

Zellteilung

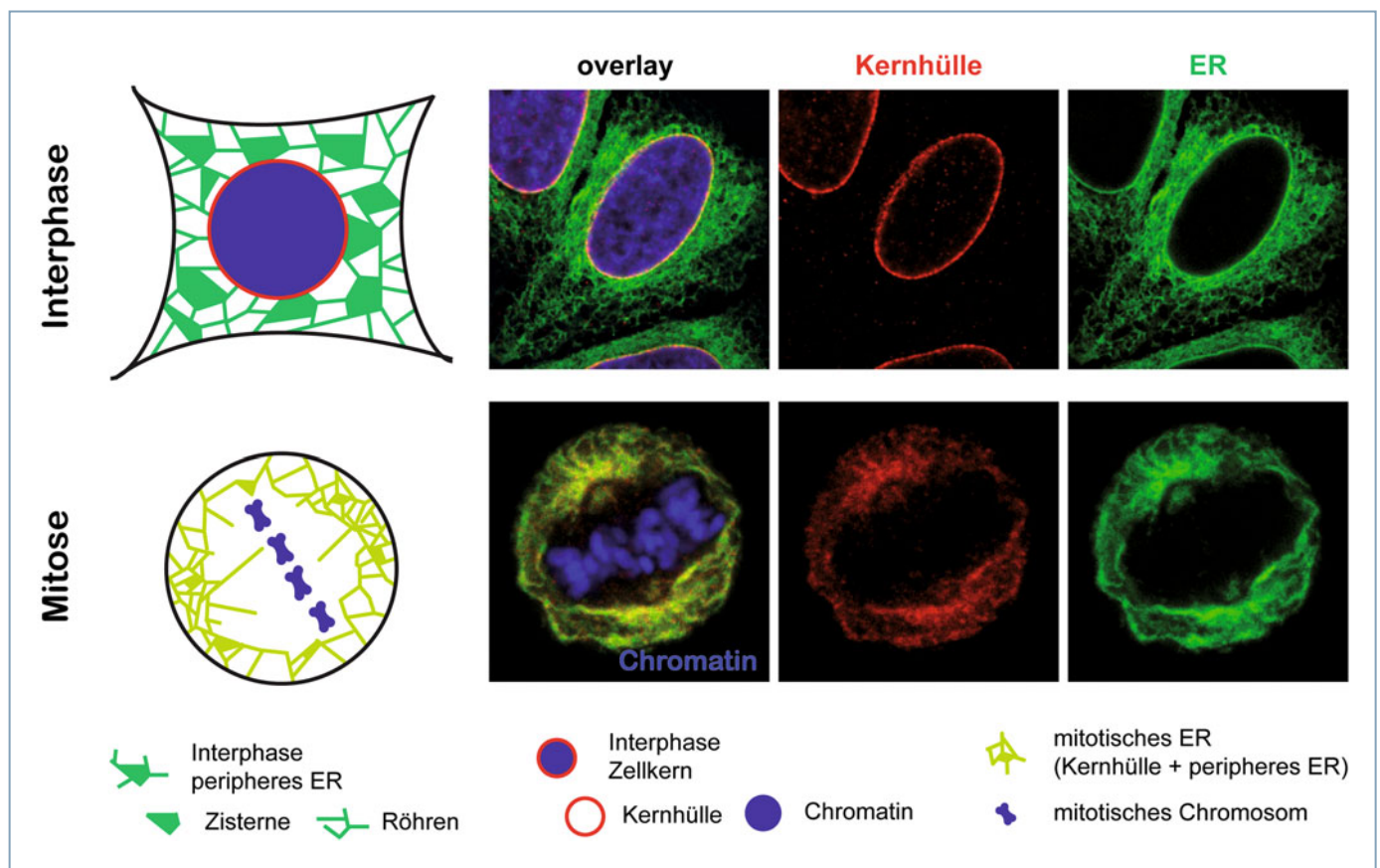
Das endoplasmatische Retikulum in der Mitose – ein wandelbares Netz

