

University of Groningen

Establishment of single-cell readouts for the study of TORC1 signaling dynamics in budding yeast

Vuillemenot, Luc-Alban Pierre Eric

DOI:

[10.33612/diss.1085533225](https://doi.org/10.33612/diss.1085533225)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2024

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Vuillemenot, L.-A. P. E. (2024). *Establishment of single-cell readouts for the study of TORC1 signaling dynamics in budding yeast*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.1085533225>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Een centraal doel van het werk dat in deze proefschrift beschreven staat, was het ontwikkelen en karakteriseren van nieuwe readouts voor de studie van gist TORC1 via enkelcelmicroscopie. Met dit doel voor ogen streefden we naar twee alternatieve doelstellingen: de gedetailleerde karakterisering van het endogene Sfp1-eiwit als een TORC1-readout, en de ontwikkeling van nieuwe readouts gebaseerd op mTORC1-substraten. Zoals bleek, is de regulatie van Sfp1 aanzienlijk complexer dan eerder gedacht. Onze bevindingen in **Hoofdstuk 2** toonden aan dat Sfp1 in feite een gezamenlijk substraat is van TORC1 en PKA, en dat beide paden de subcellulaire lokalisatie van het eiwit controleren. De regulatie van de Sfp1-lokalisatie wordt deels gemedieerd door een Nucleaire Export Signaal (NES) wiens activiteit wordt gecontroleerd door PKA- en mogelijk TORC1-afhankelijke fosforylering van nabijgelegen residuen. Verder toonden we aan dat TORC1 en PKA de lokalisatie van Sfp1 onafhankelijk van elkaar reguleren, aangezien het verlies van Sfp1-fosforylering vanuit elk pad voldoende is om de translocatie van Sfp1 van de kern naar het cytoplasma te veroorzaken. Ten slotte ontdekten we dat de C-terminale zinkvinger domeinen van Sfp1 betrokken zijn bij een parallel lokalisatiemechanisme dat responsief is aan zowel TORC1- als PKA-activiteit, wat een extra laag van regulatie biedt die verder onderzocht moet worden.

Voortbouwend op ons verbeterde begrip van de regulatie van Sfp1, analyseerden we in **Hoofdstuk 3** de bijdragen van TORC1 en PKA aan de oscillatoire lokalisatiedynamiek van Sfp1 tijdens de celcyclus. Door de lokalisatiedynamiek van Sfp1 in verschillende mutant stammen te ontrafelen, toonden we aan dat de twee paden verschillende aspecten van het lokalisatiepatroon van het eiwit gedurende de celcyclus controleren. Terwijl zowel PKA als TORC1 de gemiddelde nucleaire accumulatie van Sfp1 over de celcyclus reguleren, lijkt PKA de belangrijkste regulator achter de piek van nucleaire lokalisatie tijdens G1. Naast TORC1 en PKA lijken de C-terminale zinkvinger domeinen noodzakelijk voor het handhaven van Sfp1 in de kern tijdens de vroege S-fase. Daarentegen konden noch TORC1 noch PKA worden geassocieerd met de piek in Sfp1-lokalisatie tijdens G2/M. Door de lokalisatiedynamiek van aanvullende gezamenlijke TORC1 en PKA substraten te onderzoeken, observeerden we dat deze lokalisatiepiek

gedeeld wordt door verschillende substraten naast Sfp1. Een wiskundig model dat de nucleaire accumulatie van Sfp1 over de celcyclus beschrijft, leidde ons tot de hypothese dat deze piek voortkomt uit celcyclusafhankelijke veranderingen in nucleocytoplasmatische translocatie.

Zoals Hoofdstukken 2 en 3 duidelijk maakten, compliceren de complexe (en deels onopgeloste) regulerende mechanismen van Sfp1 het gebruik ervan als een TORC1-specifiek substraat. Daarom wendden we ons in **Hoofdstuk 4** tot zoogdier TORC1-substraten en verkenden hun potentieel als enkelcel readouts van gist TORC1. Onze studie toonde aanvankelijk aan dat TORCAR, een zoogdier FRET-sensor gebaseerd op 4E-BP1, snelle (de)fosforylering in vivo in knoppende gist onderging in reactie op acute TORC1-activiteitsveranderingen. Hoewel TORCAR onbetrouwbaar bleek vanwege inconsistente FRET-reacties, toonden we aan dat 4E-BP1-fosforylering zeer gevoelig was voor TORC1-activiteitsfluctuaties. Het monitoren van de 4E-BP1-fosforyleringsdynamiek in gesynchroniseerde dochtercellen onthulde een toename van TORC1-activiteit tijdens de G1-fase van de celcyclus. Verder toonden we aan dat 4E-BP1 de basis kon vormen van een translocatie-gebaseerde reporter van TORC1-activiteit compatibel met enkelcelmicroscopie. Anderzijds bleek TFEB ongeschikt als een translocatie-gebaseerde TORC1-reporter in gist, aangezien het TORC1-activiteitsveranderingen in onze tests niet nauwkeurig weerspiegelde. Tot slot biedt **Hoofdstuk 5** een samenvatting van onze resultaten en verkent mogelijke wegen voor verder onderzoek.

