

Diss. ETH Nr. 10'212

Beiträge zum Verständnis von Struktur und Funktion des Zentrosoms

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften der
Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

vorgelegt von
Ottorino Mazzetta
dipl. Natw. ETH
geboren am 19. Juli 1960
von Trun (GR)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. Jean-Claude Perriard, Referent
Prof. Dr. Hans Max Eppenberger, Korreferent
PD Dr. Urs-Peter Roos, Korreferent

Zusammenfassung

Über die Struktur und Funktion von Zentrosomen, Zentriolen, Basalkörpern und verwandten Zellstrukturen ist noch wenig bekannt. Daraus ergibt sich ein Bedarf an Forschung. Dieser Bedarf motivierte mich zur vorliegenden Arbeit. Die Untersuchungen hatten das Ziel, die Bausteine und Funktionen des Zentrosoms näher zu untersuchen.

Im ersten Teil der Untersuchungen galt es, die Präparation von Zentrosomen in unserem Labor zu etablieren. Hierzu wurden *Nematostella vectensis* verwendet, die leicht in Suspension gezüchtet werden können. Die Kultur- und Präparationsbedingungen und insbesondere die Faktoren, die eine Optimierung der Ausbeute ermöglichten, wurden zunächst geklärt. Eine wesentliche Komponente, die die Präparation beeinträchtigte, bildeten kontaminierende Partikel, die durch eine Änderung der Bedingungen beseitigt werden konnten.

Unter Anwendung der verbesserten Verfahren wurden Zentrosomen angereichert und als Immungene bei unterschiedlichen Immunisierungen *in vitro* eingesetzt. Die Bestandteile und die Herstellung der Reagenzien, die für eine solche Immunisierung erforderlich waren, wurden in unserem Labor produziert und auf ihre Aktivität hin getestet.

Die angereicherten zentrosomalen Proteine wurden auf unterschiedliche Arten den Milzzellen präsentiert. Einerseits wurden die Proteine an Kieselsäurepartikeln adsorbiert und in der Gegenwart von Makrophagen den Milzzellen präsentiert. Andererseits wurden die gelösten Proteine am Boden der Zellkulturflasche adsorbiert oder direkt zum Zellkulturmedium zugegeben. Als dritte Variante wurden die Antikörper fixiert und in der Gegenwart von Makrophagen den Milzzellen präsentiert.

Die Vielfalt der resultierenden Antikörper bei diesen Immunisierungen *in vitro* schwankte recht stark in Abhängigkeit von der Art der Präsentation der Immungene. Ein grosser Teil der resultierenden Antikörper zeigte vorwiegend eine zytoplasmatische Markierung. Der beste Weg für die Durchführung der Immunisierung *in vitro* mit zentrosomalen Proteinen besteht in der Adsorption der Immungene an Kieselsäurepartikel und der Präsentation zusammen mit Makrophagen. Aus diesen Immunisierungen *in vitro* resultierten 30 Antikörper, die sowohl zytoskelettale Strukturen in der Immunfluoreszenz markierten als auch eine Reaktion im Immunblot zeigten. Das Molekulargewicht dieser Peptide reichte von 29 bis 241 kD.

Bei der Immunisierung mit zentrosomalen Proteinen, die an Kieselsäurepartikeln adsorbiert waren und zusammen mit Makrophagen den Milzzellen präsentiert wurden, resultierten Antikörper, die in der Immunfluoreszenz eine stärker zentrosomal lokalisierte Färbung zeigten; bei einigen zeigten sich Muster, die den markierten Färbungen von Keratin, Vimentin und teilweise von Tubulin entsprachen.

Vier von diesen Antikörpern zeigten eine stärkere Färbung des Zentrosoms in der Immunfluoreszenz. Der Antikörper 3A2 zeigte eine punktförmige Markierung in der Nähe des Zellkerns in der Immunfluoreszenz und reagierte mit einem Peptid von 69 kD im Immunblot. Die anderen drei Antikörper 3H10, 4A9 und 7A7 zeigten eine zentrosomale Färbung, die stark der Immunfluoreszenz

von Keratin-Antikörpern gleich. 3H10 reagierte mit drei Peptiden von 56, 60 und 67 kD; 4A9 mit einem Peptid von 67 kD und 7A7 mit einem Peptid von 34 kD.

Der Stand der heutigen Einsicht in Struktur und Funktion der Zentrosomen verlangt nach weiterer Forschungsarbeit. Unsere Kenntnisse scheinen noch weit davon entfernt zu sein, die zentrosomalen Funktionen zu verstehen. Zunächst gilt es m.E. die biochemischen und funktionellen Komponenten noch umfassender zu analysieren; sodann ist die funktionelle Stellung des Zentrosoms im Zelleben zu definieren; schliesslich sind die Wechselwirkungen zu den übrigen Zellorganellen, insbesondere zum Kern, vertieft zu analysieren.

Summary

Centrosomes, centrioles, basal bodies and related structures are still poorly understood. This lack of knowledge was the motivation that led to the research presented here, which aimed at defining the building blocks and the functions of the centrosome more closely.

The first part of this thesis describes the preparation of centrosomes from *Namalva* cells. These cells have been chosen for their ability to grow in suspension. Contaminating particles have been found to be a major problem during the isolation of centrosomes. An optimized preparation scheme was established to both circumvent the contamination and to increase the yield.

The modified isolation procedure has been used to enrich centrosomes which were subsequently used as immunogens in IN VITRO immunization assays. The reagents of this assay have been produced in our lab and were tested for their activities. The proteins of the enriched centrosomal fraction were presented to spleen cells using one of the following three procedures: First, the proteins were adsorbed on silica beads and were exposed to spleen cells together with macrophages. Second, the proteins were adsorbed at the bottom of the culture flask or were directly added to the culture medium. Third, the proteins were fixed and exposed to spleen cells in the presence of macrophages.

The diversity of the resulting antibodies was strongly dependent on the choice of the presentation scheme. The second and the third scheme mainly resulted in antibodies that stained structures of the cytoplasm. The best results were obtained with the first scheme. Some of the antibodies yielded staining patterns that colocalized with centrosomal structures when used in immunofluorescence (IF) assays. Others showed patterns resembling those obtained with antibodies against keratin, vimentin or tubulin.

A total of 30 antibodies stained cytoskeletal structures in IF and reacted in immunoblotting experiments. The molecular weight range of the antigens was 29 kD to 241 kD. Four of these antibodies produced a pronounced staining of the centrosome by IF. Antibody 3A2 showed a point-like staining close to the nucleus and was reactive with a peptide of a molecular weight of 69 kD. The other three antibodies showed a labelling closely resembling the staining pattern with anti-keratin antibodies. Antibody 3H10 was reactive with three proteins of 56, 60 and 67 kD; 4A9 reacted with a protein of 67 kD and 7A7 with a protein of 34 kD.

The present understanding of both structure and function of the centrosome calls for additional research. Our knowledge still seems to be far from understanding the function of the centrosome. First the biochemical components have to be analyzed in greater detail. Subsequently, the interplay of the centrosome with other cellular organelles, in particular with the nucleus, has to be defined.