ANNE SCHLAITZ
ZENTRUM FÜR MOLEKULARE BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG

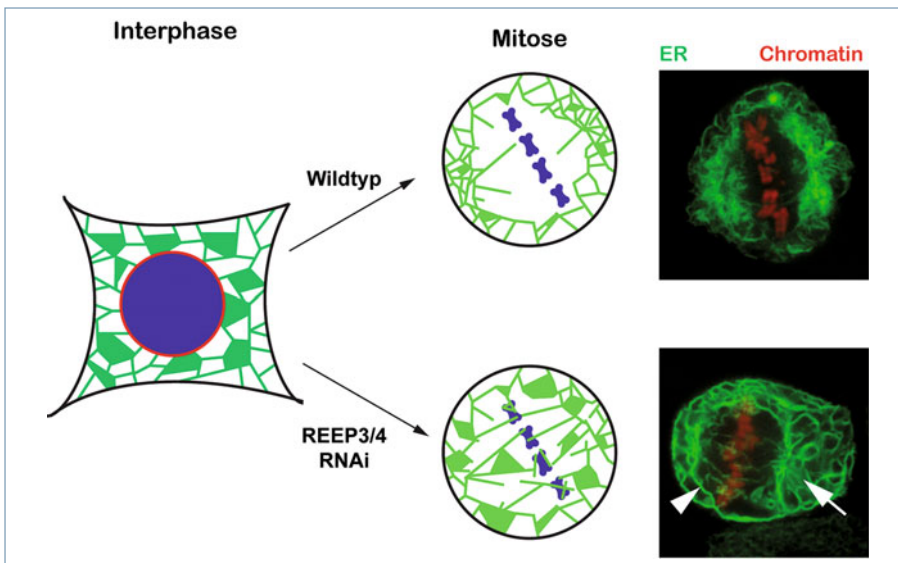
In order to divide successfully, cells need to reorganize their interior including membrane-bound organelles such as the endoplasmic reticulum (ER). The ER serves as sink and source for the nuclear envelope and undergoes distinct transformations in its morphology and dynamics during cell division. To fully appreciate the functions of ER remodeling during cell division it will be essential to first achieve a detailed understanding of the underlying molecular mechanisms.

DOI: 10.1007/s12268-020-1493-0
© Die Autorin 2020

■ Zellproliferation und das Wachstum mehrzelliger Organismen wären undenkbar ohne mitotische Zellteilung. Im Zuge der Mitose erfährt die gesamte Zelle einschließlich ihrer membrangebundenen Organellen umfassende Veränderungen [1]. Augenfällig ist dies, wenn in der mitotischen Prometaphase (siehe Kasten) die Kernhülle zerfällt und dadurch die Ausbildung der mitotischen Spindel ermöglicht wird. Während des Kernhüllenzerfalls verteilen sich membrangebundene Bestandteile der Kernhülle im endoplasmatische Retikulum (ER), da Kernhülle und das cytoplasmatische (periphere) ER ein zusammenhängendes Membransystem bilden.



▲ **Abb. 1:** Organisation des ERs in Interphase und Mitose. In der Interphase stehen Kernhülle und peripheres ER in Verbindung, die Kernhülle weist jedoch eine spezifische Proteinzusammensetzung auf. Beim Kernhüllenzerfall verteilen sich Membran-assoziierte Proteine der Kernhülle im gesamten ER. Das ER erfährt zudem während der Mitose eine Transformation zu mehr Membranröhren und kleineren Blättern. Die Mikroskopieaufnahmen zeigen den ER-Marker GFP-Sec61 β , das mittels Immunfluoreszenz markierte Kernhüllenprotein Emerin und mit Hoechst-Farbstoff angefärbtes Chromatin, die mittels konfokaler *laser scanning*-Mikroskopie detektiert wurden.



