

NOVES PERSPECTIVES EN L'ESTUDI DE LA TERRITORIALITAT CROMOSÒMICA DE CÈL·LULES GERMINALS MASCULINES: ESTUDIS TRIDIMENSIONALS

¹Mireia Solé, ¹Joan Blanco, ²Debora Gil, ³Gothami Fonseka, ³Richard Frodsham, ⁴Oliver Valero, ¹Francesca Vidal, ¹Zaida Sarrate

¹Genetics of Male Fertility Group (<http://gmfgroup.wixsite.com/gmfgroup>). Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Spain. zaida.sarrate@uab.cat

²Computer Vision Center. Computer Science Department. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, Spain. debora.gil@uab.cat

³Cytocell Ltd, Technopark, Newmarket Road, Cambridge CB5 8PB, UK. g.fonseka@cytocell.com

⁴Universitat Autònoma de Barcelona, Servei d'Estadística Aplicada, Cerdanyola del Vallès, Spain. oliver.valero@uab.cat

Resum

En el nucli interfàsic de cèl·lules somàtiques, els cromosomes ocupen territoris concrets que tenen un paper fonamental en la regulació i el manteniment del genoma. Tot i que en cèl·lules germinals hi ha dades preliminars que suggereixen la importància de la territorialitat cromosòmica en la funcionalitat cel·lular, les característiques del teixit testicular (presència de diferents tipus cel·lulars amb diferents característiques morfològiques, en diferents estadis de desenvolupament i amb diferent tipus de ploïdia) dificulta la consecució de resultats conclouents. En aquest estudi hem desenvolupat una metodologia d'anàlisi tridimensional de territorialitat cromosòmica en cèl·lules germinals masculines procedents de testicle de ratolins (*Mus musculus*) de la soca C57BL/6J. La metodologia contempla etapes clarament diferenciades: i) Fixació cel·lular optimitzada per preservar l'estructura tridimensional de les cèl·lules; ii) Identificació cromosòmica mitjançant FISH (Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ Murine System; Cytocell) i microscòpia confocal (TCS-SP5; Leica Microsystems), iii) Identificació cel·lular mitjançant immunofluorescència, iv) Anàlisi de les imatges mitjançant seqüències de comandaments Matlab, v) Obtenció de dades numèriques que defineixen els territoris cromosòmics (dades descriptives, posicionament radial i posicionament relatiu dels cromosomes). Aquesta metodologia permet la identificació inequívoca i l'anàlisi dels territoris cromosòmics en totes les etapes de l'espermatogènesi. Els resultats aportaran informació valuosa en relació a les característiques cromosòmiques que determinen el posicionament, les associacions preferents entre cromosomes i la relació entre posicionament i regulació del genoma.

Paraules clau: Territoris cromosòmics, FISH, espermatogènesi, anàlisi tridimensional.

Abstract

In somatic cells, chromosomes occupy specific nuclear regions called chromosome territories which are involved in the maintenance and regulation of the genome. Preliminary data in male germ cells also suggest the importance of chromosome territoriality in cell functionality. Nevertheless, the specific characteristics of testicular tissue (presence of different cell types with different morphological characteristics, in different stages of development and with different ploidy) makes difficult to achieve conclusive results. In this study we have developed a methodology to approach the three-dimensional study of all chromosome territories in male germ cells from C57BL/6J mice (*Mus musculus*). The method includes the following steps: i) Optimized cell fixation to obtain an optimal preservation of the three-dimensionality cell morphology, ii) Chromosome identification by FISH (Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ Murine System; Cytocell) and confocal microscopy (TCS-SP5, Leica Microsystems), iii) Cell type identification by immunofluorescence iv) Image analysis using Matlab scripts, v) Numerical data extraction related to chromosome features, chromosome radial position and chromosome relative position. This methodology allows the unequivocally identification and the analysis of the chromosome territories of all spermatogenic stages. Results will provide information about the features that determine chromosomal position, preferred associations between chromosomes, and the relationship between chromosome positioning and genome regulation.

Key words: Chromosome territories, FISH, spermatogenesis, three-dimensional analysis.

INTRODUCCIÓ

Els cromosomes ocupen regions específiques, no aleatòries, conegudes amb el nom de Territoris Cromosòmics (TC) (Cremer i Cremer 2010). Els mecanismes que estableixen aquest posicionament estan relacionats amb característiques intrínseques dels cromosomes, com la mida i la densitat gènica. Els cromosomes amb una alta densitat gènica i els cromosomes petits es localitzen preferentment a l'interior de l'espai nuclear, mentre que els que tenen una baixa densitat gènica i els que són més grans es localitzen a la perifèria (Hübner i Spector 2010; Sun et al. 2000). Així mateix, a nivell de l'organització interna dels territoris cromosòmics, s'ha trobat correlació amb altres factors com l'activitat de transcripció i el contingut dels nucleòtids de guanina i citosina (revisat per Cremer and Cremer 2010).

El patró de distribució dels cromosomes difereix segons el tipus cel·lular, però és similar entre cèl·lules i teixits que comparteixen vies de desenvolupament i està evolutivament conservat entre espècies (Tanabe et al. 2002). Tant és així que s'ha suggerit una gran implicació de l'organització dels TCs en el manteniment i la regulació del genoma (Cremer et al. 2006), així com en la regulació de l'expressió gènica (Cavalli 2007; Elcock i Bridger 2010; Harewood et al. 2010; Hübner et al. 2013). El posicionament dels cromosomes podria promoure interaccions entre regions específiques del genoma per tal d'activar o reprimir la seva expressió (Cavalli 2007; Hübner et al. 2013). Per tant, l'alteració del posicionament dels cromosomes i en conseqüència, l'alteració de la localització dels gens podria, per una banda, comprometre l'accessibilitat dels factors de transcripció a la cromatina i, per l'altra, dificultar les interaccions físiques entre regions específiques del genoma que actuen de manera coordinada (Reddy et al. 2008; Wijchers et al. 2015).

De fet, s'han observat alteracions en el patró de posicionament dels cromosomes en nombroses malalties. Cremer et al. (2003) descriuen diferents patrons de posicionament dels cromosomes 18 i 19 en línies cel·lulars normals i tumorals. Meaburn et al. (2007) descriuen canvis en els territoris dels cromosomes 13 i 18 en pacients amb mutacions del gen *LMNA*. També, s'ha observat una alteració del patró d'interaccions entre TC en cèl·lules mamàries tumorals (Fritz et al. 2014).

Pel que fa el teixit testicular, hi ha poques dades sobre la posició relativa dels cromosomes durant el transcurs del procés d'espermatogènesi. Tot i això, alguns estudis han demostrat una distribució no aleatòria dels cromosomes en alguns estadis concrets: estudis en dues dimensions en espermatòcits humans mostren una proximitat preferent entre els bivalents 15 i XY en l'estadi de paquitè (Codina-Pascual et al. 2006) i metafase I

(Sarrate et al. 2012). Així mateix, l'anàlisi de les relacions de posicionament entre tots els bivalents a l'estadi de metafase I ha evidenciat una distribució

no aleatòria dels cromosomes mantenint agrupacions preferents d'acord amb la mida, la densitat gènica i la morfologia acrocèntrica dels cromosomes (Vergés et al. 2014). Tanmateix, diverses publicacions han informat d'una organització espacial no aleatòria dels cromosomes en els nuclis dels espermatozoides (Foster i Bridger 2005; Hazzouri et al. 2000; Ioannou et al. 2011; Mudrak et al. 2012).

