

Compartmentalization of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its potential role in polar mRNA localization

Doctoral Thesis

Author(s):

Lüdeke, Cosima

Publication date:

2004

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004829326>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS ETH NO. 15488

Compartmentalization of the Cortical Endoplasmic Reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* and Analysis of its Potential Role in Polar mRNA Localization

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Cosima Lüdeke
Dipl. Biol., Ludwig-Maximilians-Universität München
born January 14th 1973
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Yves Barral, examiner
Prof. Dr. Markus Aebi, co-examiner
Prof. Dr. Ari Helenius, co-examiner

Abstract

Polar localization of mRNA has been analyzed in detail for two genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *ASH1* and *IST2*. *ASH1* encodes a daughter-specific nuclear transcriptional regulator and Ist2p is an integral plasma membrane protein involved in ion transport. Co-translational localization of these mRNAs to the bud depends on the type V myosin, Myo4p, as well as on She2p and She3p. The She proteins could either mediate the association of mRNA molecules with the motor protein or with a receptor structure at their destination in the bud, or be involved in both processes. The nature of the receptor that anchors the polar mRNAs in the bud remains unclear so far.

In this work, the *ASH1* gRNA system of Bertrand *et al.* was used to study mRNA dynamics in living cells. On the basis of the results described here, we challenge the model that the transport of polar mRNAs into the bud is itself Myo4p-dependent and suggest the possibility that the myosin rather transports an anchor for bud-localized mRNAs.

Time-lapse microscopy of a She3p-GFP fusion protein revealed a cell-cycle dependent, polar localization of the protein to the bud cortex and cytoplasmic tubules. It could be shown by FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) that She3p shuttles between mother cell and bud. Because this movement is slower than the one detected for Myo4p, it seem likely that She3p becomes anchored in the bud upon delivery by the motor molecule. In differential centrifugation analyses, the She3p-GFP fusion protein accumulates in the larger membrane fraction that contains plasma membrane (PM) and endoplasmic reticulum (ER).

We analyzed with FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) and FLIP whether the reticulum represents a structural continuum throughout mother and daughter cell. ER membrane proteins such as Sec61p and Sec22p diffuse freely in each compartment, yet are restricted in their ability to move from the mother cell into the bud or vice versa. The maintenance of this diffusion barrier is dependent on an intact septin cytoskeleton. Furthermore, the Sec61p-GFP signal at the cell cortex is discontinuous in the bud neck in confocal images of yeast cells. However, electron micrographs of yeast bud-necks showed a continuous cortical ER throughout the neck (Anne Spang, Tübingen). We conclude from these studies that the cortical ER in budding yeast is structurally different in the bud neck than at the cortex in mother cell and bud. This suggests a powerful mechanism for anchoring asymmetrically distributed molecules, such as polar mRNAs and their associated proteins, to one side of the cell. Potentially, binding of a polysome to one or several several translocon

pores on the ER surface is sufficient to restrict an mRNA molecule to the bud once it has been delivered there. Thus, a specialized domain of the ER could serve as an anchoring platform for polar mRNAs in the bud.

Zusammenfassung

Die polare Lokalisierung von mRNA Molekülen wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* für zwei Gene detailliert untersucht. *ASH1* kodiert für einen tochterzellspezifischen Transkriptionsfaktor und Ist2p ist ein integraler Ionentransporter der Plasmamembran. Cotranslationale Lokalisierung der beiden mRNA-Moleküle in die Knospe ist abhängig von dem Typ-V-Myosin Myo4p und den Proteinen She2p und She3p. Die She-Proteine vermitteln möglicherweise die Bindung der mRNA-Moleküle mit dem Motorprotein oder mit einem Rezeptor an ihrem Bestimmungsort in der Knospe. Die Beschaffenheit der Verankerung von polaren mRNA-Molekülen in der Knospe ist bislang völlig unklar.

In der vorliegenden Untersuchung wurde das gRNA-System von Bertrand *et al.* verwendet, um das dynamische Verhalten von *ASH1* mRNA-Molekülen in lebenden Zellen zu analysieren. Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse stellen wir das herkömmliche Modell in Frage, demzufolge der mRNA-Transport in die Knospe selbst Myo4p-abhängig ist. Stattdessen schlagen wir vor, dass alternativ das Myosin einen Rezeptor für knospentämmige mRNAs transportieren könnte.

Zeitraffer-Fluoreszenzmikroskopie eines She3-GFP-Fusionsproteins enthüllte eine zellzyklusabhängige, polare Lokalisation des Proteins entlang der Knospentrinde und auf zytoplasmatischen Röhren. Mittels FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) konnte nachgewiesen werden, dass She3p zwischen Mutterzelle und Knospe hin- und herpendelt. Da diese Bewegung langsamer ist als die entsprechend für Myo4p-GFP detektierte, erscheint es wahrscheinlich, dass She3p, nachdem es von dem Myosin in die Knospe transportiert wurde, dort verankert wird.

In differentiellen Zentrifugationsexperimenten wurde das She3p-GFP Fusionsprotein in der Membranfraktion angereichert, die die Plasmamembran (PM) und das Endoplasmatische Reticulum (ER) enthält. Wir haben daraufhin mittels FRAP (Fluoreszenz Recovery After Photobleaching) und FLIP untersucht, ob das ER in Mutterzelle und Knospe eine einzige strukturelle Einheit bildet. Die ER-Membranproteine Sec61p und Sec22p diffundieren ungedrosselt in jedem Kompartiment, sind aber in ihrer Fähigkeit, sich von der Mutterzelle in die Knospe oder umgekehrt zu bewegen, stark eingeschränkt. Die Aufrechterhaltung dieser Diffusionsbarriere ist abhängig von einem unversehrten Septinzytoskelet. Desweiteren ist in konfokalen Aufnahmen das Fluoreszenzsignal von Sec61p-GFP im Knospenhals unterbrochen. Trotzdem konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein

kontinuierliches kortikales ER im Knospenhals nachgewiesen werden (A. Spang, Tübingen). Wir schliessen aus diesen Untersuchungen, dass sich das kortikale ER im Knospenhals der Bäckerhefe strukturell von dem der Rinde in beiden Kompartimenten unterscheidet und dadurch die Diffusion von Proteinen zwischen den beiden Kompartimenten inhibiert. Dieses Ergebnis legt einen beeindruckenden Mechanismus für die Verankerung asymmetrisch verteilter Moleküle, wie z.B. polarer mRNAs und der mit ihnen assoziierten Proteine, nahe. Möglicherweise ist die Bindung eines Polysomes an eine oder mehrere Translokoporen auf der Oberfläche des ER bereits ausreichend, um ein mRNA-Molekül in der Knospe zu halten nachdem es einmal dorthin transportiert wurde. Eine spezialisierte Domäne des ER könnte folglich die Plattform für die Fixierung polarer mRNAs in der Hefeknospe bilden.