Résumé français

Un objectif central du travail décrit dans cette thèse était de développer et de caractériser de nouveaux rapporteurs pour l'étude de la TORC1 de levure par microscopie monocellulaire. À cette fin, nous avons poursuivi deux objectifs alternatifs : la caractérisation détaillée de la protéine endogène Sfp1 comme rapporteur de TORC1, et le développement de nouveaux rapporteurs basés sur les substrats de mTORC1. Il s'est avéré que la régulation de Sfp1 est beaucoup plus complexe que ce que l'on pensait auparavant. Nos résultats du **Chapitre 2** ont montré que Sfp1 est en fait un substrat commun de TORC1 et de PKA, et que les deux voies contrôlent la localisation subcellulaire de la protéine. La régulation de la localisation de Sfp1 est partiellement médiée par un Signal d'Export Nucléaire (NES) dont l'activité est contrôlée par la phosphorylation dépendante de PKA et possiblement de TORC1 via des résidus voisins. De plus, nous avons montré que TORC1 et PKA régulent la localisation de Sfp1 indépendamment l'un de l'autre, puisque la perte de phosphorylation de Sfp1 par chaque voie est suffisante pour provoquer la translocation de Sfp1 du noyau vers le cytoplasme. Enfin, nous avons découvert que les domaines de doigt de zinc C-terminaux de Sfp1 sont impliqués dans un mécanisme de localisation parallèle qui répond à la fois à l'activité de TORC1 et de PKA, offrant une couche supplémentaire de régulation qui doit être étudiée de manière plus approfondie.

En nous appuyant sur notre compréhension améliorée de la régulation de Sfp1, nous avons analysé dans le **Chapitre 3** les contributions de TORC1 et de PKA à la dynamique de localisation oscillatoire de Sfp1 pendant le cycle cellulaire. En analysant la dynamique de localisation de Sfp1 dans différentes souches mutantes, nous avons montré que les deux voies contrôlent différents aspects du motif de localisation de la protéine pendant le cycle cellulaire. Tandis que PKA et TORC1 régulent l'accumulation nucléaire moyenne de Sfp1 sur le cycle cellulaire, PKA semble être le principal régulateur derrière le pic de localisation nucléaire pendant la phase G1. En plus de TORC1 et de PKA, les domaines zinc finger C-terminaux semblent nécessaires pour maintenir Sfp1 dans le noyau pendant la phase S précoce. En revanche, ni TORC1 ni PKA n'ont pu être associés au pic de localisation de Sfp1 pendant la phase G2/M. En examinant la dynamique de localisation de substrats communs supplémentaires de TORC1 et de PKA, nous avons

observé que ce pic de localisation est partagé par différents substrats en plus de Sfp1. Un modèle mathématique décrivant l'accumulation nucléaire de Sfp1 sur le cycle cellulaire nous a conduits à l'hypothèse que ce pic résulte de changements dépendants du cycle cellulaire dans la translocation nucléocytoplasmique.