▲ **Abb. 2:** REEP3 und REEP4 strukturieren das ER für die Mitose. Während der Metaphase halten REEP3/4 mitotisches Chromatin frei von ER und vermitteln die erhöhte Krümmung von ER-Membran. Nach Depletion von REEP3/4 durch *RNA interference* (RNAi) akkumuliert ER während der Metaphase am Chromatin und ausgedehnte ER-Blätter werden sichtbar. Die mittels *spinning disk*-Mikroskopie aufgenommenen Bilder zeigen lebende Zellen während der Mitose, die den ER-Marker GFP-Sec6 1 β sowie den Chromatinmarker Histone 2B-mCherry exprimieren. Pfeil: ER-Blatt in Draufsicht; Pfeilkopf: ER-Blatt im Querschnitt.

den (Abb. 1, [2]). In späten Stadien der Mitose kontaktiert ER die getrennten Chromatinmassen, um eine neue Kernhülle auszubilden. Kernhüllenzerfall und -wiederaufbau und somit der erfolgreiche Ablauf der Mitose hängen daher entscheidend von der Struktur und dem dynamischen Verhalten des ERs ab. Die Morphologie des ERs sowie die Verbindungen des ERs zum Cytoskelett verändern sich grundlegend beim Übergang von der Interphase in die Mitose, um die Mitose-spe-

zifischen Funktionen des Organells zu gewährleisten [3, 4]. Hier beschreibe ich die mitotische Reorganisation des ERs und bisherige Erkenntnisse zu den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Faktoren.

Aufbau und Morphologie des ERs

Das ER durchspannt das gesamte Cytoplasma als ein zusammenhängendes dreidimensionales Netzwerk. Dieses Netzwerk besteht aus Membranröhren und flachen Membran-