Tenint en compte aquestes observacions, s'ha suggerit que la distribució dels cromosomes en les cèl·lules espermatogèniques podria condicionar el correcte desenvolupament de l'espermatogènesi i, en el cas de la organització dels TCs en els espermatozoides, tenir implicacions epigenètiques en l'expressió gènica de l'embrió (Greaves et al. 2003; Mudrak et al. 2012; Zalensky i Zalenskaya 2007). En aquest sentit, diversos estudis relacionen canvis en la territorialitat dels cromosomes de les cèl·lules espermatogèniques amb problemes de fertilitat. Més concretament, Finch et al. (2008) observen un posicionament alterat dels cromosomes sexuals en individus que presenten problemes de fertilitat. Els cromosomes 15, 18 i X també experimenten un canvi de posicionament en pacients amb un alt nivell d'aneuploidies (Olszewska et al. 2008). A més a més, també s'ha observat un canvi de territorialitat cromosòmica a l'estadi de metafase I en portadors de translocacions robertsonianes (Acloque et al. 2013; Solé et al. 2016) i en nuclis d'espermatozoides humans de portadors de translocacions recíproques (Wiland et al. 2008). Tot i això, els estudis publicats de territorialitat cromosòmica en cèl·lules del teixit testicular són escassos i tan sols avaluen la relació de posicionament de cromosomes concrets, en estadis específics de l'espermatogènesi i mitjançant tècniques bidimensionals (Ioannou et al. 2011; Sarrate et al. 2012; Vergés et al. 2014; Zalenskaya i Zalensky 2004). Malgrat la vàlua dels resultats d'aquests estudis, les anàlisis bidimensionals no permeten concloure el posicionament exacte dels cromosomes en la tridimensionalitat de la cèl·lula, ni la seva progressió durant el transcurs de l'espermatogènesi.

Per tal de superar aquestes limitacions, s'ha desenvolupat una metodologia per avaluar de manera tridimensional el posicionament de tots els cromosomes en tots els tipus cel·lulars que participen en l'espermatogènesi.

MATERIALS I MÈTODES

La metodologia desenvolupada consta de vuit etapes (Figura 1). Es van processar els testicles provinents

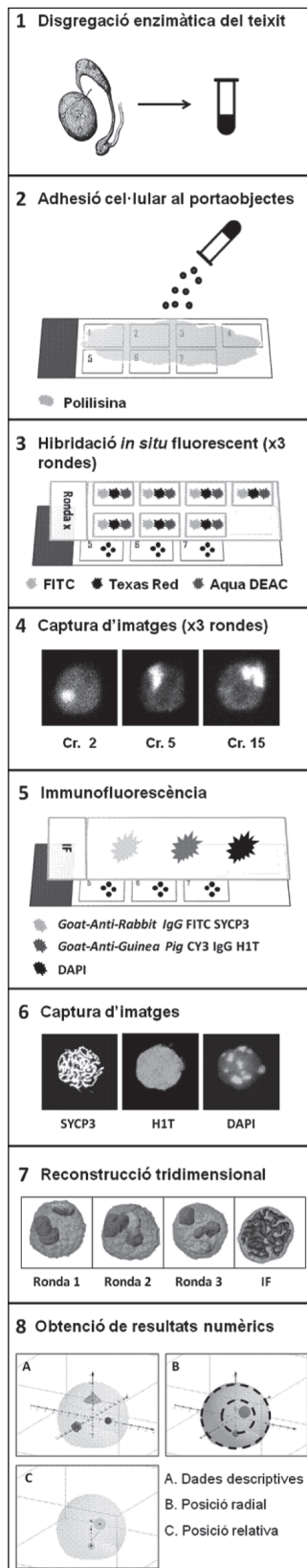


Figura 1: Representació esquemàtica de la metodologia optimitzada.