Comme les Chapitres 2 et 3 l'ont clairement montré, les mécanismes de régulation complexes (et partiellement non résolus) de Sfp1 compliquent son utilisation comme substrat spécifique de TORC1. Par conséquent, dans le **Chapitre 4**, nous nous sommes tournés vers les substrats de TORC1 d'origines mammifères et avons exploré leur potentiel comme rapporteurs de TORC1 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Notre étude a initialement montré que TORCAR, un rapporteur FRET d'origine mammifère basé sur 4E-BP1, subissait une (dé)phosphorylation rapide *in vivo* dans la levure en réponse à des changements aigus d'activité de TORC1. Bien que TORCAR se soit révélé peu fiable en raison de réponses FRET incohérentes, nous avons montré que la phosphorylation de 4E-BP1 était très sensible aux fluctuations d'activité de TORC1. Le suivi de la dynamique de phosphorylation de 4E-BP1 dans des cellules filles synchronisées a révélé une augmentation de l'activité de TORC1 pendant la phase G1 du cycle cellulaire. De plus, nous avons montré que 4E-BP1 pouvait servir de base à un rapporteur de l'activité de TORC1 basé sur la translocation, compatible avec la microscopie monocellulaire. En revanche, TFEB s'est avéré inadapté comme rapporteur de TORC1 basé sur la translocation dans la levure, car il ne reflétait pas précisément les changements d'activité de TORC1 dans nos tests. Enfin, le **Chapitre 5** présente un résumé de nos résultats et explore des voies possibles pour de futures recherches.

Acknowledgements

I would now like to take this opportunity to thank and express my gratitude to everyone whose support and guidance have made this PhD thesis possible.

First and foremost, I would like to thank **Andreas** and **Kathrin** for giving me the opportunity to embark on this PhD adventure. Andreas, I could not have hoped for a better supervisor, both on the scientific and personal levels. Thank you for always supporting me, being positive, and being available. Your guidance and knowledge were invaluable and provided the perfect environment for the accomplishment of this thesis. I truly enjoyed our discussions and definitely learned a lot from you. I hope you also enjoyed guiding me throughout this PhD journey. I wish you the best personally and in your research endeavors, which I hope we will continue to discuss in the future.

Matthias, thank you for welcoming me into the MSB group and for always striving to create the best lab culture and environment. I truly enjoyed it.

I would like to extend my gratitude to my assessment and examination committee – **Prof. M. Heinemann, Prof. L. M. Veenhoff, Prof. B. André, and Dr. Sonja Billerbeck** – for taking the time to read my thesis and for being present during my defense.

To my paranympths, **José** and **Julius**, I would like to thank you dearly for being present at my defense and for all your help. I truly enjoyed working with you and our discussions both inside and outside the lab.

To the Bruderschaft, **Vakil** and **Mattia**, my dear friends: You are both among the most brilliant people I've ever met, and seeing or talking to you is always a joy. I feel so lucky to have met you both; without you, my PhD journey would have been definitely different. I could write so much about how much I enjoyed spending time with you. Vakil, from our first interaction, I enjoyed all our fruitful conversations and adventures. Thank you for always being joyful, supportive, and making me laugh. You have definitely brightened my days in the lab, and you are a real inspiration. **Alisa**, thank you for always being so kind and funny. I hope you will fulfil all your dreams with Vakil and **Ingrid**.

ACKNOWLEDGEMENTS

Mattia, I'm so grateful to know you. I've always enjoyed spending time with you during our numerous coffees, discussions, and runs. I will always have fond memories of our time together. We laughed so much. Thank you for being so kind, supportive, and inspiring. Maybe one day we will manage to make our custom aquarium? **Irene**, I was glad to meet you and wish you all the best with Mattia. I'm sure all of you will succeed in your endeavors; you already are.

To all the other **MSB lab members** that I had the pleasure to meet: Paolo, Diego, Silke, Renate, Tamara, Andriana, Yulan, Hanna, Douwe, Thanasis, Tom, Serdar, Haoqi, Xiang, Enrico, Vítor, Andre, Joana, Julia, Dario, Perna, Kamiel, Nicolas, Ewan, Katerina, Valeriia, Brady, Brecht, and Olle. Having great lab members is so important, and you all contributed to a great environment which made me love working in the lab. I hope you will all achieve your biggest dreams. I wish you all the best for the future!

Papa, Maman, Jean-Benoît, et toute la famille, merci d'avoir toujours cru en moi, supporté, et permis d'être ici. J'espère vous rendre fiers. Je vous aime.

Alexane, my beautiful wife. Honey, I owe you everything. You are my everyday joy. Thank you for always being there for me every day. Thank you for being the most supportive. I would certainly not have been able to achieve even 1% of this without you. Together, I'm sure we will achieve our wildest dreams. I'm incredibly proud of you and fortunate to be standing by your side. I could write a new chapter to tell you how much I love you, how incredibly proud I am of the woman and mum you are. I love you more than anything. Always.

Lily, my princess. You are our most precious gift. I could not have dreamed of a better daughter. Every day is a joy to see you grow up. I am incredibly proud of you and so lucky to have you. Always keep smiling and never stop dreaming. Je t'aime.