

DISS. ETH NO. 15522

# **ORIENTING CELL GROWTH IN YEAST**

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

presented by

**PHILIPPE XAVIER WIGET**  
Dipl. Biol. II, Universität Basel  
born 03.10.1972  
citizen of Schwyz

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Matthias Peter, examiner  
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner  
Prof. Dr. Hubert Hilbi, co-examiner

2004

## Summary

Cell polarity is a phenomenon present in nearly any aspect of cellular and developmental biology and central to processes such as polarized growth and cell fate determination. It is usually achieved through the orientation of the cytoskeleton towards an internal landmark or an external signal. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* initiates polar cell growth in response to both, internal and external signals. During vegetative growth, yeast initiates actin polarization and thereby the formation of a new daughter cell at a site defined by the previously formed daughter. In contrast, during the sexual cycle (mating), external pheromones from partner cells provide the positional information for cell growth. Central to the polarization of the actin cytoskeleton is the local activation of the small GTPase Cdc42p by its guanine nucleotide exchange factor (GEF) Cdc24p.

In order to study local recruitment of Cdc24p in response to internal and external cues, we established a time-lapse microscopy system. Using this method, we showed that the GTPase Bud1p and its regulators Bud2p and Bud5p are required for site directed recruitment of Cdc24p during vegetative growth. Furthermore, we investigate the role of two other proteins involved in the regulation of Cdc42p. By means of time-lapse studies, we could demonstrate that the scaffold protein Bem1p is required for stable maintenance of Cdc24p at the periphery of growing daughter cells. The GTPase activating protein Bem3p on the other hand also localized to sites of polarized growth, but its dynamic behaviour is clearly distinct from Bem1p and Cdc24p.

Far1p is required for orienting cell growth towards the mating partner by linking pheromone receptor activated G $\beta\gamma$  to Cdc24p. We investigated the role of Far1p in the regulation of Cdc24p *in vivo*. Using time lapse microscopy of mating cells and artificial membrane targeting of Far1p we show that Far1p is necessary and sufficient to recruit Cdc24p to the plasma membrane. Wild-type Far1p contains a PH-like domain, which is required for its membrane localization *in vivo*. Interestingly, expression of membrane-targeted Far1p causes toxicity, most likely by activating Cdc42p uniformly at the cell cortex. The ability of full-length Far1p to function as an activator of Cdc24p *in vivo* requires its interaction with Cdc24p and G $\beta\gamma$ . Our results imply that G $\beta\gamma$  not only targets Far1p to the correct site, but may also trigger a conformational change in Far1p that is required for its ability to activate Cdc24p *in vivo*.

## Zusammenfassung

Zellpolarität ist ein zentrales Phänomen das sich in beinahe jeder beliebigen entwicklungs- und zellbiologischen Fragestellung wiederfindet. Eine polare Orientierung einer Zelle wird in den meisten Fällen dadurch erreicht, dass eine vom biologischen System festgelegte, oder durch einen externen Stimulus bewirkte Reorientierung des Aktin Cytoskeletts stattfindet. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kann polares Wachstum sowohl durch ein genetisch bestimmtes Muster, wie auch in Richtung eines Pheromongradienten ausrichten. Während der vegetativen Wachstumsphase ist die Stelle für die Bildung einer neuen Tochterzelle durch den Ort der vorangehend gewachsenen Tochter bestimmt, beim Fortpflanzungszyklus (Paarung) hingegen durch ein von der Partnerzelle sekretiertes Pheromone. In beiden Fällen wird das für die Regulation des Aktin Cytoskelett zentrale GTPase Enzym Cdc42p an der entsprechenden zellperipheren Stelle lokal durch den Guanine nucleotide exchange (GEF) Faktor Cdc24p aktiviert.

Um die lokale Rekrutierung von Cdc24p aufgrund von solch externen und internen Signalen zu studieren, etablierten wir eine mikroskopische Zeitraffer Methode. Dadurch konnten wir belegen, dass die GTPase Bud1p zusammen mit den sie regulierenden Proteinen Bud2p und Bud5p für die korrekte Rekrutierung von Cdc24p während dem vegetativen Zellwachstum verantwortlich ist. Ebenfalls mit diesem Ansatz konnten wir auch zeigen, dass Bem1p für eine stabile Verankerung von Cdc24p an der Zellperipherie notwendig ist, und dass sich der negative Cdc42p Regulator Bem3p mit einem grundsätzlich anderen dynamischen Verhalten an polar wachsenden Stellen aufhält.

Das Far1p Protein ist für die korrekte Ausrichtung von Cdc24p entgegen einem Pheromongradienten notwendig. Mittels Zeitrafferstudien der Zellpaarung, sowie durch künstliches Verankern von Far1p an der Zellmembran war es uns möglich ein besseres Verständnis der einzelnen Etappen bei der Signalübertragung vom Rezeptor-aktivierten G $\beta$  zu Cdc24p mittels Far1p zu erlangen. Far1p enthält eine PH-Proteindomäne, die für seine membranassoziierte Lokalisierung notwendig ist. Interessanterweise war die Expression von Far1p giftig für die Zellen, was vermutlich auf eine entlang der gesamten Zelloberfläche zustande kommende Aktivierung von Cdc42p zurückzuführen ist. Zudem war es notwendig, dass Far1p mit Cdc24p und G $\beta$  interagieren kann, um Cdc24p zu aktivieren. Diese Resultate zeigen, dass Far1p sehr wahrscheinlich Cdc24p nicht nur an die richtige Stelle bringt, sondern es dort auch aktiviert.