Stadien der Mitose

Prophase

Chromosomen beginnen zu kondensieren, Kernhülle wird destabilisiert

Prometaphase

Kernhülle zerfällt, Mikrotubuli-basierte mitotische Spindel bildet sich aus

Metaphase

Spindel ausgebildet, Chromosomen in der Metaphaseplatte aufgereiht

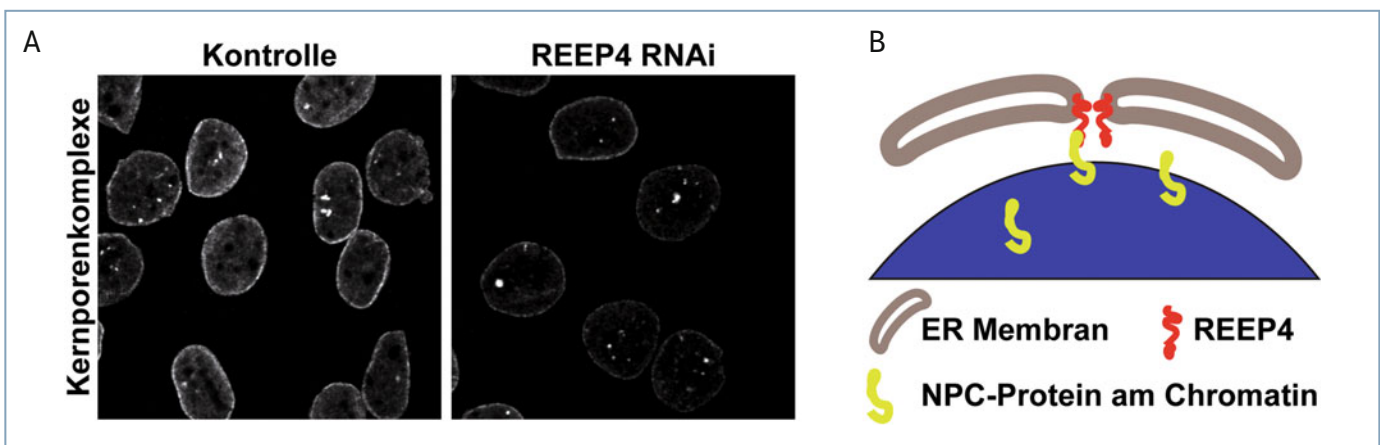
Anaphase

Trennung der Tochterchromosomen, Bildung der neuen Kernhülle beginnt

Cytokinese

Trennung der Tochterzellen

säcken unterschiedlicher Größe, den ER-Blättern. Ein spezialisiertes, großflächiges ER-Blatt umschließt das Chromatin und bildet die Kernhülle. In die Kernhülle eingefügt sind Kernporenkomplexe, welche den Transport zwischen Kern und Cytoplasma vermitteln. ER-Blätter bestehen aus zwei ebenen Lipiddoppelschichten, die an ihren Rändern durch stark gekrümmte Membranstücke verbunden sind und so einen Hohlraum bilden. Im Gegensatz zu ER-Röhren entlang ihres Umfangs eine hohe Krümmung auf. Regionen hoher Membranverkrümmung im ER entstehen durch die Einbettung von Proteinen mit einer Retikulon-Homologie-Domäne (RHD) in die ER-Membran. RHD-Proteine



▲ **Abb. 3:** REEP4 trägt zur Bildung von Kernporenkomplexen bei. **A,** Nach Depletion von REEP4 ist die Intensität des immunmarkierten Kernporenproteins ELYS reduziert. Dies bedeutet, dass die Kernporenkomplexdichte verringert ist. **B,** Mögliche Rolle von REEP4 bei der Kernporenbildung während der Anaphase: REEP4 an verkrümmten Rändern der Fenestrierungen assoziiert mit Kernporenproteinen am Chromatin und bringt so Kernporen-Vorläufer-Membran in die Nähe von Vorstufen des Kernporenkomplexes.

bewirken durch eine amphipathische Helix, möglicherweise durch eine „Keilwirkung“ ihrer membranassoziierten Domäne und durch Oligomerisierung die Wölbung der ER-Membran ins Cytosol hinein. Zwei Familien von RHD-Proteinen verkrümmen in Säugerzellen die ER-Membran: die Retikulons (RTN1–RTN4) und die REEPs (REEP1–REEP6) [5].

Für die Mitose erfährt das ER eine Transformation hin zu mehr Röhren und kleineren ER-Blättern (**Abb. 1**). Die stärkere Membranverkrümmung in der Mitose sollte auf membranverformenden Proteinen beruhen und tatsächlich wurden vor kurzem die RHD-Proteine REEP3 und REEP4 als spezifische Determinanten der mitotischen ER Morphologie identifiziert (**Abb. 2**, [6]).

Bisher wurden nur ER-Morphologien während der Interphase und der mitotischen Metaphase systematisch analysiert. Es ist ungeklärt, wie die ER-Membranverkrümmung während Prophase und Prometaphase abläuft und wie die Interphasen-ER-Morphologie nach der Zellteilung wieder erreicht

wird. Während der Anaphase wird jedoch das Tochterchromatin von ER-Blättern umhüllt, welche eine hohe Zahl von beide Lipiddoppelschichten durchspannenden Öffnungen („Fenestrierungen“) aufweisen [7]. Diese Fenestrierungen sind topologisch äquivalent zu Kernporen und bilden wichtige Vorstufen für die Kernporenkomplexe, die in der Anaphase in der sich ausbildenden Kernhülle geformt werden. REEP4 befördert die Entstehung der Kernporenkomplexe am Ende der Mitose und bringt möglicherweise dabei die gekrümmten Ränder der ER-Fenestrierungen in Kontakt mit Proteinen des Kernporenkomplexes (**Abb. 3**, [8]).