d'un ratolí (*Mus musculus*) de la soca C57BL/6J. El teixit testicular es va disgregar enzimàticament i les cèl·lules obtingudes es van adherir en portaobjectes polilisinitzats. Posteriorment, es va realitzar un procés de fixació amb paraformaldehid i un tractament de permeabilització amb àcid clorhídric, nitrogen líquid i pepsina. Seguidament, es van dur a terme tres rondes d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) utilitzant el kit personalitzat *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™* (Cytocell Ltd, Cambridge, UK). Aquest kit utilitza set combinacions diferents de tres sondes de pintat cromosòmic marcades amb un fluorocrom diferent cadascuna (*Aqua DEAC*, *FITC*, *Texas Red*) (Figura 2). Seguidament, i amb la finalitat de distingir els diferents tipus cel·lulars que es poden observar durant l'espermatogènesi, es va identificar la proteïna SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) i la histona H1T (testis-specific histone) mitjançant una tinció per immunofluorescència. La identificació es va realitzar mitjançant els anticossos primaris *rabbit* anti-SYCP3 i *guinea pig* anti-H1T, i els anticossos secundaris anti-*rabbit* FITC i anti-*guinea pig* Cy3 (Figura 3). Es van capturar seccions òptiques en sèrie de tots els tipus cel·lulars amb la utilització del microscopi confocal *TCS-SP5* acoblat a un sistema d'anàlisi d'imatges (LAS AF-1.8.1). Finalment, les imatges es van processar mitjançant els softwares ImageJ i Matlab obtenint dades numèriques que inclouen dades descriptives, posicionament radial i posicionament relatiu dels cromosomes.

Ronda 1	 10,9,18	 12,11,19	 X,13,Y	
	 1,4,14	 2,5,15	 3,7,16	 6,8,17
Ronda 2	 6,8,17	 10,9,18	 12,11,19	
	 3,7,16	 1,4,14	 2,5,15	 3,7,16
Ronda 3	 X,13,Y	 1,4,14	 2,5,15	
	 X,13,Y	 6,8,17	 10,9,18	 12,11,19

FITC Texas Red Aqua DEAC

Figura 2: Plantilles del kit *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™* utilitzades per dur a terme la hibridació *in situ* fluorescent. Els números indiquen el cromosoma identificat.

RESULTATS

Morfologia nuclear

La utilització de portaobjectes polilisinitzats va permetre una bona adhesió de les cèl·lules, sense malmetre ni deformar la morfologia cel·lular. A més a més, el seguit de tractaments utilitzats per aconseguir una bona permeabilització dels nuclis no va modificar la seva integritat tridimensional.

Hibridació *in situ* fluorescent

El kit personalitzat *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™* va permetre identificar tots els cromosomes de ratolí en un sol portaobjectes. La realització de tres rondes successives de FISH va fer possible la identificació de 9 territoris cromosòmics per cèl·lula. Integrant totes les dades es van poder establir relacions de proximitat, dos a dos, entre tots els cromosomes (Taula 1).

Chr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y
1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
3			1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
4				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
5				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
6					1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
7						1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
8							1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
9								3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
10									1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
11										3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
12											1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
13												1	1	1	1	1	3	3	3	3	3
14													1	1	1	1	1	1	1	1	1
15														1	1	1	1	1	1	1	1
16															1	1	1	1	1	1	1
17																1	1	1	1	1	1
18																	1	1	1	1	1
19																		1	1	1	1
X																			1	1	3
Y																					

Taula 1: Nombre de vegades que es combinen dos cromosomes en un mateix nucli.

Immunofluorescència

La identificació de les proteïnes SYCP3 i H1T mitjançant immunofluorescència, juntament amb la tinció de la cromatina amb DAPI, va permetre classificar els tipus cel·lulars en les següents categories: cèl·lules pre-meiotiques, figures meiotiques (profase I, metafase I i II), cèl·lules post-meiotiques i espermatozoides (Figura 3).

Processament de les imatges

La utilització dels softwares ImageJ i Matlab va permetre segmentar les imatges obtingudes i extreure dades numèriques dels territoris cromosòmics en relació al

volum, la proporció respecte el nucli, la posició radial i la posició relativa dels cromosomes.

