycznej u dojrzewających oocytów która powodowałaby transformację jądra plemnika do metafazowych chromosomów.

Cel doświadczenia:

Pogodzenie rozbieżności pomiędzy wynikami otrzymanymi w przypadku wprowadzenia do cytoplazmy oocytu jądra plemnika lub interfazowego jądra somatycznego.

Zbadanie zmian morfologii jąder plemników i chromatyny matczynej po zapłodnieniu oocytów.

Materiały i metody:

Oocyty:

- dojrzałe płciowo myszy (CD-1)
- PMSG - gonadotropina z surowicy ciężarnych klaczy
- Sekcja 44-48 h później
- Izolacja jajników - przeniesienie do zmodyfikowanej pożywki L-15 z dodatkiem 50µg/ml dbcAMP (zapobiega spontanicznemu rozpadowi pęcherzyka zarodkowego podczas selekcji oocytów)
- Nakłuwanie pęcherzyków jajnikowych i izolacja oocytów
- Przeniesienie do pożywki Brinstera - inkubacja 37C, 5%CO₂
 - 2h - prometafaza I
 - 8-9h - metafaza I
 - 18 - 21h - metafaza II

Usunięcie osłonek przejrzystych:

- 0,05% α -chemotrypsyna w pożywce DME - 37C, 1 min
- Przeniesienie z pomocą mikropipety do pożywki L-15, płukanie.
- Selekcja - oocyty całkowicie pozbawione otoczniki i komórek pęcherzykowych.
- Przeniesienie do falkonu z pożywką F - możliwe zapłodnienie

Zawiesina plemników

- Dojrzałe płciowo myszy CD-1
- Sekcja i wypreaprowanie nasieniowód - w pożywce F, usunięcie tkanki tłuszczowej
- Wyciśnięcie plemników z nasieniowodów - zawiesina w 0,5ml pożywki F
- Inkubacja przez 15 minut w 37C
- 75µl zawiesiny rozcieńczono w 0,5ml pożywki F, inkubacja 45 minut.

Inseminacja oocytów:

- Odmierzona objętość rozcieńczonej zawiesiny plemników został dodany do 3037 godetek zawierających oocyty zawieszony w 0,5 ml pożywki F.
- Różne godetki otrzymał różne objętości zawiesiny plemników - w celu otrzymania różnych polispermii w każdym doświadczeniu.
- Każda godetka 20-50 oocytów i 0,5-50 ul rozcieńczonej zawiesiny plemników.
- Mieszanie komórek jajowych i plemników inkubowano 45 min.
- Oocyty przeniesiono do zmodyfikowanej pożywki Whitten (zmniejszenie stężenia NaCl z 88 mM do 71 mM) na 3-30h.

Utrwalanie i barwienie:

- Oocyty zostały utrwalone przez kilka minut w roztworze utrwalacza - etanol, woda i kwas octowy (8:3:3)
- W celu szczegółowego badania chromosomów - metoda Tarkowskiego. Oocyty na kilka minut umieszczono w 1% roztworze cytrynianu sodu, a następnie w małych grupach przeniesiono w kroplach utrwalacza na szkiełka i wysuszono.
- Utrwalone oocyty wybarwiono barwnikiem Giemsy .

WYNIKI

1. Inseminacja w pełni dojrzałych oocytów - GVBD i wyrzut I ciała kierunkowego.

12 h po inseminacji:

74% (114/155) - wyrzucenie II ciała kierunkowego, wykształcenie przedjądrza żeńskiego i jednego lub więcej przedjądrzy męskich.

26% (36/155) - nie wykształciło przedjądrza męskiego ale u niektórych wyrzut II ciała kierunkowego i przedjądrze żeńskie.

Możliwa jest aktywacja i powstanie przedjądrzy męskich i żeńskich u oocytów które przeszły dojrzewanie mejotyczne.