ER-Dynamik und -Verteilung

Die bekannten Mechanismen für die Dynamik des peripheren ERs während der Interphase beruhen auf zwei Arten der Wechselwirkung des Organells mit Mikrotubuli. Erstens ziehen Mikrotubuli-assoziierte Motoren neue Röhren aus dem ER-Netzwerk, zweitens nehmen polymerisierende Mikrotubuli-Enden direkten Kontakt mit dem ER

auf und verlängern die Membranröhren gleichzeitig mit der Mikrotubuli-Elongation [9]. Die direkte Kopplung von ER an polymerisierende Mikrotubuli-Enden wird in der Mitose durch Phosphorylierung des Adaptorproteins STIM1 unterbunden [10]. Ob die Wechselwirkung von Mikrotubuli-assoziierten Motoren mit peripherem ER sich während der Mitose ändert, ist unklar. Zu Beginn der Mitose bindet jedoch mit Dynein ein anderer Mikrotubuli-Motor an die Kernhülle. Die gebundenen Dynein-Moleküle bewegen sich entlang von Mikrotubuli und destabilisieren mittels der ausgeübten Zugkräfte die Kernmembran. Schließlich entstehen Risse in der Kernhülle, wodurch der Kernhüllenzerfall beschleunigt und Kernmembran vom Chromatin weg transportiert wird [11].

Während der Metaphase treten ständig einige wenige ER-Röhren in die Spindelmitte ein und ziehen sich wieder zurück, sodass der Bereich innerhalb der mitotischen Spindel weitgehend frei von ER ist. Der Abtransport von ER aus der Spindel wird ebenfalls von REEP3 und REEP4 vermittelt, welche

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Mikroskopie des ERs während der Mitose

Um Organellen wie das ER mittels Lichtmikroskopie zu untersuchen, werden Zellen häufig für indirekte Immunfluoreszenz fixiert. In den fixierten Zellen können dann verschiedene zelluläre Marker durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht und verglichen werden (**Abb. 1**). Die Methode der Wahl ist hier die konfokale *laser scanning*-Mikroskopie, die eine sehr gute Auflösung erlaubt und eine hohe Flexibilität bei den Aufnahmeparametern bietet.

Die Dynamik des ERs muss in lebenden Zellen analysiert werden. In diesen bleibt außerdem die ER-Morphologie am besten erhalten (**Abb. 2**). Für das *live imaging* werden Zellen benutzt, die Fluorophor-markierte ER-Reporter exprimieren, z.B. GFP-Sec61 β . Zusätzlich können in diesen Zellen DNA oder Mikrotubuli durch fluoreszente Farbstoffe wie *SiR dyes* angefärbt

werden, womit eine zuverlässige Zuordnung der Zellzyklusstadien möglich wird. Lebende Zellen während der Mitose sollten unserer Erfahrung nach möglichst mittels *spinning disk*-Mikroskopie aufgenommen werden. Bei dieser Methode werden die Zellen nur wenig Laserlicht ausgesetzt und durchlaufen das mitotische Programm in der Regel problemlos. Gleichzeitig bietet *spinning disk*-Mikroskopie eine gute Auflösung und ein hervorragendes Signal-Rausch-Verhältnis.

Die Quantifizierung von Morphologie-Phänotypen sollte möglichst „blind“ erfolgen, dafür sind die *blind analysis tools*-Plugins (https://imagej.net/Blind_Analysis_Tools) für Fiji [13] oder der Microscopy Image Browser (MIB, [14]) ausgezeichnete Optionen.

neben ihrer membranverformenden Domäne auch Sequenzmotive für die Mikrotubuli-Bindung aufweisen. Wenn REEP3 und REEP4 fehlen, akkumuliert ER am mitotischen Chromatin, was zu Defekten während der Trennung der Chromosomen und der Cytokinese führt (**Abb. 2**, [12]). Die korrekte Verteilung des ERs und insbesondere seine Entfernung aus dem Spindelbereich in der Metaphase wird somit durch REEP3 und REEP4 gewährleistet und ist essenziell für den fehlerfreien Ablauf der Zellteilung.

Offene Fragen

Während der Mitose erfährt das ER erhöhte Membrankrümmung – welchen Funktionen diese Transformation dient, ist bisher jedoch nicht klar. Möglicherweise sind die entstehenden Membranröhren und kleineren Blätter beweglicher und können darum effizienter transportiert werden. Um diese Bewegungen und gleichzeitig das Zusammenspiel von peripherem ER und Kernhülle im Laufe der Mitose im Detail zu verstehen, benötigen wir zeitlich und räumlich hochaufgelöste Daten für das Verhalten beider Domänen über die gesamte Mitose.