DISCUSSIÓ

L'aplicació de la metodologia desenvolupada permet determinar el patró de distribució de tots els TC en totes les etapes de l'espermatogènesi. Considerant les nombroses evidències de que la territorialitat cromosòmica té un significat biològic funcional, la caracterització dels TCs durant l'espermatogènesi podria obrir noves perspectives per determinar la relació entre el posicionament dels cromosomes i la regulació i el manteniment del genoma. Així mateix, la caracterització d'un model de territorialitat cromosòmica durant el procés d'espermatogènesi serà una eina útil per determinar les seves implicacions en la fertilitat masculina.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pels projectes CF-180034 de la Universitat Autònoma de Barcelona, DPI2015-65286R/SAF2016-77165-P del *Ministerio de Economía, Industria y Competividad* i CERCA de la Generalitat de Catalunya. Agraïm a M.A Handel de Jackson Laboratories per la seva col·laboració.

BIBLIOGRAFIA

- Acloque, H.; [et al.] (2013). «Sperm nuclear architecture is locally modified in presence of a Robertsonian translocation t(13;17).» *PloS. One*, Vol. 8, núm. 10, p. 863-905.
- Cavalli G. (2007). «Chromosome kissing». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol. 17, p. 443-450.
- Codina-Pascual M.; [et al.] (2006). «Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes». *Hum. Reprod.*, Vol. 21, p.1490-1497.
- Cremer M.; [et al.] (2003). «Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei». *J. Cell. Biol.*, Vol. 5, núm. 162, p.809-820.
- Cavalli G. (2007). «Chromosome kissing». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol. 17, p. 443-450.
- Codina-Pascual M.; [et al.] (2006). «Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes». *Hum. Reprod.*, Vol. 21, p.1490-1497.
- Cremer M.; [et al.] (2003). «Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in

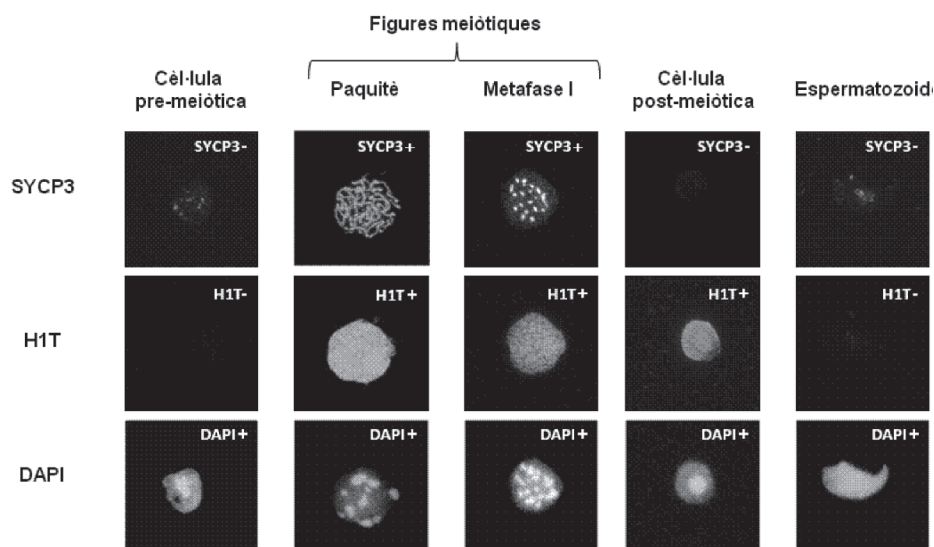


Figura 3: Alguns exemples d'identificació de diferents cèl·lules de l'espermatogènesi mitjançant marcatge per immunofluorescència de les proteïnes SYCP3 H1T i tinció amb DAPI.

- normal and tumor cell nuclei». *J. Cell. Biol.*, Vol. 5, núm. 162, p.809-820.
- Cremer T.; [et al.] (2006). «Chromosome territories--a functional nuclear landscape». *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. 18, núm. 3, p. 307-316.
- Cremer T., Cremer M.; (2010). «Chromosome Territories». *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2: a003889.
- Elcock L.S. i Bridger J.M.; (2010). «Exploring the relationship between interphase gene positioning, transcriptional regulation and the nuclear matrix». *Biochem Soc Trans.*, Núm. 38, p. 263-267
- Finch, K.A.; [et al.] (2008). «Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males». *Hum. Reprod.* Vol. 23, núm. 6, p. 1263-1270.
- Foster H.A.; [et al.] (2005). «Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis». *J. Cell Sci.*, núm. 118, p.1811-1820
- Fritz, A.J.; [et al.] (2014). «Wide-scale alterations in interchromosomal organization in breast cancer cells: defining a network of interacting chromosomes». *Human Mol. Gen.* Vol. 23, núm. 19, p. 5133-5146.
- Greaves, I.K.; [et al.] (2003). «Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance». *Chromosome Res.*, núm. 11, p.503-512.
- Harewood, L.; [et al.] (2010). «The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression». *Genome Res.*, Vol. 20, núm. 5, p.554-564.
- Hazzouri, M.; [et al.] (2000). «Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy». *Mol. Reprod. and develop.* Vol. 55, núm. 3, p.307-315.
- Hübner M.R.; [et al.] (2013). «Chromatin organization and transcriptional regulation». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 2, núm. 23, p.89-95.
- Hübner M.R i Spector D.L; (2010). «Chromatin dynamics». *Annu Rev Biophys.*, núm. 39, p. 471-489
- Ioannou, D.; [et al.] (2011). «Nuclear organisation of sperm remains remarkably unaffected in the presence of defective spermatogenesis». *Chromosome. Res.*, núm. 19, p. 741-753.
- Kumaran, R.I. i David L.S.; 2008. «A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence». *The Journal of cell biology.*, vol. 180, núm. 1, p.51-65.
- Meaburn, K.J.; [et al.] (2007). «Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis». *Aging cell.* vol. 6, núm. 2, p. 139-153.
- Mudrak, O.S; [et al.] (2012). «Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement». *PLoS One.*, núm.7:e52944
- Olszewska, M.; [et al.] (2008). «Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy». *Chr. Research.* vol. 16, núm. 6, p. 875-890
- Reddy, K.L.; [et al.] (2008). «Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina». *Nature.* vol. 452, núm. 7184, p. 243-247.
- Sarrate, Z.; [et al.] (2012). «Acrocentric bivalents positioned preferentially nearby to the XY pair in metaphase

- hase I human spermatocytes». *Fertility and Sterility*. vol. 98, núm. 5, p. 1241-1245.
- Solé, M.; [et al.] (2016). «Altered bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes from Robertsonian translocation carriers». *J. Assist. Reprod. Gen.* vol. 34, núm. 1, p. 131-138.
- Sun, H.B.; [et al.] (2000). «Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei.» *Biophysical J.* vol. 79, núm. 1, p. 184-190.
- Tanabe, H.; [et al.] (2002). «Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications.» *Mutation research*. vol. 504, núm. 1-2, p. 37-45.
- Vergés L.; [et al.] (2014). «Chromosome size, morphology, and gene density determine bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes». *Fertil Steril*. núm. 101, p. 818-824.
- Wijchers, P.; [et al.] (2015). «Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice.» *Genome res.* vol. 25, núm. 7, p. 958-969.
- Wiland E.; [et al.] (2008). «Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations». *Chromosome Res.*, núm. 16, p. 291-305.
- Zalenskaya I.A. i Zalensky A.O.; (2004) «Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome. Res.*, núm. 12, p. 163-173
- Zalensky A.O. i Zalenskaya I.A.; (2007) «Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information?» *Biochem. Soc. Trans.* núm. 35, p. 609-611.