2. Inseminacja dojrzewających oocytów (prometafaza I lub metafaza I)

Monospermia

- Próba kontrolna - oocyty które nie zostały zapłodnione podczas inseminacji

Prometafaza I

9h po inkubacji:

19% (5/27) oocytów, które zostały zapłodnione osiągnęło stadium metafazy II

44% (18/41) - oocytów niezapłodnionych osiągnęło stadium metafazy II

12 h po inkubacji

82% (31/38) oocytów, które zostały zapłodnione osiągnęło stadium metafazy II

89% (32/36) - oocytów niezapłodnionych osiągnęło stadium metafazy II

Zapłodnienie oocytu w stadium prometafazy I może spowodować opóźnienie dokończenia mejozy ale nie wpływa na zdolność oocytu na dokończenie dojrzewania i blok w metafazie II.

Metafaza I

9h po inkubacji

>90% oocytów zapłodnionych i niezapłodnionych osiągnęło stadium metafazy II

Zapłodnienie oocytów w metafazie I nie opóźnia dokończenie mejozy.

Morfologia matczynych chromosomów w oocytach inseminowanych w prometafazie I. 18h inkubacji.

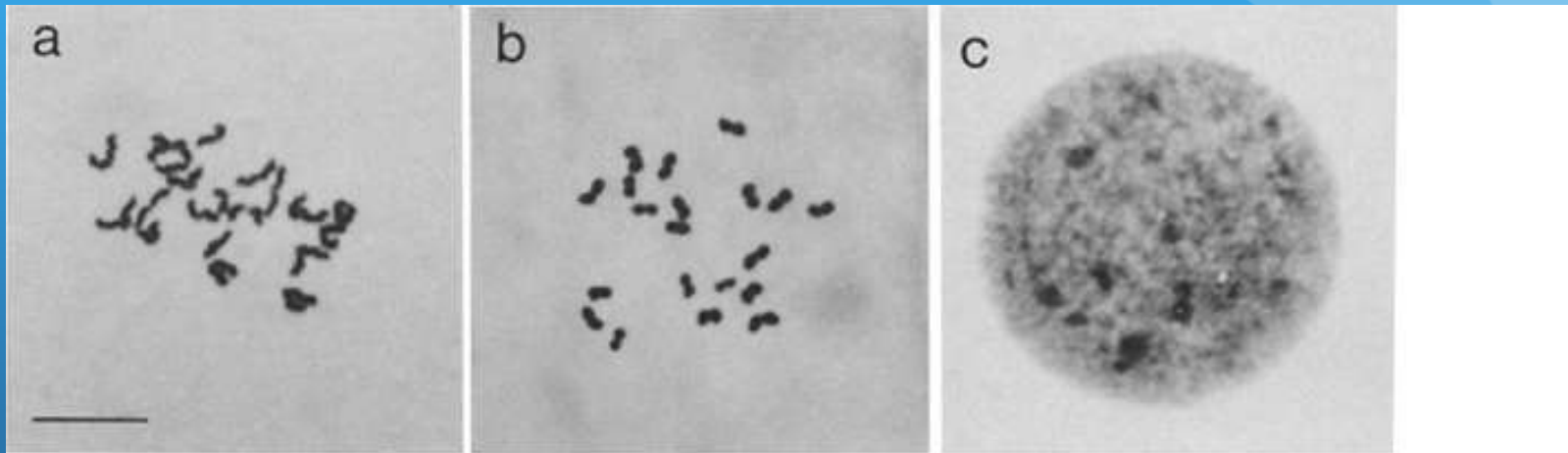


Figure 1. Morphology of the maternal chromosomes in oocytes inseminated at prometaphase I and incubated for 18 h. (a) Control oocyte; (b) monospermic oocyte; (c) highly polyspermic oocyte (7 sperm). Bar, 10 μm .

Wpływ polispermii na mejozę oocytów i morfologię matczynych chromosomów.

- oocyty w prometafazie I, inkubacja 18 h

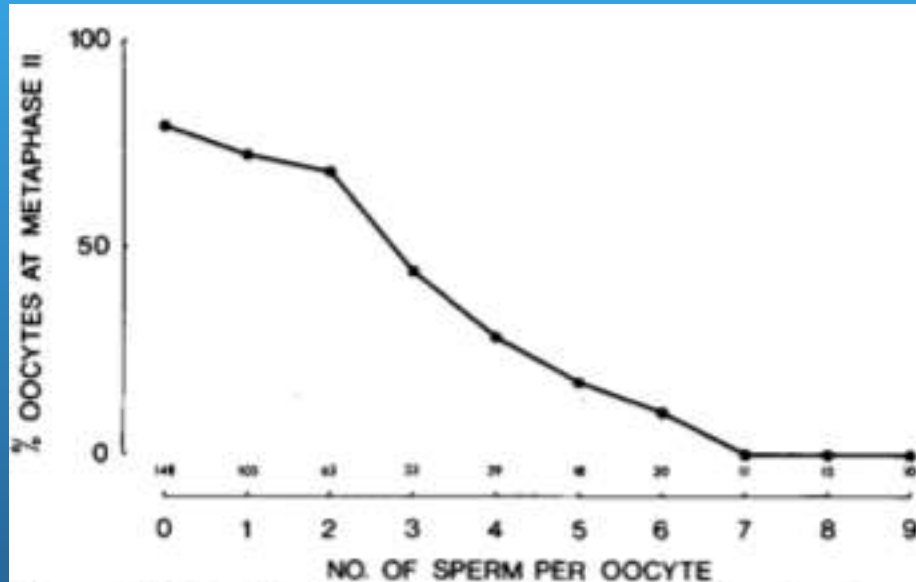
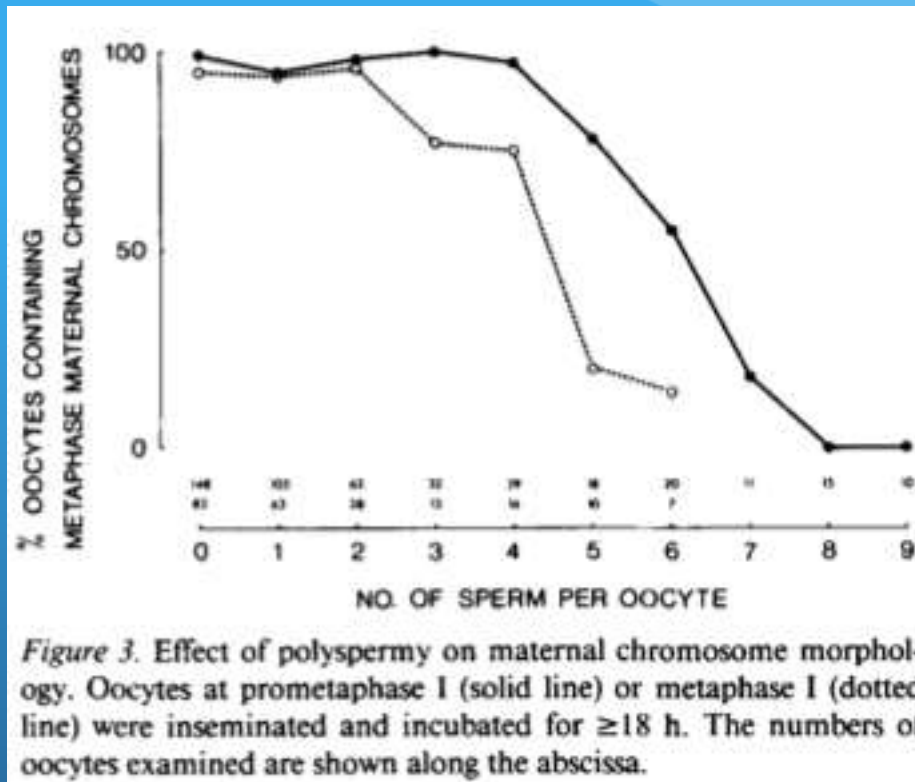


Figure 2. Effect of polyspermy on oocyte meiosis. Oocytes at pro-metaphase I were inseminated and incubated for ≥ 18 h. Oocytes were classified as metaphase II if they contained one or two groups of 20 dyads. The number of oocytes examined are shown along the abscissa.



- Dekondensacja lub pyknoza chromosomów matczynych może być wywołane przez mniej plemników, jeśli komórki jajowe zostały zapłodnione w metafazie I niż w przypadku zapładniania w prometaphase I.
- Wysoki stopień polispermii hamuje zdolność oocytów do utrzymania chromosomów matczynych w stadium metafazy II.

Zmiany morfologii jądra plemnika w kontakcie z cytoplazmą oocytu.

MONOSPERMIA

- Utrwalanie oocytów w 3h odstępach czasowych po inseminacji.

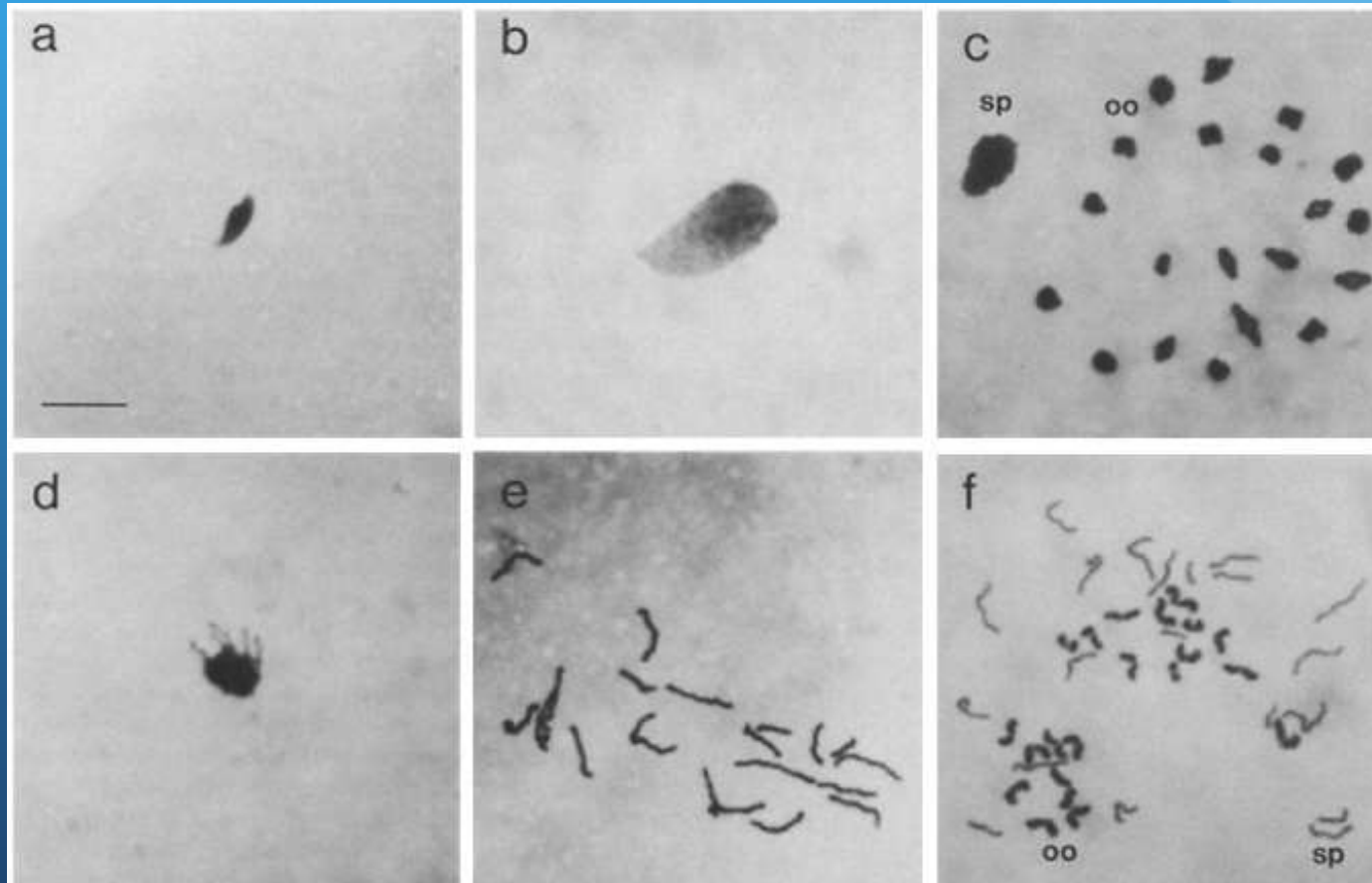


Figure 4. Changes in the morphology of the sperm chromatin in monospermic oocytes, inseminated at prometaphase I and incubated for the indicated lengths of time. (a) Untransformed sperm nucleus (0 h); (b) dispersed chromatin (3 h); (c) mass of recondensed chromatin (sp), with maternal chromosomes (oo) 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 μm .

Zależność zmiany morfologii chromatyny plemnika w dojrzewających oocytach od czasu inkubacji.

A - oocyty inseminowane w prometafazie I

B - oocyty inseminowane w metafazie I

po 18 h inkubacji – ponad 90% chromosomów ojcowskich w stadium metafazy II.

tworzenie chromosomów metafazowych zachodzi nieco szybciej gdy inseminowano oocyty w metafazie I.

oocyty inseminowane w prometafazie I – u 2/3 doszło do wymieszania chromosomów ojcowskich i matczynych niezależnie od czasu inkubacji (po 15 i 24h)

oocyty inseminowano w metafazie I – po 15-18 h inkubacji chromosomy ojcowskie i matczyne były odseparowane, do wymieszania doszło po 20-24h inkubacji.

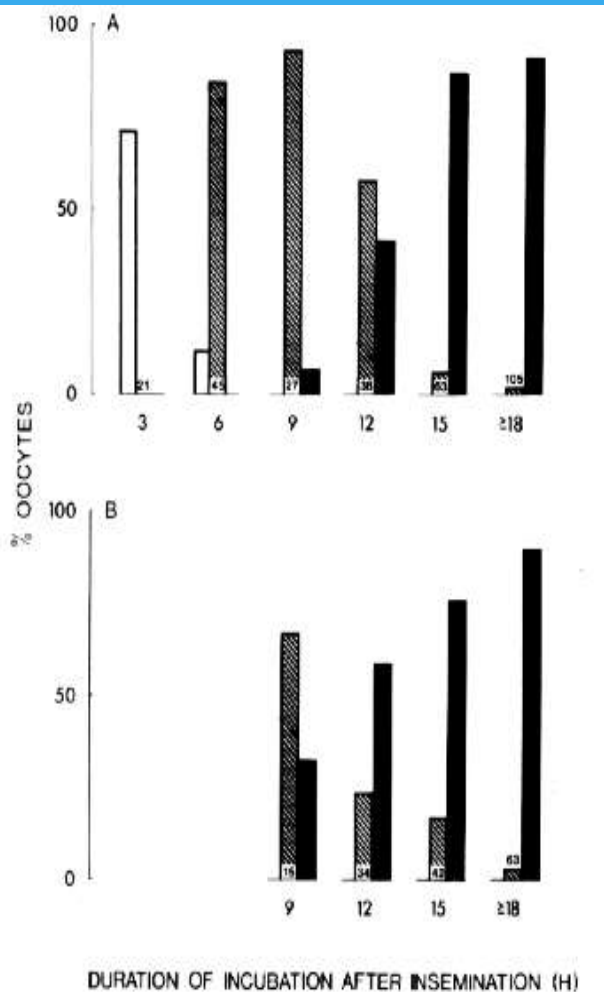


Figure 5. Sequence of changes in sperm chromatin morphology in monospermic oocytes. Oocytes at prometaphase I (A) or metaphase I (B) were inseminated and incubated for 3–18 h. The sperm chromatin was classified according to criteria described in the text. The bars do not sum to 100% at every time point, 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.

Wpływ polispermii na transformację jąder plemników do chromosomów metafazowych.

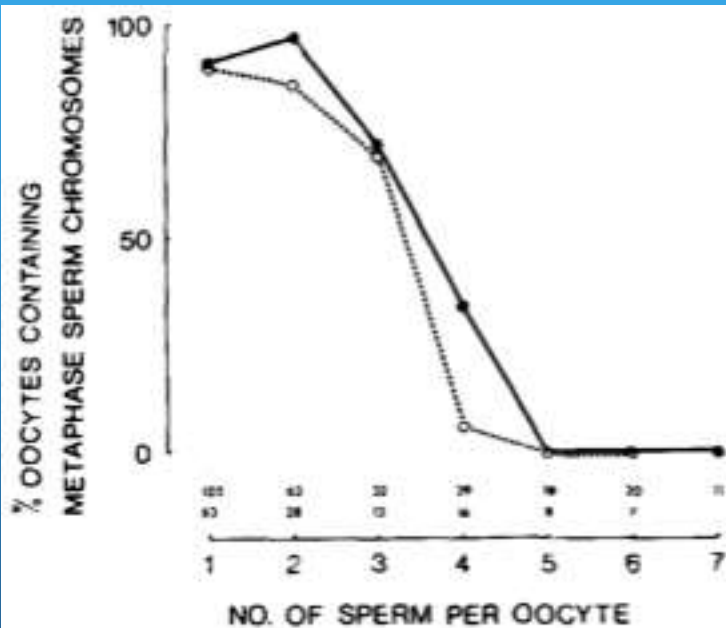


Figure 7. Effect of polyspermy on transformation of sperm nuclei into metaphase chromosomes. Oocytes at prometaphase I (solid line) or metaphase I (dotted line) were inseminated and incubated for ≥ 18 h. Within each oocyte, either all or none of the sperm nuclei had formed metaphase chromosomes. The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

2-3 plemniki - jądra plemników przechodzą takie same zmiany jak w przypadku monospermii. Zostają przekształcone w metafazowe chromosomy .

4 plemniki - u 1/3 oocytów transformacja jąder plemników do metafazowych chromosomów.

>4 plemniki- żadne jądro nie transformuje do metafazowych chromosomów. Zamiast tego tworzą masy chromatyny, które mogą mieszać się z chromatyną matczyną.

Jeśli do oocytu wniknęły więcej niż cztery plemniki, przekształcenia nawet jednego z jąder plemnika do chromosomów metafazowych został całkowicie zablokowany.

POLISPERMIA

Wpływ na zmiany morfologii jądra plemników.

- Jeżeli więcej niż jeden plemnik przeniknie do komórki jajowej, wszystkie jądra plemników poddane zostają tej samej przemianie morfologicznej.
- Oznacza to, że cytoplazma oocytu wywiera jednolity wpływ na wszystkie jądra plemników, które znajdują się w jej obrębie.
- Rodzaj przemian w jądrach plemników zależy od liczby plemników jaka przeniknęła do oocytu.

Morfologia chromatyny plemników.

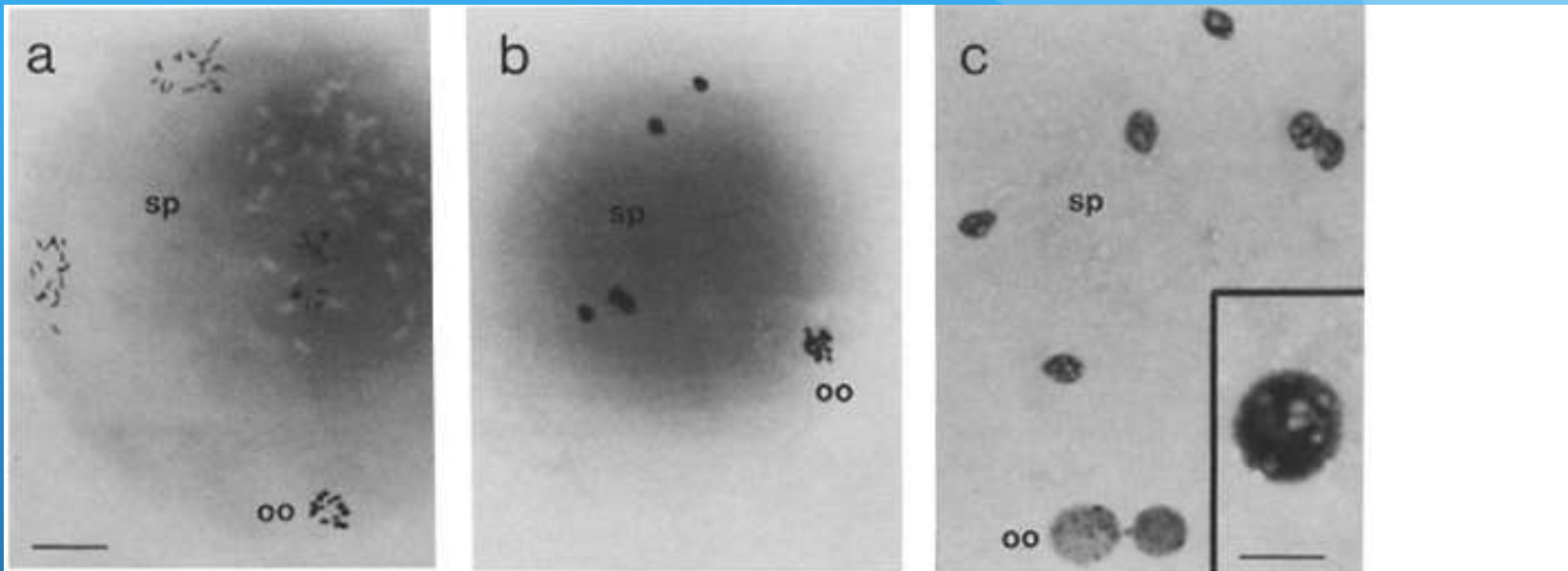


Figure 6. Morphology of sperm chromatin in polyspermic oocytes, inseminated at prometaphase I and incubated for ≥ 18 h. (a) Oocyte penetrated by three sperm. Metaphase sperm (*sp*) and maternal (*oo*) chromosomes are visible. (b) Oocyte penetrated by five sperm. Sperm chromatin masses (*sp*) and metaphase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

- W oocytach zapłodnionych przez 4-6 plemników - jądra plemników tworzą skondensowane masy chromatyny
- W komórkach jajowych, które były penetrowane przez >6 plemników - jądra plemników tworzą masy chromatyny, które są większe i lekko zabrudzonej, chromatyna matczyzna ulega dekoncentracji lub pyknozie.

Porównanie zachowania jąder plemnikowych i somatycznych w cytoplaźmie oocytu.

- Proces kondensacji chromatyny i tworzenia chromosomów zachodzi inaczej w oocytach z jądrami somatycznymi, a inaczej z plemnikami
- Tworzenie chromosomów plemnikowych wymagane co najmniej 12h, natomiast transformacja jąder somatycznych <2 h.
- Liczba jąder plemników, które mogą być przekształcone w metafazowe chromosomy w obrębie jednego oocytów jest ograniczona do 3 lub 4, natomiast np. do 15 jąder tymocytów może tworzyć metafazowe chromosomy po fuzji do komórki jajowej.
- Za tą różnicę mogą odpowiadać strukturalne i molekularne różnice między chromatyną plemnikową i somatyczną.
- Chromatyny plemników jest bardzo skondensowana i podlega wstępnej dyspersji przed kondensacją i rozpoczęciem metafazy. Chromatyny w jądrach somatycznych jest bardziej rozluźniona, dlatego jej kondensacji do stanu metafazy może rozpocząć się natychmiast po znalezieniu się w cytoplaźmie oocytu.
- Chromatyna jąder somatycznych zawiera histony, chromatyny plemników - protaminy, które muszą być zastąpione przez histony przed transformacją chromosomów do stadium metafazy.

PODSUMOWANIE

Zachowanie jądra plemnika w oocycie dojrzewającym:

- Początkowo chromatyna ulega dekondensacji (rozproszeniu) by po paru godzinach rekondensować tworząc małą masę chromatyny.
- Chromatyna ta może następnie kondensować i utworzyć metafazowe chromosomy
- Proces ten zajmuje ok 12-18 h w cytoplaźmie oocyty.
- W wielu oocytach chromosomy matczyne i ojcowskie mieszają się co świadczy o tym, że biorą wspólnie udział w tworzeniu wrzeciona podziałowego.

- Po inseminacji niedojrzałych oocytów lub w pełni dojrzałych - jądro plemnika nie przekształca się w chromosomy metafazowe (niedojrzały - bez zmian, dojrzały - przedjądrze męskie).
- Jeden oocyt może przekształcić max. 3-4 jądra plemnikowe do stadium metafazy
- Związane jest to z występowaniem czynnika cytoplazmatycznego wymaganego do tych przemian. Czynniki te reagują w stosunku stechiometrycznym z chromatyną plemnika. Jego ilość w jednym oocyte jest wystarczająca do transformacji 3-4 plemników.
- Jeżeli do oocyta dostaną się więcej niż 4 plemniki to żadne jądro nie przekształci się do stadium metafazy - jednakowy wpływ na wszystkie jądra. Zamiast tego powstaną małe masy skondensowanej chromatyny.
- W przypadku dużej polispermii nie tylko jądra plemników nie przekształciły się w chromosomy metafazowe ale także chromatyna maczyna dekondensowała lub uległa pyknozie.