REEP3 und REEP4 vermitteln die Metaphase-spezifische Morphologie des ER und sind nicht erforderlich für die ER-Morphologie während der Interphase. Vermutlich werden daher die membranverformenden Eigenschaften von REEP3 und REEP4 in der Mitose aktiviert. Bisher ist jedoch unklar, wie REEP3

und REEP4 für ihre mitotischen Funktionen reguliert werden.

Während der Mitose wird der Großteil des ER vom Chromatin fern gehalten. Einige ER-Membranröhren treten jedoch in die Spindel ein. Wie gelangen sie dorthin und haben diese ER-Strukturen eine Funktion während der Mitose? Bilden sie möglicherweise eine Vorstufe für die Kernhüllenbildung in der Anaphase? Auch für die Anaphase ist unklar, ob die rasche Rekrutierung des ER für die Kernhüllenreueubildung allein durch die Affinität von Kernhüllenproteinen zum Chromatin erreicht wird.

Das ER wird für die Mitose grundlegend restrukturiert – um die Funktionen dieser Reorganisation zu verstehen, benötigen wir detailliertere Einblicke in die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. ■

Literatur

- [1] Carlton JG, Jones H, Eggert US (2020) Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:151–166
- [2] Güttinger S, Laurell E, Kutay U (2009) Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:178–191
- [3] Puhka M, Joensuu M, Vihinen H et al. (2009) Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 23:2424–2432
- [4] Schlaitz AL (2014) Microtubules as key coordinators of nuclear envelope and endoplasmic reticulum dynamics during mitosis. *Bioessays* 36:665–671
- [5] Park SH, Blackstone C (2010) Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep* 11:515–521
- [6] Kumar D, Golchoubian B, Belevich I et al. (2019) REEP3 and REEP4 determine the tubular morphology of the endoplasmic reticulum during mitosis. *Mol Biol Cell* 30:1377–1389
- [7] Otsuka S, Steyer AM, Schorb M et al. (2018) Postmitotic nuclear pore assembly proceeds by radial dilation of small membrane openings. *Nat Struct Mol Biol* 25:21–28
- [8] Golchoubian B, Brunner A, Bragulat-Teixidor H et al. (2020) REEP4 is recruited to the inner nuclear membrane by ELYS and promotes nuclear pore complex formation. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.30.320333>
- [9] Friedman JR, Voeltz GK (2011) The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network (2011). *Trends Cell Biol* 21(12):709–717.
- [10] Smyth JT, Beg AM, Wu S et al. (2012) Phosphoregulation of STIM1 leads to exclusion of the endoplasmic reticulum from the mitotic spindle. *Curr Biol* 22:1487–1493
- [11] Beaudouin J, Gerlich D, Daigle N et al. (2002) Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* 108:83–96
- [12] Schlaitz AL, Thompson J, Wong CC et al. (2013) REEP3/4 ensure endoplasmic reticulum clearance from metaphase chromatin and proper nuclear envelope architecture. *Dev Cell* 26:315–323
- [13] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
- [14] Belevich I, Joensuu M, Kumar D et al. (2016) Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. *PLoS Biol* 14:e1002340

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Anne Schlaitz
 Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 282
 D-69120 Heidelberg
a.schlaitz@zmbh.uni-heidelberg.de
www.zmbh.uni-heidelberg.de/schiebel/Schlaitz/default.shtml

AUTORIN



Anne Schlaitz

1997–2003 Biochemiestudium in Tübingen und Berlin. 2003–2007 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, in der Gruppe von Prof. Dr. T. Hyman. 2007–2013 Postdoktorandin an der University of California, Berkeley, USA, im Labor von Prof. Dr. R. Heald. Seit 2014 Leiterin einer Forschungseinheit am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH).