

Instytut Chemiczny Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk



**Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów
i regenerację komórek
Saccharomyces cerevisiae:
Analiza aktywności translacyjnej i morfologii.**

Piotr Jerzy Pietras

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych
Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań, 2025

Podziękowania dla:

dr hab. Kamilli Grzywacz za pomoc, wsparcie i gotowość do rozwiązywania pojawiających się problemów,

pracowników Zakładu Transkryptomiki Funkcjonalnej i Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych, za wspólnie spędzone chwile podczas prowadzenia badań,

mojej narzeczonej Natalii za cierpliwość i nieocenione wsparcie pod każdym względem moich rodziców, za wsparcie w trudnych chwilach.

Spis treści

Streszczenie	4
Abstract.....	5
1. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktoranta.....	6
1.1. Udział w realizacji projektów badawczych	6
1.2. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych	6
1.3. Opieka nad stażystami	6
1.4.Udział w działalności upowszechniającej i promującej naukę	6
1.5. Nagrody i wyróżnienia.....	7
2. Lista powiązanych tematycznie publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską.....	8
2.1 Spis innych publikacji, niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	8
3. Opis wyników rozprawy doktorskiej	9
3.1. Cel rozprawy.....	9
3.2. Wstęp	10
3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej	14
3.3.1. Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji.	14
3.3.2. Dynamiczny skład białkowy rybosomów <i>Saccharomyces cerevisiae</i> w odpowiedzi na łagodne, przejściowe warunki stresu abiotycznego odzwierciedla zmiany w aktywności translacyjnej.....	16
3.3.3. Regeneracja <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po ekspozycji na stresy abiotyczne: żywotność, witalność oraz wysokorozdzielcze trójwymiarowe obrazowanie morfologii.....	18
3.4. Podsumowanie	23
3.5. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej	24
3.6. Spis używanych skrótów.....	25
3.7. Bibliografia	26
4. Załączniki publikacyjne oraz oświadczenie doktoranta i współautorów.....	30

Streszczenie

Rybosomy, jako centralne kompleksy translacyjne, przez długi czas były uznawane za struktury o stałym i jednorodnym składzie. Coraz więcej dowodów wskazuje jednak, że ich heterogeniczność może odgrywać kluczową rolę w regulacji translacji. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie mechanizmów przystosowawczych *Saccharomyces cerevisiae* do łagodnych stresów abiotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem heterogeniczności rybosomów (zmian w składzie białkowym rybosomów oraz udziału paralogów białek rybosomalnych w odpowiedzi na stres) oraz morfologii pojedynczych komórek.

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano szeroki wachlarz metod analitycznych, w tym spektrometrię masową o wysokiej rozdzielcości (LC-HRMS) do analizy składu rybosomów, profilowanie polisomowe do oceny aktywności translacyjnej oraz wysokorozdzielcze obrazowanie fazowe (holotomografia) do analizy zmian morfologicznych komórek drożdży pod wpływem stresu.

Wykazano, że ekspozycja *S. cerevisiae* na szok cieplny, stres osmotyczny, wysoką zawartość soli, promieniowanie UV, głód aminokwasowy, głód cukrowy, stres hipoosmotyczny, stres hiperosmotyczny, wysokie pH oraz warunki beztlenowe prowadzi do dynamicznych zmian w stochiometrii białek rybosomalnych tworzących rybosomy oraz różnicowej inkorporacji paralogów białek rybosomalnych do rybosomów. Obserwowane zmiany są specyficzne dla rodzaju stresu, co sugeruje, że różne warianty rybosomów mogą preferencyjnie uczestniczyć w translacji określonych mRNA.

Analiza profili polisomowych wykazała, że większość warunków stresowych prowadzi do globalnego spadku aktywności translacyjnej, z wyjątkiem szoku cieplnego, który zwiększa udział polisomów, co świadczy o zwiększonej aktywności translacyjnej w podwyższonej temperaturze. Dodatkowo, badania holotomograficzne umożliwiły szczegółową analizę zmian morfologicznych komórek drożdży w odpowiedzi na stres, wykazując zmniejszoną zdolność do pączkowania oraz adaptacyjną reorganizację struktury komórkowej. Zaobserwowano zmiany w objętości i kształcie komórek, a także w wielkości i liczbie wakuol oraz zawartości białek i lipidów.

Uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki dostarczają nowych dowodów na istnienie mechanizmów translacyjnej adaptacji do warunków stresowych oraz wskazują, że heterogeniczność rybosomów może odgrywać kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej. Co więcej, zmiany morfologiczne komórek obserwowane w odpowiedzi na stres mogą odzwierciedlać dynamiczne dostosowanie metabolizmu i struktury komórkowej do warunków środowiskowych, zapewniając zwiększoną przeżywalność i zdolność adaptacyjną. Odkrycia te poszerzają naszą wiedzę o plastyczności translacyjnej oraz morfologicznej, a także mogą mieć istotne implikacje w kontekście biotechnologii i biologii systemów.

Abstract

Ribosomes, as central translational complexes, have long been considered static and homogeneous structures. However, growing evidence suggests that their heterogeneity may play a key role in translation regulation. The aim of this doctoral dissertation was to investigate the adaptive mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* in response to mild abiotic stresses, with particular emphasis on ribosome heterogeneity (changes in ribosomal protein composition and differential incorporation of ribosomal protein paralogs into the ribosome under stress conditions) and single-cell morphology.

This study employed a wide range of analytical methods, including high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for ribosomal composition analysis, polysome profiling for assessing translational activity, and high-resolution quantitative phase imaging (holotomography) for examining stress-induced morphological changes in yeast cells.

It was demonstrated that exposure of *S. cerevisiae* to heat shock, osmotic stress, high salt conditions, UV radiation, amino acid starvation, glucose starvation, hypoosmotic stress, hyperosmotic stress, high pH, and anaerobic conditions leads to dynamic changes in the stoichiometry of ribosomal proteins and differential incorporation of ribosomal protein paralogs into the ribosomes. The observed changes were stress-specific, suggesting that different ribosome variants may preferentially participate in the translation of specific mRNAs.

Polysome profiling revealed that most stress conditions resulted in a global decrease in translational activity, with the exception of heat shock, which increased the proportion of polysomes, indicating enhanced translation activity at elevated temperatures. Additionally, holotomographic analysis enabled a detailed examination of morphological changes in yeast cells in response to stress, revealing reduced budding capacity and adaptive reorganization of cellular structure. Changes were observed in cell volume and shape, vacuole size and number, as well as protein and lipid content.

The findings of this doctoral dissertation provide new evidence for the existence of translational adaptation mechanisms in response to stress and suggest that ribosome heterogeneity may play a crucial role in cellular stress responses. Moreover, stress-induced morphological changes may reflect dynamic metabolic and structural adjustments to environmental conditions, enhancing survival and adaptive potential. These discoveries expand our understanding of translational and morphological plasticity and may have significant implications for biotechnology and systems biology.

1. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktoranta

1.1. Udział w realizacji projektów badawczych

- Wykonawca w grancie Narodowego Centrum Nauki UMO-2014/13/D/NZ1/00061 pt. W poszukiwaniu nowych mechanizmów kontroli ekspresji genów odmiennych od RNAi – krótkie RNA powstające ze snoRNA, Sonata, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- Stypendysta – doktorant w grancie Narodowego Centrum Nauki UMO-2017/27/B/NZ1/01416 pt. Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na stres środowiskowy, Opus, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- Praca magisterska – wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt pod kierownictwem prof. dr hab. Doroty M. Cieślak
- Praca inżynierska – wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt pod kierownictwem dr. inż. Piotra Pawlaka

1.2. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych

- 25th Annual Meeting of the RNA Society, Maj 26-31 2020 r.
- International Conference of the Centenary of Natural Sciences Club of Adam Mickiewicz University, Listopad 19-20, 2021 r.
- 1st Polish Yeast Conference, Rzeszów, Czerwiec 24-26, 2022 r.

1.3. Opieka nad stażystami

- Antoni Mrozek, I Liceum Ogólnokształcące z Oddziałami Dwujęzycznymi Fundacji EKOS w Swarzędzu, Praktyka w ramach stażu „Staż dla przyszłego Noblisty” w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w 2022 r.
- Maria Szydłowska, I Liceum Ogólnokształcące z Oddziałami Dwujęzycznymi Fundacji EKOS w Swarzędzu, Praktyka w ramach stażu „Staż dla przyszłego Noblisty” w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w 2020 r.

1.4.Udział w działalności upowszechniającej i promującej naukę

- Noc Biologów, 11 stycznia 2019 r., Poznań – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Biochemika”.

- Bal Karnawałowo Mikołajkowy ICHB PAN, 5 stycznia 2019 r., Poznań – pokazy eksperymentów dla dzieci pracowników Instytutu.
- Poznański Festiwal Nauki i Sztuki, 11 kwietnia 2019 r., Poznań – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Biochemika”.
- Dzień Dziecka Stowarzyszenia na Rzecz Dzieci Niepełnosprawnych, 2 czerwca 2019 r., Kiszkowo – pokazy dla dzieci w różnym wieku pt. „Bioeksperymenty”.
- Rodzinny Piknik Polskiej Akademii Nauk „Nauka też Sztuka!”, 8 czerwca 2019 r., Olsztyn – pokazy dla dzieci w różnym wieku pt. „Bioeksperymenty”.
- Noc Naukowców, 27 września 2019 r. – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Chemika”.
- „Żywa lekcja biologii” dla uczniów klas maturalnych I Liceum Ogólnokształcącego w Gnieźnie, 26 stycznia 2023 r., Poznań – ćwiczenia laboratoryjne

1.5. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda za najlepszy poster podczas konferencji 1st Polish Yeast Conference, Rzeszów, 24.06.2022 r., Komitet Naukowy Konferencji, przewodniczący: prof. dr hab. Andriy Sibirny
- Dyplom uznania Dyrektora ICHB PAN za działalność charytatywną dla członków Zakładu Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemiczno-Bioorganicznej PAN w Poznaniu, grudzień 2019 r.

2. Lista powiązanych tematycznie publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską

- Pietras PJ, Kamińska K, Pęcherz S, Sobkowiak J, Grzywacz K
Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji
Postępy Biochemii, 2022, 68(4):425-433
punkty MEiN= 70
- Pietras PJ, Wasilewska-Burczyk A, Pepłowska K, Marczak Ł, Tyczewska A, Grzywacz K
Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity
International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 268(Pt2):132004
IF (5-letni) = 7,7
punkty MEiN = 100
- Pietras PJ, Chaszczewska-Markowska M, Ghete D, Tyczewska A, Bąkowska-Żywicka K
Saccharomyces cerevisiae recovery from various mild abiotic stresses: viability, fitness, and high resolution three-dimensional morphology imaging
Fungal Genetics and Biology, 2025, przyjęty do druku
IF (5-letni) = 3,0
punkty MEiN = 100

2.1 Spis innych publikacji, niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej

- Mleczko AM, Machtel P, Walkowiak M, Wasilewska A, Pietras PJ, Bąkowska-Żywicka K
Levels of sdRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression.
Scientific Reports, 2019, 9(1):18397
IF (5-letni) = 4,3
punkty MEiN = 140

3. Opis wyników rozprawy doktorskiej

3.1. Cel rozprawy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest analiza mechanizmów adaptacyjnych *Saccharomyces cerevisiae*, powstających w odpowiedzi na łagodne, przejściowe stresy abiotyczne, ze szczególnym uwzględnieniem heterogeniczności rybosomów oraz zmian w morfologii pojedynczych komórek. Badania koncentrują się na:

- analizie zróżnicowania składu białkowego rybosomów w odpowiedzi na stres środowiskowy – określenie, w jaki sposób warunki stresowe wpływają na stechiometrię białek rybosomalnych w rybosomie oraz różnicową inkorporację paralogów białek rybosomalnych do rybosomu,
- analizie wpływu stresu na aktywność translacyjną drożdży – analiza profili polisomowych w celu oceny zmian w efektywności translacji w różnych warunkach stresowych,
- analizie zmian morfologii komórek w odpowiedzi na stres – zastosowanie wysokorozdzielczeego obrazowania holotomograficznego do oceny wpływu stresu na kształt, objętość i organizację wewnętrzną pojedynczych komórek drożdży.

Uzyskane wyniki pozwolą na lepsze zrozumienie translacyjnej i strukturalnej plastyczności komórek oraz dostarczą nowych danych na temat potencjalnych mechanizmów przystosowawczych, które mogą mieć istotne znaczenie w kontekście biotechnologii oraz biologii systemów.

3.2. Wstęp

Rozwój i dojrzewanie organizmów są nieustannie kształtowane przez warunki środowiskowe, takie jak dostępność składników odżywcznych, temperatura, ciśnienie osmotyczne, stężenie substancji cytotoksycznych, itd. Mikroorganizmy takie jak jednokomórkowe drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, utrzymują bardzo precyzyjne i dobrze zrównoważone warunki wewnętrzne (tzw. homeostazę) niezbędne do optymalnego wzrostu i funkcjonowania. Drożdże *S. cerevisiae* są organizmami mezofilnymi i najlepiej wzrastają w temperaturze 28-30°C [1]. Komórki drożdży do prawidłowego wzrostu i rozwoju potrzebują obecności wody, od której zależne są przemiany metaboliczne i transport składników odżywcznych, a także stężenie cukrów i soli. Optymalna aktywność wody odpowiada z kolei optymalnemu ciśnieniu osmotycznemu, przy którym szybkość wzrostu i aktywność życiowa drożdży jest największa [2].

Jednocześnie, jako organizmy niemobilne, prowadzące stacjonarny tryb życia, drożdże *S. cerevisiae* nie są w stanie uniknąć narażenia na niekorzystne dla ich rozwoju i wzrostu warunki środowiskowe. *S. cerevisiae* rozwinięły zatem zróżnicowane mechanizmy odpowiedzi na stres na wielu poziomach funkcjonowania: anatomicznym, morfologicznym, komórkowym, biochemicznym i molekularnym. Mechanizmy te stanowią istotną strategię przetrwania, a raczej utrzymania balansu pomiędzy proliferacją a przetrwaniem [3].

Na poziomie molekularnym zachodzą procesy regulacji transkrypcji określonych genów. Causton i wsp. odkryli, że około dwie trzecie genomu *S. cerevisiae* bierze udział w odpowiedzi na zmiany środowiskowe [4]. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, Hsp), które pełnią funkcje ochronne i opiekuńcze w stosunku do innych białek, zapobiegając ich denaturacji lub agregacji [5]. Pod wpływem stresu osmotycznego drożdże aktywują szlak sygnalizacyjny kinaz MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), znany jako kaskada HOG (ang. *High Osmolarity Glycerol*). Aktywacja tego szlaku prowadzi do zmian w ekspresji genów odpowiedzi na stres i pomaga komórkom przystosować się do zmienionych warunków środowiskowych [6]. W stresie następuje również gromadzenie się reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS [7]) i zakłócenie metabolizmu energetycznego. Natomiast w odpowiedzi na stres oksydacyjny drożdże angażują sieć kinaz YAP (ang. *Yeast AP-1-like Proteins*), które są kluczowe w regulacji szlaku detoksylacji nadtlenku wodoru i aktywacji transkrypcji przeciwyutleniaczy komórkowych [8]. Glukoza jest preferowanym źródłem węgla dla drożdży, a stres spowodowany nagłym spadkiem jej zawartości w środowisku skutkuje zmianami w ekspresji genów, w tym zahamowaniem aktywności kinaz białkowych PKA zależnych od cAMP [6]. Pierwsza odpowiedź drożdży na głód cukrowy z kolei związana jest ze zmianą fosforylacji czynników transkrypcyjnych Msn2/4p, które kontrolują większość genów odpowiedzi na stres i powodują indukcję ekspresji genów związanych z wykorzystaniem alternatywnego źródła węgla (np. galaktozy czy glicerolu). Natomiast po adaptacji komórek do nowych warunków aktywacji ulega kinaza Snf1p, która hamuje import jądrowy Msn2/4p i ekspresję genów szybkiej odpowiedzi na stres [9-10]. Nie sposób przy okazji przedstawiania mechanizmów odpowiedzi na stres pominąć szlaku TOR (ang. *target of rapamycin*), który w warunkach fizjologicznych utrzymuje czynniki

transkrypcyjne Msn2/4p w cytoplazmie, a pod wpływem bodźca stresowego jest inhibowany przez białko Mtl1p, dzięki czemu czynniki transkrypcyjne Msn2/4p akumulują w jądrze i aktywują ekspresję genów stresowych [11].

Istotne dla odpowiedzi na stres zmiany zachodzą również później niż transkrypcja etapie, tj. na etapie translacji. Rybosomy to wysoce konserwatywne nanomaszyny rybonukleoproteinowe, które tłumaczą informacje zaszyfrowane w genomie, aby stworzyć proteom we wszystkich komórkach. Podczas gdy kompletne struktury krystaliczne mniej złożonych rybosomów prokariotycznych są stale rozwiązywane od 2001 r. [12-15], jedynym organizmem eukariotycznym, dla którego znana jest struktura atomowa rybosomu, są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [16,17]. Rybosomy eukariotyczne różnią się wielkością od 3,3 MDa w drożdżach jednokomórkowych do 4,4 MDa u ludzi [18]. Zarówno u drożdży, jak i u ludzi mała podjednostka 40S składa się z 33 białek rybosomalnych i 18S rRNA (rybosomalnego RNA) [19,20] [8, 9 z grantu]. Duża podjednostka 60S zawiera odpowiednio 46-47 białek w drożdżach i u ludzi, a także trzy odrębne rRNA: 5S, 5,8S i 25S w drożdżach oraz 5S, 5,8S i 28S u ludzi [21]. Główne różnice w rozmiarach rybosomów między eukariotami wynikają przede wszystkim z obecności sekwencji wstawionych (ang. *expansion sequences*) w rRNA, a także utraty lub dodaniu dodatkowych białek rybosomalnych [19,21].

Co ciekawe, pomimo ekstremalnie wysokiej konserwacji funkcji rybosomu, tylko 34 białka rybosomalne są wspólne dla prokariotów i eukariotów [18]. Wysunięto więc hipotezę, że ekspresja białek rybosomalnych różni się w zależności od typu komórek, stadiów rozwojowych lub warunków wzrostu. Dowód na zmienność struktury rybosomów dostarczyły szeroko zakrojone ilościowe badania profilujące ekspresję białek rybosomalnych w 14 tkankach i typach komórek w rozwijających się zarodkach kręgowców, które ujawniły drastyczne różnice w poziomach ekspresji białek rybosomalnych w różnych tkankach [22,23]. Ponadto, wykazano, że w amebach *Dictyostelium discoideum* rybosomy składają się z różnych białek rybosomalnych w dwóch różnych stadiach cyklu życiowego, stadium wegetatywnym i zarodnikowym. Takie wyniki sugerują, że te białka rybosomalne mogą być regulowane rozwojowo [24,25]. Tylko jedno badanie do tej pory miało na celu identyfikację zmian w składzie białkowym rybosomów w *S. cerevisiae*. Badanie zostało przeprowadzone przez grupy Joachima Franka i Andrew J. Linka i miało na celu analizę proteomiki rybosomów podczas przechodzenia z fermentowej glukozy na niefermentową źródło węgla w postaci glicerolu [26]. Ta analiza zidentyfikowała 75 białek rybosomalnych w rybosomach 80S, a kilka z nich występowało w zmienionej ilości w rybosomach izolowanych z drożdży hodowanych w obecności glicerolu w porównaniu z drożdżami hodowanymi na pożywkach optymalnych z glukozą. Były to białka dużej podjednostki rybosomalnej: RPL3/uL3, RPL5/uL5, RPL8/eL8, małej podjednostki rybosomalnej: RPS1/eS1, RPS2/uS2, RPS5/uS5, RPP0/P1 oraz zasocjowane z rybosomami białko RACK1. Wszystkie wymienione wyżej dowody na heterogeniczość rybosomów potwierdzają hipotezę o występowaniu wyspecjalizowanych rybosomów, przyczyniających się do modulacji proteomu jako odpowiedź na stres. Jednak na obecnym etapie zaawansowania światowych badań naukowych wciąż brakuje rozstrzygających dowodów

eksperymentalnych na jej poparcie. Brakuje również dowodów na heterogeniczność rybosomów drożdży w aspekcie białek rybosomalnych jako odpowiedzi na stresy środowiskowe.

Cząsteczkami, które regulują działanie rybosomu poprzez bezpośrednie z nim oddziaływanie podczas stresów środowiskowych są rancRNA (związane z rybosomami niekodujące RNA) [27, 28]. Zostały one zidentyfikowane i scharakteryzowane u wielu organizmów, w tym mezofilnego archeona *Haloferax volcanii* [29], pasożytniczego kinetoplastydu *Trypanosoma brucei* [30] i komórek CHO-K1 ssaków [31]. Ponadto, w drożdżach *S. cerevisiae* trzynaście lat temu zidentyfikowano ponad 200 niekodujących RNA związanych z rybosomami [32]. Co jest niezwykle istotne, w przypadku niemal wszystkich typów transkryptów w drożdżach, w tym mRNA, tRNA, snoRNA (małe jąderkowe RNA) i rRNA, zaobserwowano przetwarzanie do stabilnych, krótszych RNA. Kilkoro przedstawicieli rancRNA w *S. cerevisiae* zostało scharakteryzowanych – opisano precyzyjny mechanizm regulacyjny ich działania, zależny od stresu, na poziomie translacji. Pierwszym opisanym regulatorowym rancRNA w *S. cerevisiae* był 18-nukleotydowy ncRNA pochodzący z mRNA kodującego metylotransferazę tRNA TRM10 [33]. Wykazano, że oddziaływanie tego rancRNA z rybosomem następuje w stresie wysokiego zasolenia i powoduje spowolnienie procesu translacji poprzez zmniejszone powinowactwo tRNA do wiązania do miejsca A w rybosomie i upośledzoną dynamikę strukturalną całego rybosomu [34]. W późniejszych pracach wykorzystujących *S. cerevisiae* grupa prof. Kamilli Grzywacz wykazała, że oddziałujące z rybosomami krótkie RNA powstające z tRNA (ang. *tRNA-derived fragments*, tDR) regulują proces translacji na jego wczesnym, przygotowawczym etapie, tworząc trójskładnikowy kompleks tDR/rybosom/aminoacylaza tRNA [35]. Ponadto pokazano, że asocjacja tDR z rybosomami w *S. cerevisiae* jest ściśle regulowana przez zróżnicowane warunki stresowe [36]. W pracy, której jestem współautorem, lecz nie została włączona do cyklu publikacji składających się niniejszą pracą doktorską wykazano, że do rancRNA w *S. cerevisiae* można zaliczyć również krótkie RNA powstające ze snoRNA (ang. *snoRNA-derived small RNAs*, sdRNA) [37]. Wykazano w niej, że zarówno występowanie w cytoplazmie jak i oddziaływanie sdRNA z rybosomami *S. cerevisiae* jest zależne od stresu i powoduje funkcjonalne konsekwencje w postaci obniżonej aktywności translacyjnej drożdży w stresie.

Przytoczone wyżej przykłady nie wyczerpują wszystkich mechanizmów odpowiedzi *S. cerevisie* na stres, jednak warte zauważenia jest, że pomimo szeroko zakrojonych badań celujących w identyfikację zależnych od stresu zmian transkryptomicznych a także wielu badań biochemicznych maszynery translacyjnej (w tym rybosomów i krótkich RNA z nimi oddziałujących), zmiany fizjologiczne i morfologiczne pojedynczych komórek wystawionych na działanie warunków stresowych zostały opisane jedynie przez kilka grup badawczych. Hipoksja (stan, w którym komórka otrzymuje niewystarczającą ilość tlenu), występująca w hodowlach drożdży o wysokiej gęstości komórek, prowadzi do zaburzenia cytokinez i kariokinez, manifestowanej jako zmiany morfologiczne, takie jak występowanie dużych komórek macierzystych z pojedynczym pączkiem lub wieloma pączkami [38]. Taka morfologia wskazuje na niepełną cytokinezę w fazie M cyklu

mitotycznego *Saccharomyces*. W kontekście metabolicznym, hipoksja ogranicza dostępność kluczowych prekursorów, takich jak N-acetyloglukozamina (GlcNAc), niezbędnych do syntezy chityny, co ma wpływ na formowanie przegrody pomiędzy komórkami matką a córką, prowadząc do niepełnej cytokinezы. Wzrost i morfologia komórek drożdży *S. cerevisiae* są silnie zależne również od temperatury. Wykazano, że średnica pojedynczych komórek w niższych temperaturach wzrasta, osiągając maksymalną wartość przy 5°C [39]. Wraz z obniżeniem temperatury zmienia się również wielkość pączków – w chłodniejszych warunkach są one dużo mniejsze w porównaniu do komórki macierzystej, podczas gdy w wyższych temperaturach mogą osiągać nawet 90% jej rozmiaru. Wykazano, że zależne od temperatury przejście przez punkty kontrolne cyklu komórkowego przyczynia się do zmian w strukturze populacji, co może być związane z gwałtownym wzrostem zapotrzebowania energetycznego komórki w przedziale temperatur powyżej optymalnego (tj. 33–40°C). W badaniu z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych zaobserwowano, że zwiększona temperatura oraz wysokie stężenie sorbitolu i etanolu prowadzą do spadku przeżwalności komórek oraz istotnych zmian w ich powierzchni i strukturze, np. zmiany w chropowatości powierzchni komórek i objętości ściany komórkowej [40]. Również inne dane wskazują, że pod wpływem występujących przejściowo różnorodnych niekorzystnych warunków środowiskowych (np. zmiany osmolarności, pH, dostępności tlenu i temperatury), integralność ściany komórkowej i błony komórkowej, czyli barier oddzielających komórki *S. cerevisiae* od środowiska zewnętrznego, może zostać uszkodzona, co w efekcie prowadzi do zaburzenia jej przepuszczalności. Dla przykładu, stres osmotyczny prowadzi do zmian w osmolarności komórki: w środowisku hipertonicznym komórki gwałtownie kurczą się i tracą nawet 60% pierwotnej objętości [41], a w środowisku hipoosmotycznym dochodzi do pęcznienia komórek z powodu wnikającej do wnętrza wody [42]. Nie tylko wielkość, ale również kształt komórek drożdży (tak jak wszystkich organizmów jednokomórkowych) uzależniony jest od warunków środowiskowych [2], jednak bezpośrednie zależności pomiędzy danym warunkiem stresowym a kształtem pojedynczych komórek *S. cerevisiae* nie zostały dotąd opisane.

3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej

W niniejszej pracy zbadano następujące zagadnienia dotyczące strategii *Saccharomyces cerevisie* wykorzystywanych podczas stresów abiotycznych: (a) heterogeniczność rybosomów pod względem składu białkowego w warunkach stresu, skutkująca zależną od stresu aktywnością translacyjną rybosomów oraz (b) przeżywalność, witalność oraz morfologię i regenerację komórek po przejściowym stresie abiotycznym.

3.3.1. Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji.

Publikacja 1

Pietras PJ, Kamińska K, Pęcherz, S, Sobkowiak J, Grzywacz K

Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji

Postępy Biochemii, 2022, 68(4):425-433

DOI: 10.18388/pb.2021_467

Doniesienia o zmienności składu rybosomów pojawiające się w literaturze sugerujące, że heterogeniczność rybosomu może wpływać na selektywność translacji i funkcjonowanie komórek skłoniły mnie do usystematyzowania wiedzy w tym zakresie w postaci publikacji przeglądowej. W Publikacji 1 przedstawiono opis struktury rybosomu eukariotycznego na przykładzie *S. cerevisiae*, omówiono białka rybosomalne przyczyniające się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych oraz funkcjonalne konsekwencje heterogeniczności rybosomów.

Rybosomy, choć tradycyjnie uważane za struktury o stałym składzie białek rdzeniowych, tworzących jego rusztowanie wewnętrzne okalające katalityczne centrum peptydylotransferazowe, wykazują zmienność tego składu, jak pokazują wyniki licznych badań. Przykładem może być badanie z 2018 roku, w którym naukowcy z Uniwersytetu Stanforda stwierdzili, że w polisomach mysich komórek macierzystych 6 na 15 białek rybosomalnych wykazuje cechy substancjiometryczne, co wskazuje na istnienie rybosomów pozbawionych przynajmniej jednego z białek rdzeniowych.

Zmiany w składzie białek rybosomalnych mogą wpływać na specjalizację rybosomów, co pozwala im różnie regulować translację mRNA w zależności od populacji komórek i fazy rozwoju. Istnieją dowody, że zmiany w składzie rybosomów mogą także prowadzić do zaburzeń rozwojowych, takich jak wady wzroku, tułowia czy mózgu, jak ma to miejsce u *Danio* pręgowanego. Mutacje w białkach rybosomalnych mogą prowadzić do wad rozwojowych, takich jak polidaktylia czy deformacje kręgów u myszy. W badaniach nad nowotworami zauważono, że zmiany w składzie białek rybosomalnych wpływają na tworzenie specyficznych fenotypów nowotworowych, a ich obecność lub brak może regulować proces translacji w komórkach nowotworowych. Ponadto, różne typy komórek

wykazują charakterystyczny wzór ekspresji białek rybosomalnych, co może prowadzić do zmian w regulacji translacji i wpływać na rozwój nowotworów. W kontekście rybosomopatii, mutacje w białkach rybosomalnych mogą prowadzić do poważnych chorób, takich jak niedokrwistość Diamonda-Blackfana, związana z nieprawidłowym różnicowaniem komórek krwiotwórczych. Mutacje w białkach RPS19 i RPL5 mogą prowadzić do defektów komórkowych, zagrażających zdrowiu i rozwojowi organizmu. Zmiany w rybosomach mogą też przyczyniać się do wrodzonych wad, jak w przypadku aspleni (wrodzonym brakiem śledziony) i innych zaburzeń neurozwojowych.

W Publikacji 1 przedstawiono również wpływ istnienia paralogów białek rybosomalnych na heterogeniczność rybosomów. Paralogiczne geny kodujące białka rybosomalne są obecne u wielu eukariontów, w tym u drobnych organizmów, takich jak muszki owocowe, myszy czy żaby szponiaste. Te paralogi wykazują wysokie podobieństwo sekwencji, a ich funkcje mogą się różnić w zależności od tkanki i etapu rozwoju. Przykładem jest *S. cerevisiae*, gdzie początkowo sądzono, że paralogi powstały wskutek podwojenia genomu, ale późniejsze badania sugerują, że mogło dojść do skrzyżowania dwóch bliskich gatunków. Paralogi białek rybosomalnych wykazują często odmienne wzorce ekspresji, co sugeruje ich różne funkcje, np. w regulacji procesów fizjologicznych.

Badania u gryzoni wykazały, że paralogi białka RPL39L odgrywają kluczową rolę w spermatogenezie, a ich delecja prowadzi do spadku proliferacji komórek i problemów z płodnością. Z kolei paralogi RPL3L w mięśniach poprzecznie prążkowanych i w sercu regulują ich wzrost i funkcje, a ich mutacje mogą prowadzić do chorób, takich jak migotanie przedśionków. U *Danio* pręgowanego paralogi białek RPL22L1 i RPL22 różnią się w regulacji tworzenia komórek krwiotwórczych. W *Drosophila* paralogi RPS15 i RPS19 pełnią różne role w rozwoju oocytów. Ponadto, w *S. cerevisiae* zmieniający się stosunek ekspresji paralogów białek rybosomalnych może stanowić mechanizm adaptacji do stresu.

Wszystkie te badania wskazują, że paralogi białek rybosomalnych umożliwiają komórkom przeprowadzanie bardziej precyzyjnej regulacji translacji w odpowiedzi na zmiany fizjologiczne i stresowe, co ma duże znaczenie dla funkcji komórek i organizmów.

3.3.2. Dynamiczny skład białkowy rybosomów *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na łagodne, przejściowe warunki stresu abiotycznego odzwierciedla zmiany w aktywności translacyjnej.

Publikacja 2

Pietras PJ, Wasilewska-Burczyk A, Pepłowska K, Marczak Ł, Tyczewska A, Grzywacz K

Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity

International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 268(Pt2):132004

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132004

Dostępne dane wskazują, że heterogeniczność rybosomów najprawdopodobniej wynika z adaptacyjnego przygotowania programu translacyjnego zestresowanych komórek do regeneracji, ponieważ prawidłowe funkcjonowanie rybosomów jest kluczowe dla optymalnego, nie zaburzonego funkcjonowania całej komórki. Choć koncepcja wyspecjalizowanych rybosomów, które modulują proteom w odpowiedzi na stres jest sugerowana przez wielu badaczy, wciąż brakuje jednoznacznych dowodów eksperymentalnych. Mając na uwadze powyższe, celem badań opisanych w Publikacji 2 było zbadanie heterogeniczności rybosomów *Saccharomyces cerevisiae* pod kątem składu białek rybosomalnych w odpowiedzi na zróżnicowane, łagodne stresy środowiskowe i jej skorelowanie z aktywnością translacyjną komórek podczas stresu.

W badaniach wykorzystano szczep *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, hodowany w pożywce YPD w temperaturze 30°C. Drożdże poddawano jednemu z 10 łagodnych, przejściowych warunków stresowych: szok cieplny, zimna, wysokiego zasolenia, ekspozycja na promieniowanie UV, warunki beztlenowe, wysokie pH, głód aminokwasowy, głód cukrowy, szok hipoosmotyczny i szok hiperosmotyczny. Z drożdży poddawanych stresowi abiotycznemu izolowano rybosomy z wykorzystaniem ultrawirowania, poddawano je denaturacji i sonikacji i izolowano białka. Ilość białek określano przy użyciu testu BCA. Następnie próbki poddawano standardowej procedurze przygotowania do analizy LC-HRMS (chromatografii cieczowej/spektrometrii mas o wysokiej rozdzielcości), obejmującej denaturację, redukcję (rozerwanie wiązań dwusiarczkowych), alkilację (zapobieganie ponownemu tworzeniu się mostków dwusiarczkowych) oraz trawienie enzymatyczne w celu uzyskania peptydów. Otrzymane peptydy rozdzielano za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie C18, stosując gradient acetonitrylu. Rozdzielone peptydy analizowano za pomocą spektrometru mas Orbitrap QExactive w trybie data-dependent MS/MS. Dokładny opis znajduje się w sekcji Materiały i metody w Publikacji 2.

A. Zróżnicowana stechiometria białek rybosomalnych w rybosomach drożdżowych w warunkach stresów środowiskowych.

W celu określenia stechiometrii białek rybosomalnych w rybosomach w drożdżach poddawanych zróżnicowanym warunkom środowiskowym, wyniki spektrometrii mas analizowano przy użyciu oprogramowania Perseus 2.0.11.0. Analiza proteomiczna pozwoliła zidentyfikować 74 odrębne białka rybosomalne w rybosomie *S. cerevisiae*: 31 z małej podjednostki rybosomu (RPS) oraz 43 z dużej podjednostki (RPL) (Rysunek 1 w Publikacji 2). Spośród nich, 22 białka wykazały statystycznie istotne zmiany w ilości w warunkach stresowych (14 białek z małej podjednostki i 8 białek z dużej podjednostki, Rysunek 2 w Publikacji 2) w porównaniu do warunków optymalnego wzrostu. Skład białkowy rybosomów *S. cerevisiae* zmieniał się w odpowiedzi na szok cieplny, stres osmotyczny, wysoką zawartość soli, promieniowanie UV oraz głód aminokwasowy. Spośród badanych warunków stresowych, stres związany z wysokim zasoleniem najsilniej wpływał na skład rybosomu (Tabela 1 w Publikacji 2), prowadząc do zwiększenia poziomu 3 białek rybosomalnych z dużej podjednostki rybosomalnej, przy czym najbardziej widoczne skutki zaobserwowano dla RPL42/eL42

Wyniki te wskazują, że rybosomy nie są jednorodnymi kompleksami, lecz dynamicznymi strukturami, których skład może być dostosowywany do potrzeb komórki. Może to oznaczać istnienie specyficznych podtypów rybosomów o odmiennych właściwościach translacyjnych, co wspiera koncepcję “kodu rybosomalnego” – hipotezy, według której różne warianty rybosomów mogą selektywnie regulować translację określonych grup mRNA.

B. Wpływ warunków stresowych na udział paralogów białek rybosomalnych w tworzeniu rybosomów.

W celu zbadania udziału paralogów białek rybosomalnych w rybosomach *S. cerevisiae* w odpowiedzi na stres, przeanalizowano stosunek ilościowego paralogów A i B (z danych proteomicznych selekcjonowano unikalne peptydy pozwalające na ich rozróżnienie). Spośród 74 identyfikowanych białek rybosomalnych wykryto 21 par paralogów (A i B), a analiza wyników LC-HRMS ujawniła statystycznie istotne zmiany w stosunku ilościowym 7 z tych paralogów w niemal wszystkich warunkach stresowych, z wyjątkiem głodu aminokwasowego, w porównaniu do warunków optymalnych (Rysunek 3 w publikacji 2). Najbardziej widoczną różnicę w porównaniu z grupą kontrolną zaobserwowano w przypadku RPS7/eS7, w którym podczas szoku cieplnego zaobserwowano 33% wzrost stosunku paraguru A do paraguru B w porównaniu do warunków kontrolnych.

Wyniki te wskazują, że komórki *S. cerevisiae* selektywnie regulują skład rybosomów poprzez różnicową inkorporację paralogów białek rybosomalnych do rybosomów, co może mieć kluczowe znaczenie dla dostosowania translacji do warunków środowiskowych.

C. Zmiany w aktywności translacyjnej w warunkach stresowych.

Zaobserwowane zmiany w składzie rybosomów *S. cerevisiae* sugerowały, że mogą one wpływać na aktywność translacyjną. Z tego względu przeprowadzono analizę kinetyki redystrybucji polisomów indukowanej stresem abiotycznym. Do tej części pracy zastosowano drożdże hodowane w 11 zróżnicowanych warunkach (10 warunków stresowych i hodowla kontrolna w warunkach optymalnych), w których translację na etapie elongacji blokowano z pomocą cykloheksimidu, antybiotyku inhibującego translację poprzez wiązanie do rybosomów eukariotycznych. Z drożdży uzyskiwano lizaty, które poddawano profilowaniu polisomowemu, tj. separacji względem wielkości w liniowym gradiencie sacharozy (8–40%) podczas ultrawirowania oraz ciągłe monitorowanie w czasie rzeczywistym absorbancji (A254) przy pomocy detektora UV. Profilowanie polisomowe wskazało, że większość warunków stresowych prowadziła do spadku poziomu polisomów i wzrostu frakcji monosomów, co wskazuje na globalne spowolnienie translacji (Rysunek 4 w Publikacji 2). Efekt ten był szczególnie widoczny po ekspozycji drożdży na promieniowanie UV oraz w warunkach głodu cukrowego, gdzie niemal cała frakcja polisomów została zredukowana na rzecz monosomów. Mniej wyraźny, ale nadal istotny spadek liczby polisomów zaobserwowano w odpowiedzi na szok zimna, wysokie zasolenie, warunki beztlenowe oraz głód aminokwasowy. Jednym warunkiem, w którym odnotowano wzrost aktywności translacyjnej był szok cieplny.

Wyniki te potwierdzono przez oznaczenie aktywności translacyjnej *in vivo* komórek *S. cerevisiae* w zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Badanie polegało na ocenie poziomu inkorporacji znakowanej radioaktywnie ^{35}S -metioniny do nowopowstających białek. W warunkach stresowych promieniowania UV oraz głodu cukrowego odnotowano niemal całkowite zahamowanie translacji w porównaniu do warunków optymalnych (Rysunek 5 w Publikacji 2). Znaczącą inhibicję translacji odnotowano także podczas szoku zimna, wysokiego zasolenia, warunków beztlenowych oraz głodu aminokwasowego. Z kolei szok cieplny prowadził do znacznego wzrostu aktywności translacyjnej.

3.3.3. Regeneracja *Saccharomyces cerevisiae* po ekspozycji na stresy abiotyczne: żywotność, witalność oraz wysokorozdzielcze trójwymiarowe obrazowanie morfologii

Publikacja 3

Pietras PJ, Chaszczewska-Markowska M, Ghete D, Tyczewska A, Grzywacz K
Saccharomyces cerevisiae recovery from various mild abiotic stresses:
viability, fitness, and high resolution three-dimensional morphology imaging
Fungal Genetics and Biology, 2025, przyjęty do druku

Warunki środowiskowe mają ogromny wpływ na wzrost i rozwój organizmów jednokomórkowych, takich jak *Saccharomyces cerevisiae*, które muszą szybko i

odpowiednio reagować na wszelkie zmiany. Drożdże dostosowują się anatomicznie, morfologicznie oraz biochemicznie do niesprzyjających warunków środowiskowych. Niemniej jednak, piśmiennictwo dotyczące zmian fizjologicznych i morfologicznych pojedynczych komórek narażonych na stresowe warunki jest ograniczone do zaledwie kilku doniesień.

Eksperymenty przeprowadzono na szczepie *S. cerevisiae* BY4741, hodowanym w optymalnych warunkach. Drożdże poddawano tym samym dziesięciu łagodnym, przejściowym warunkom stresowym jak w Publikacji 2.

A. Zmiana poziomu ekspresji genów HSP12, GPD1 oraz EXO1 jako reakcja drożdży na stres

W celu weryfikacji poprawnej indukcji stresu w warunkach laboratoryjnych zbadano poziom ekspresji znanych z piśmiennictwa genów reagujących na stres. Wykonywano ilościowe reakcje PCR w systemie Agilent Real-Time PCR. Zgodnie z oczekiwaniami ekspresja genów *HSP12*, *GPD1* oraz *EXO1* ulegała zmianom pod wpływem określonych warunków w porównaniu do warunków kontrolnych, co potwierdziło indukcję odpowiedzi na stres. Najwyższą ekspresję *HSP12* zaobserwowano w warunkach stresu hiperosmotycznego i wysokiego zasolenia, *GPD1* – w warunkach wysokiego zasolenia, a *EXO1* – po ekspozycji na promieniowanie UV, w warunkach beztlenowych oraz przy wysokim pH (Rysunek 2 w Publikacji 3).

B. Łagodny, przejściowy stres abiotyczny wpływa na kinetykę wzrostu drożdży

Aby sprawdzić jak różne warunki stresowe wpływają na zdolności regeneracyjne drożdzy, przeprowadzono badanie kinetyki wzrostu. Po indukcji stresu, drożdże przeniesiono do świeżego medium o optymalnym składzie i hodowano je w optymalnych warunkach wzrostu, co umożliwiało obserwację procesu regeneracji.

Zaobserwowano, że już po 30 minutach od transferu komórek drożdży z warunków stresowych do warunków optymalnych, wartości OD600 stresowanych hodowli zrównały się z tymi obserwowanymi dla drożdży hodowanych w warunkach kontrolnych (Rysunek 4 w Publikacji 3), co wskazuje na bardzo szybki proces regeneracji drożdży po ustaniu stresu. Po 60 minutach, wszystkie kultury (z wyjątkiem tych poddawanych regeneracji po szoku cieplnym) wykazywały wyższą szybkość wzrostu niż hodowla kontrolna (Rysunek 3 w Publikacji 3), co wskazuje na skrócony czas podwojenia generacji (Tabela 1 w Publikacji 3). Faza wykładniczego wzrostu była krótsza we wszystkich kulturach regenerujących się po stresie w stosunku do hodowli w optymalnych warunkach (Rysunek 5 w Publikacji 3).

C. Ekspozycja na promieniowanie UV oraz stres hiperosmotyczny prowadzi do zmniejszenia przeżywalności *S. cerevisiae*

W celu sprawdzenia jak testowane warunki stresowe wpływają na żywotność drożdzy wykorzystano analizy metodą cytometrii przepływowej. Komórki barwiono jodkiem propidyny (PI), który przenika wyłącznie do komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Analizę przeprowadzono na cytometrze FACSCalibur.

Wykazano, że ekspozycja na promieniowanie UV oraz stres hiperosmotyczny znacząco obniża przeżywalność komórek *S. cerevisiae* (Rysunek 6 w Publikacji 3). Z kolei reszta testowanych warunków charakteryzowała się bardzo niskim odsetkiem komórek PI-dodatnich. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone badaniami z wykorzystaniem obrazowania przy użyciu mikroskopu konfokalnego, w których zastosowano podwójne barwienie – barwnikiem Hoechst (wybarwione są komórki żywe, nieprzepuszczalne dla PI z integralną ścianą i błoną komórkową) oraz jodkiem propidyny (wybarwione są komórki martwe) – co uwidocznioło wyraźnie, że w próbkach kontrolnych dominowały komórki żywe, natomiast ekspozycja na szok cieplny (37°C przez 15 minut) prowadziła do niewielkiego, lecz zauważalnego wzrostu liczby komórek martwych. Takie obserwacje potwierdzają, że nawet łagodny stres termiczny wpływa na żywotność drożdży, choć efekt ten jest umiarkowany w porównaniu z bardziej destrukcyjnymi czynnikami, jak UV czy stres hiperosmotyczny.

D. Morfologia pojedynczych komórek *S. cerevisiae* ulega znaczącym zmianom pod wpływem łagodnych stresów abiotycznych

W badaniach morfologii komórek *S. cerevisiae* zastosowano wysokoprzepustową technikę ilościowego obrazowania fazowego z wykorzystaniem mikroskopu holotomograficznego HT-2H. Na podstawie uzyskanych obrazów holotomograficznych 2D oraz indeksu refrakcji skonstruowano tomogramy 3D. Każdy warunek stresowy badano na podstawie co najmniej 60 obrazów, co umożliwiło szczegółową analizę morfologii pojedynczych komórek drożdży.

S. cerevisiae hodowane w optymalnych warunkach miały typowy, elipsoidalny kształt z widocznymi pączkami o różnych rozmiarach, a także tworzyły kolonie zawierające w pełni rozwinięte komórki potomne. Ściana komórkowa była wyraźnie widoczna jako ciągła, nieprzerwana struktura (Rysunek 8 w Publikacji 3). Podczas ekspozycji na wysokie zasolenie, promieniowanie UV oraz w warunkach szoku hipoosmotycznego i hiperosmotycznego komórki zachowały swoją integralność strukturalną (Rysunek 9 w Publikacji 3). Natomiast w przypadku szoku cieplnego i zimnego, wysokiego pH, głodu aminokwasowego i cukrowego oraz warunków beztlenowych zaobserwowano wyraźne uszkodzenia ściany komórkowej lub obecność martwych komórek pozbawionych zawartości cytoplazmatycznej (Rysunek 10 w Publikacji 3). Niektóre warunki stresowe wyraźnie wpłynęły na kształt komórek. W przypadku wysokiego zasolenia oraz stresu hipoosmotycznego komórki przyjmowały kulisty kształt, natomiast podczas głodu cukrowego obserwowano populacje komórek o zróżnicowanej morfologii, obejmującą formy okrągłe, elipsoidalne oraz nieregularne (Rysunek 9 w Publikacji 3). Stresy środowiskowe wpłynęły również na zdolność drożdży do pączkowania. W warunkach

hiperosmotycznych nie zaobserwowano żadnych pączków, podczas gdy w przypadku wysokiego zasolenia oraz szoku hipoosmotycznego komórki tworzyły małe pączki (Rysunek 9 w Publikacji 3). Efektem działania kilku stresów, w tym szoku cieplnego i zimnego, ekspozycji na UV, warunków beztlenowych, wysokiego pH oraz głodu aminokwasowego i cukrowego, była obecność wyraźnie powiększonych wakuoli (Rysunki 9 i 10 w Publikacji 3). Co więcej, w przypadku szoku zimna, promieniowania UV oraz głodu cukrowego część komórek macierzystych zawierała dwie wakuole, natomiast wyłącznie po napromieniowaniu UV zaobserwowano komórki posiadające aż trzy wakuole.

Te zmiany morfologiczne sugerują specyficzne, adaptacyjne odpowiedzi drożdży na stres, obejmujące reorganizację struktury komórkowej i mechanizmy kompensacyjne w celu zwiększenia szans na przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

E. Parametry morfologiczne komórek, w tym objętość, długość i sferyczność, ulegają deregulacji podczas stresu

Komórki poddane działaniu promieniowania UV wykazywały istotnie zwiększoną objętość. Z kolei w warunkach wysokiego pH, głodu aminokwasowego i cukrowego, wzrostu beztlenowego, szoku zimna, wysokiego zasolenia oraz stresu hiperosmotycznego objętość komórek była istotnie mniejsza niż w warunkach optymalnych. Zwiększona objętość komórek po ekspozycji na UV była dodatkowo skorelowana ze znacznym ich wydłużeniem. Podobna zależność dotyczyła stresu hiperosmotycznego, gdzie mniejsza objętość komórek była również związana ze znaczco mniejszą długością w porównaniu do hodowli kontrolnych. Komórki poddane szokowi ciepła, głodowi aminokwasowemu i cukrowemu, szokowi zimna, wysokiemu zasoleniu oraz wysokiemu pH również miały istotnie mniejszą długość w porównaniu do warunków optymalnych, natomiast szok hipoosmotyczny nie miał istotnego wpływu na ten parametr.

Jeśli chodzi o sferyczność komórek, stres hiperosmotyczny powodował jej istotny wzrost. Podobnie, podwyższona sferyczność komórek została zaobserwowana w warunkach wysokiego pH, wzrostu beztlenowego oraz szoku hipoosmotycznego (Rysunek 11 w Publikacji 3). Żaden ze stresów nie spowodował zmniejszenia sferyczności komórek, co sugeruje, że ich kształt pozostaje względnie stabilny w warunkach stresowych, a adaptacja do niekorzystnych czynników środowiskowych wiąże się głównie ze zmianami objętości i długości.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że łagodne stresy abiotyczne prowadzą do złożonych zmian morfologicznych *S. cerevisiae*, wpływając zarówno na wielkość, jak i geometrię komórek. Analiza tych parametrów dostarcza cennych informacji na temat strategii adaptacyjnych drożdży w odpowiedzi na różne warunki środowiskowe.

F. Kurczenie się drożdży w wyniku stresu hiperosmotycznego wiąże się ze zmniejszoną zawartością białek i lipidów

Ponieważ najbardziej wyraźne zmiany morfologiczne zaobserwowano podczas ekspozycji na promieniowanie UV oraz stres hiperosmotyczny, przeprowadzono szczegółową analizę składu molekularnego dwóch głównych składników komórkowych – całkowitej ilości białek oraz lipidów (Rysunek 12 w Publikacji 3). Wyniki wskazują, że stres UV nie miał istotnego wpływu na całkowitą zawartość białek i lipidów. Natomiast stres hiperosmotyczny prowadził do istotnego obniżenia obu.

Zmniejszona zawartość tych składników wskazuje, że stres hiperosmotyczny prowadzi do utraty istotnych elementów strukturalnych i metabolicznych, co jest konsekwencją intensywnego odwodnienia komórek i dostosowania ich metabolizmu do nowych warunków. W szczególności ograniczenie ilości lipidów może być związane z restrukturyzacją błon komórkowych oraz adaptacją ściany komórkowej do zwiększonego ciśnienia osmotycznego. Natomiast spadek zawartości białek sugeruje ograniczenie procesów biosyntezy i translacji, co pozwala na przetrwanie w niekorzystnym środowisku.

G. Liczba kropli lipidowych ulega znacznemu zmniejszeniu w warunkach stresu UV i hiperosmotycznego

Lipidy odgrywają kluczową rolę jako podstawowe składniki błon komórkowych, magazyny energii oraz cząsteczki sygnalizacyjne. W większości eukariotycznych komórek są one przechowywane w postaci kropli lipidowych (ang. *lipid droplets*), które pełnią istotną funkcję w odpowiedzi komórkowej na stres. Biorąc pod uwagę zarówno obserwowane zmiany morfologiczne komórek pod wpływem stresu UV i hiperosmotycznego, jak i spadek całkowitej zawartości lipidów w warunkach hiperosmotycznych, przeprowadzono szczegółową analizę kropli lipidowych.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że parametry związane z kroplami lipidowymi, takie jak ich objętość, masa i długość, różniły się istotnie w zależności od rodzaju stresu. Pod wpływem promieniowania UV objętość oraz masa lipidów w kroplach lipidowych wzrosła 2-krotnie, natomiast w warunkach stresu hiperosmotycznego zmniejszyła się aż 21-krotnie. Długość lipidów w kroplach również uległa zmianie – była niemal 3-krotnie większa po ekspozycji na UV oraz niemal 2-krotnie mniejsza w stresie hiperosmotycznym (Rysunek 13 w Publikacji 3). Liczba kropli lipidowych zmniejszyła się znacząco w obu warunkach stresowych – 4,2-krotnie po ekspozycji na UV oraz 2,7-krotnie po stresie hiperosmotycznym. Dodatkowo, podczas stresu hiperosmotycznego stężenie lipidów w obrębie kropli nie różniło się znacząco od wartości kontrolnych, natomiast w warunkach stresu UV było istotnie wyższe.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że różne rodzaje stresu mają odmienny wpływ na dynamikę metabolizmu lipidowego w *S. cerevisiae*. Stres hiperosmotyczny prowadzi do znaczającej redukcji ilości kropli lipidowych i ich zawartości, co może być związane z kompensacyjnymi zmianami w strukturze błon komórkowych oraz mechanizmami oszczędzania zasobów energetycznych. Natomiast ekspozycja na UV indukuje wzrost objętości kropli lipidowych oraz ich koncentracji, co może stanowić część mechanizmu ochronnego komórki przed uszkodzeniami wywołanymi przez promieniowanie.

3.4. Podsumowanie

Moja rozprawa doktorska składa się z trzech prac: jednej przeglądowej, podsumowującej dostępную wiedzę na temat heterogeniczności rybosomów pod względem białkowym, opublikowanej w 2022 roku w Postępach Biochemii w języku polskim oraz dwóch prac eksperymentalnych.

W pierwszej z prac eksperymentalnych, opublikowanej w International Journal of Biological Macromolecules w 2024 roku postawiliśmy hipotezę, że w warunkach stresowych heterogeniczność rybosomów może zapewnić środki do przygotowania komórek do szybkiej regeneracji. Dlatego celem badania była identyfikacja heterogeniczności białek rybosomalnych w rybosomach w odpowiedzi na dziesięć łagodnych, przejściowych warunków stresowych w *Saccharomyces cerevisiae*, za pomocą LC-HRMS i testów aktywności translacyjnej. Spośród 74 białek rybosomalnych zidentyfikowanych w tym badaniu, 14 z małej podjednostki rybosomalnej i 8 z dużej podjednostki rybosomalnej wykazywały statystycznie istotne różnice w akumulacji w rybosomach pod wpływem stresu. Ponadto zaobserwowano istotne zmiany w stosunkach 7 paralogów białek rybosomalnych. W konsekwencji tej zależnej od stresu heterogeniczności rybosomów drożdży, aktywność translacyjna komórek uległa zmianie po narażeniu na promieniowanie UV, podczas głodu cukrowego, szoku termicznego, wysokiego stężenia soli, warunków beztlenowych i głodu aminokwasowego.

Druga z prac eksperymentalnych opublikowana została w 2025 roku w Fungal Genetics and Biology. Aby zbadać regenerację *S. cerevisiae* po przejściowych, łagodnych warunkach stresowych i opisać żywotność i kondycję komórek, przeprowadzono serię eksperymentów analizy krzywych wzrostu. Wykazano, że czasy regeneracji komórek drożdży poddanych stresom hiperosmotycznym i głodu cukrowego były najkrótsze, podobnie jak czasy podwojenia generacji. Znacznie niższą zdolność proliferacji odnotowano u drożdży po zastosowaniu głodu cukrowego i głodu aminokwasowego oraz stresów o wysokim pH w porównaniu z hodowlą kontrolną. Ponadto czas niezbędny do osiągnięcia fazy stacjonarnej był znacznie krótszy po poddaniu drożdży stresom hipoosmotycznym i cieplnym, a znacznie dłuższy po stresach beztlenowym i UV. W tej publikacji wykonano również bezznacznikowe obrazowanie żywych, pojedynczych komórek drożdży poddanych dziesięciu stresom środowiskowym przy użyciu holotomografii – wiodącej, wysokiej rozdzielczości, ilościowej, trójwymiarowej metody obrazowania fazowego. Dzięki zastosowaniu holotomografii precyzyjnie określono zmiany morfologiczne pojedynczych komórek. Określono zależne od stresu zmiany kształtu, objętości i kulistości komórek drożdży, ich zdolność do tworzenia kolonii, integralność ścian komórkowych oraz zawartość białek i lipidów. Najbardziej widoczne zmiany zaobserwowano w przypadku stresu UV i hiperosmotycznego. Podsumowując, warunki stresowe wpłynęły na komórki drożdży w zróżnicowany sposób, powodując szkodliwe skutki dla ich wzrostu, metabolizmu, kondycji i morfologii.

3.5. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej

- grant Narodowego Centrum Nauki UMO-2014/13/D/NZ1/00061 pt. W poszukiwaniu nowych mechanizmów kontroli ekspresji genów odmiennych od RNAi - krótkie RNA powstające ze snoRNA, Sonata, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- grant Narodowego Centrum Nauki UMO-2017/27/B/NZ1/01416 pt. Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na stres środowiskowy, Opus, kierownik: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
- fundusze statutowe Zakładu Transkryptomiki Funkcjonalnej i Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

3.6. Spis używanych skrótów

rancRNA – związane z rybosomami niekodujące RNA (ang. *ribosome-associated noncoding RNAs*)

snoRNA – małe jąderkowe RNA (ang. *small nucleolar RNAs*)

tDR – fragmenty pochodzące z tRNA (ang. *tRNA-derived fragments*)

sdRNA – krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (ang. *snoRNA-derived small RNA*)

LC-HRMS – chromatografia cieczowa/spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości (ang. *liquid chromatography–high resolution mass spectrometry*)

PI – jodek propidyny

3.7. Bibliografia

- [1] Z. Salvadó, F. N. Arroyo-López, J. M. Guillamón, G. Salazar, A. Querol, and E. Barrio, “Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 7, pp. 2292–2302, Apr. 2011, doi: 10.1128/aem.01861-10.
- [2] S. Bonin, *Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności*. Warszawa: Wydawnictwo SGGW, 2013, pp. 282–301.
- [3] M. Hernández-Elvira and P. Sunnerhagen, “Post-transcriptional regulation during stress,” *FEMS Yeast Research*, vol. 22, no. 1, 2022, doi: 10.1093/femsyr/foac025.
- [4] H. C. Causton et al., “Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 12, no. 2, pp. 323–337, Feb. 2001, doi: 10.1091/mbc.12.2.323.
- [5] C. Desroches Altamirano and S. Alberti, “Surviving the heat: the role of macromolecular assemblies in promoting cellular shutdown,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 50, no. 1, pp. 18–32, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.tibs.2024.09.008.
- [6] A. Piecuch and E. Obłak, “Mechanisms of yeast resistance to environmental stress,” *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, vol. 67, pp. 238–254, Apr. 2013, doi: 10.5604/17322693.1043394.
- [7] X. An, W. Yu, J. Liu, D. Tang, L. Yang, and X. Chen, “Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities,” *Cell Death & Disease*, vol. 15, no. 8, Aug. 2024, doi: 10.1038/s41419-024-06939-5.
- [8] D. Azevedo, L. Nascimento, J. Labarre, M. B. Toledo, and C. Rodrigues-Pousada, “The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain,” *FEBS Letters*, vol. 581, no. 2, pp. 187–195, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.083.
- [9] J.-S. Hahn and D. J. Thiele, “Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* Heat Shock Transcription Factor Under Glucose Starvation Conditions by Snf1 Protein Kinase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 7, pp. 5169–5176, Feb. 2004, doi: 10.1074/jbc.m311005200.
- [10] I. Mayordomo, F. Estruch, and P. Sanz, “Convergence of the Target of Rapamycin and the Snf1 Protein Kinase Pathways in the Regulation of the Subcellular Localization of Msn2, a Transcriptional Activator of STRE (Stress Response Element)-regulated Genes,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 38, pp. 35650–35656, Sep. 2002, doi: 10.1074/jbc.m204198200.
- [11] M. I. Petkova, N. Pujol-Carrión, J. Arroyo, J. García-Cantalejo, and M. Angeles de la Torre-Ruiz, “Mtl1 Is Required to Activate General Stress Response through Tor1 and Ras2 Inhibition under Conditions of Glucose Starvation and Oxidative Stress,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 25, pp. 19521–19531, Jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.m109.085282.
- [12] M. M. Yusupov et al., “Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution,” *Science*, vol. 292, no. 5518, pp. 883–896, May 2001, doi: 10.1126/science.1060089.
- [13] B. S. Schuwirth et al., “Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution,” *Science*, vol. 310, no. 5749, pp. 827–834, Nov. 2005, doi: 10.1126/science.1117230.

- [14] M. Selmer et al., “Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA,” *Science*, vol. 313, no. 5795, pp. 1935–1942, Sep. 2006, doi: 10.1126/science.1131127.
- [15] A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, and H. F. Noller, “Crystal Structure of a 70S Ribosome-tRNA Complex Reveals Functional Interactions and Rearrangements,” *Cell*, vol. 126, no. 6, pp. 1065–1077, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.08.032.
- [16] A. Ben-Shem, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov, “Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome,” *Science*, vol. 330, no. 6008, pp. 1203–1209, Nov. 2010, doi: 10.1126/science.1194294.
- [17] A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov, “The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution,” *Science*, vol. 334, no. 6062, pp. 1524–1529, Dec. 2011, doi: 10.1126/science.1212642.
- [18] S. Melnikov, A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov, “One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 19, no. 6, pp. 560–567, Jun. 2012, doi: 10.1038/nsmb.2313.
- [19] S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, and N. Ban, “Atomic structures of the eukaryotic ribosome,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 37, no. 5, pp. 189–198, May 2012, doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.007.
- [20] J. Rabl, M. Leibundgut, S. F. Ataide, A. Haag, and N. Ban, “Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1,” *Science*, vol. 331, no. 6018, pp. 730–736, Feb. 2011, doi: 10.1126/science.1198308.
- [21] S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, and N. Ban, “Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6,” *Science*, vol. 334, no. 6058, pp. 941–948, Nov. 2011, doi: 10.1126/science.1211204.
- [22] S. Bortoluzzi, F. d’Alessi, C. Romualdi, and G. A. Danieli, “Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues,” *Bioinformatics*, vol. 17, no. 12, pp. 1152–1157, Dec. 2001, doi: 10.1093/bioinformatics/17.12.1152.
- [23] N. Kondrashov et al., “Ribosome-Mediated Specificity in Hox mRNA Translation and Vertebrate Tissue Patterning,” *Cell*, vol. 145, no. 3, pp. 383–397, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.028.
- [24] S. Ramagopal and H. L. Ennis, “Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, no. 5, pp. 3083–3087, May 1981, doi: 10.1073/pnas.78.5.3083.
- [25] S. Ramagopal, “Induction of cell-specific ribosomal proteins in aggregation-competent nonmorphogenetic *Dictyostelium discoideum*,” *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 68, no. 11, pp. 1281–1287, Nov. 1990, doi: 10.1139/o90-190.
- [26] P. Samir et al., “Identification of Changing Ribosome Protein Compositions using Mass Spectrometry,” *PROTEOMICS*, vol. 18, no. 20, Oct. 2018, doi: 10.1002/pmic.201800217.
- [27] A. Pircher, J. Gebetsberger, and N. Polacek, “Ribosome-associated ncRNAs: An emerging class of translation regulators,” *RNA Biology*, vol. 11, no. 11, pp. 1335–1339, Nov. 2014, doi: 10.1080/15476286.2014.996459.

- [28] V. Pecoraro, A. Rosina, and N. Polacek, “Ribosome-Associated ncRNAs (rancRNAs) Adjust Translation and Shape Proteomes,” *Non-Coding RNA*, vol. 8, no. 2, p. 22, Mar. 2022, doi: 10.3390/ncrna8020022.
- [29] J. Gebetsberger, M. Zywicki, A. Künzi, and N. Polacek, “tRNA-Derived Fragments Target the Ribosome and Function as Regulatory Non-Coding RNA in *Haloferax volcanii*,” *Archaea*, vol. 2012, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1155/2012/260909.
- [30] R. Fricker et al., “A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*,” *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41467-018-07949-6.
- [31] Y. Gonskikh et al., “Modulation of mammalian translation by a ribosome-associated tRNA half,” *RNA Biology*, vol. 17, no. 8, pp. 1125–1136, Mar. 2020, doi: 10.1080/15476286.2020.1744296.
- [32] M. Zywicki, K. Bakowska-Zywicka, and N. Polacek, “Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 9, pp. 4013–4024, Jan. 2012, doi: 10.1093/nar/gks020.
- [33] A. Pircher, K. Bakowska-Zywicka, L. Schneider, M. Zywicki, and N. Polacek, “An mRNA-Derived Noncoding RNA Targets and Regulates the Ribosome,” *Molecular Cell*, vol. 54, no. 1, pp. 147–155, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.024.
- [34] J. Reuther et al., “A small ribosome-associated ncRNA globally inhibits translation by restricting ribosome dynamics,” *RNA Biology*, vol. 18, no. 12, pp. 2617–2632, Jun. 2021, doi: 10.1080/15476286.2021.1935573.
- [35] A. M. Mleczko, P. Celichowski, and K. Bąkowska-Żywicka, “Transfer RNA-derived fragments target and regulate ribosome-associated aminoacyl-transfer RNA synthetases,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1861, no. 7, pp. 647–656, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.06.001.
- [36] K. Bąkowska-Żywicka, M. Kasprzyk, and T. Twardowski, “tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis in vitro,” *FEMS Yeast Research*, vol. 16, no. 6, p. fow077, Sep. 2016, doi: 10.1093/femsyr/fow077.
- [37] A. M. Mleczko, P. Machtel, M. Walkowiak, A. Wasilewska, P. J. Pietras, and K. Bąkowska-Żywicka, “Levels of sRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54924-2.
- [38] J. C. Aon, R. C. Tecson, and V. Loladze, “*Saccharomyces cerevisiae* morphological changes and cytokinesis arrest elicited by hypoxia during scale-up for production of therapeutic recombinant proteins,” *Microbial Cell Factories*, vol. 17, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12934-018-1044-2.
- [39] M. Zakhartsev and M. Reuss, “Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature,” *FEMS Yeast Research*, vol. 18, no. 6, Apr. 2018, doi: 10.1093/femsyr/foy052.

- [40] E. Canetta, G. M. Walker, and A. K. Adya, “Correlating Yeast Cell Stress Physiology to Changes in the Cell Surface Morphology: Atomic Force Microscopic Studies,” *The Scientific World JOURNAL*, vol. 6, pp. 777–780, 2006, doi: 10.1100/tsw.2006.166.
- [41] F. M. Klis, A. Boorsma, and P. W. J. De Groot, “Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, vol. 23, no. 3, pp. 185–202, Feb. 2006, doi: 10.1002/yea.1349.
- [42] P. Orlean, “Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall,” *Genetics*, vol. 192, no. 3, pp. 775–818, Nov. 2012, doi: 10.1534/genetics.112.144485.

4. Załączniki publikacyjne oraz oświadczenia doktoranta i współautorów.

Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji

STRESZCZENIE

Funkcjonowanie wszystkich żywych komórek jest zależne od precyzyjnego dostrojenia ekspresji genów i biosyntezy białek. Rybosomy, maszyny molekularne stanowiące centra translacji, były kiedyś uważane za niezmieniąną siłę napędową produkcji białek. Jednak badania z ostatnich lat wskazują, że rybosomy biorą aktywny udział w regulacji procesu translacji, między innymi przez wpływ na kontrolę inicjacji translacji, szybkości elongacji czy selektywności translacji mRNA. Dzieje się tak przez obecność subpopulacji rybosomów, różniących się składem rRNA i białek, ich modyfikacjami oraz stochiometrią białek. W tej publikacji skupiliśmy się na przybliżeniu tematu heterogeniczności rybosomów u eukariontów, wynikającej ze zmian w stochiometrii białek rybosomalnych oraz wykorzystania różnych paralogów białek.

WPROWADZENIE

Rybosomy odkryto w latach 50. XX wieku. Wtedy też zaobserwowano małe różnice w ich wielkości i kształcie i z tego powodu postulowano o ich heterogeniczności. Jednym ze zwolenników tej teorii był Francis Crick, współodkrywca molekularnej struktury DNA. W 1958 roku zaproponował model zwany "hipotezą jeden gen – jeden rybosom – jedno białko". Został on jednak bardzo szybko odrzucony. Przez lata dominował zatem pogląd o niezmiennej, jednolitej populacji rybosomów w organizmie. Dopiero rozwój technik (przede wszystkim wzrost rozdzielczości) wykorzystywanych w badaniu rybosomów, takich jak ilościowa spektrometria mas i kriomikroskopia elektronowa (ang. *cryogenic electron microscopy*, cryo-EM), spowodował ponowne zainteresowanie heterogenicznością tych rybonukleoprotein przeszło dekadę temu [1,2].

Rybosomy występują u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w cytoplazmie, na siateczce śródplazmatycznej, a także wewnątrz organeli. Są odpowiedzialne za biosyntezę białek w procesie translacji. Swoją funkcję spełniają dzięki dwóm podjednostkom rybosomowym (małej i dużej podjednostce), zbudowanym z rybosomalnych białek (ang. *ribosomal protein*, RP) i RNA (rRNA). Rybosomy są w wysokim stopniu niejednorodne, dzięki czemu mogą odgrywać dominującą rolę w regulacji translacyjnej. Wpływają na kontrolę inicjacji translacji, selektywność translacji mRNA, czy kontrolę szybkości elongacji translacji [1,3]. Regulacja translacji mRNA jest szczególnie istotna w procesach rozwojowych, takich jak embriogeneza, neurogeneza, spermatogeneza, a także oogeneza [3]. Utrata heterogeniczności rybosomów i/lub dysfunkcja białka rybosomalnego ma wpływ na proteom komórkowy i może powodować choroby, w tym rybosomopatie bądź nowotwory [4].

STRUKTURA RYBOSOMU

Podczas gdy kompletnie struktury krystaliczne mniej złożonych rybosomów prokariotycznych są stale rozwiązywane począwszy od 2001 roku [5–8], jedynym organizmem eukariotycznym, dla którego znana jest struktura atomowa rybosomu, są jednokomórkowe drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [9,10] (Ryc. 1). Rybosomy eukariotyczne różnią się wielkością od 3,3 MDa w drożdżach jednokomórkowych do 4,4 MDa u ludzi [11]. Zarówno u drożdży, jak i u ludzi mała podjednostka 40S składa się z 33 białek rybosomalnych i jednego rybosomalnego RNA, 18S rRNA [12,13]. Duża podjednostka 60S zawiera odpowiednio 46 RP u drożdży i 47 RP u ludzi, a także trzy różne rRNA: 5S, 5,8S i 25S u drożdży oraz 5S, 5,8S i 28S u ludzi [14]. Główne różnice w wielkości rybosomów między eukariotami wynikają przede wszystkim z obecności sekwencji wstawionych w rRNA oraz utraty lub obecności niektórych białek rybosomalnych [12,14]. Uderzające jest to, że pomimo niezwykle wysokiego zachowania funkcji rybosomów, tylko 34 RP są wspólne dla prokariontów i eukariontów [11].

mgr inż. Piotr Jerzy Pietras¹✉,

lic. Katarzyna Kamińska²,

lic. Sebastian Pęcherz²,

Julia Sobkowiak²,

dr hab. Kamilla Grzywacz¹,
prof. ICHB PAN

¹Instytut Chemiczny Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

²Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

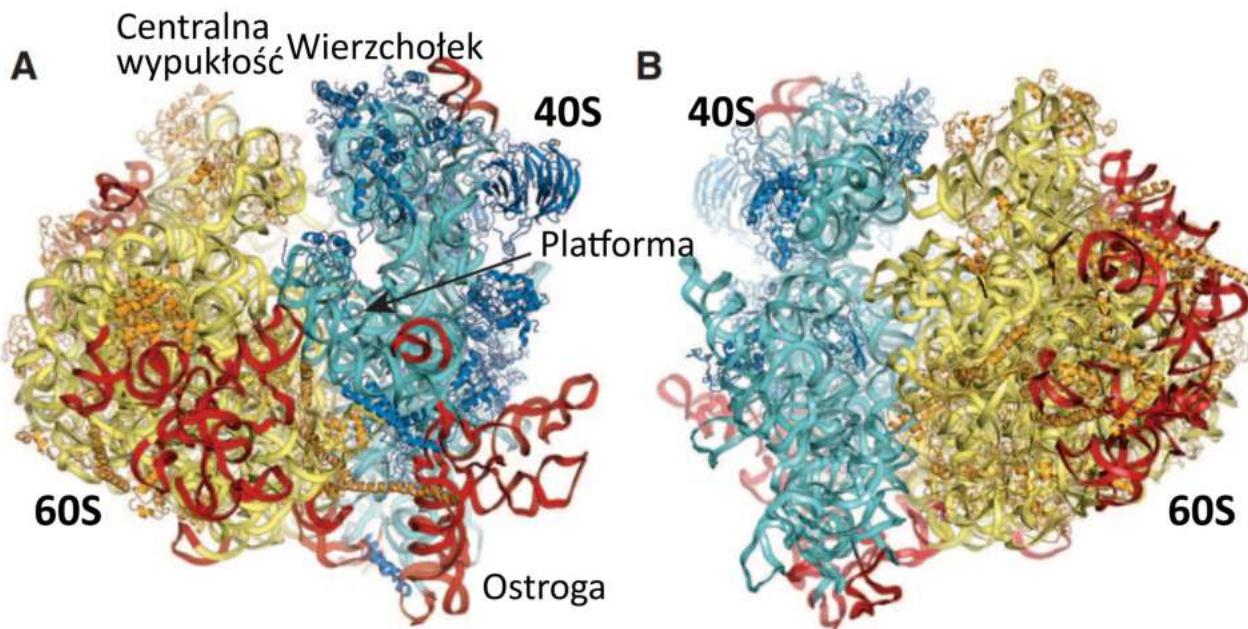
https://doi.org/10.18388/pb.2021_467

✉autor korespondujący: ppietras@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: heterogeniczność rybosomów, białka rybosomalne, paralogi, regulacja translacji

Wykaz skróćów: cryo-EM – kriomikroskopia elektronowa; DBA – Niedokrwistość Diamonda-Blackfana; ESC – embrionalne komórki macierzyste; HOX – geny homeoboksowe; HSC – krwiotwórcze komórki macierzyste; IRES – wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu; RP – białko rybosomalne; RPL – białko dużej podjednostki rybosomu; RPS – białko małej podjednostki rybosomu

Podziękowania: Praca powstała dzięki finansowaniu projektu naukowego „Zmiany w składzie białek rybosomalnych i w oddziałujących z rybosomami krótkich niekodujących RNA w *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na stres środowiskowy” przez Narodowe Centrum Nauki (nr projektu UMO-2017/27/B/NZ1/01416).



Rycina 1. Struktura krystaliczna rybosomu 80S *S. cerevisiae* z zaznaczonymi strukturalnymi punktami orientacyjnymi (na podstawie [9]). (A) Widok od strony miejsca E wiązania tRNA. (B) Widok od strony miejsca A wiązania tRNA. Białka rybosomalne oznaczone są kolorem ciemnoniebieskim (podjednostka 40S) i ciemnożółtym (podjednostka 60S). Rybosomalne RNA oznaczone kolorem jasnoniebieskim (w 40S) i jasnożółtym (w 60S). Sekwencje wstawione w rRNA oznaczone na czerwono. Punkty orientacyjne obejmują: centralną wypukłość w 60S oraz wierzchołek, platformę i ostrogę w 40S.

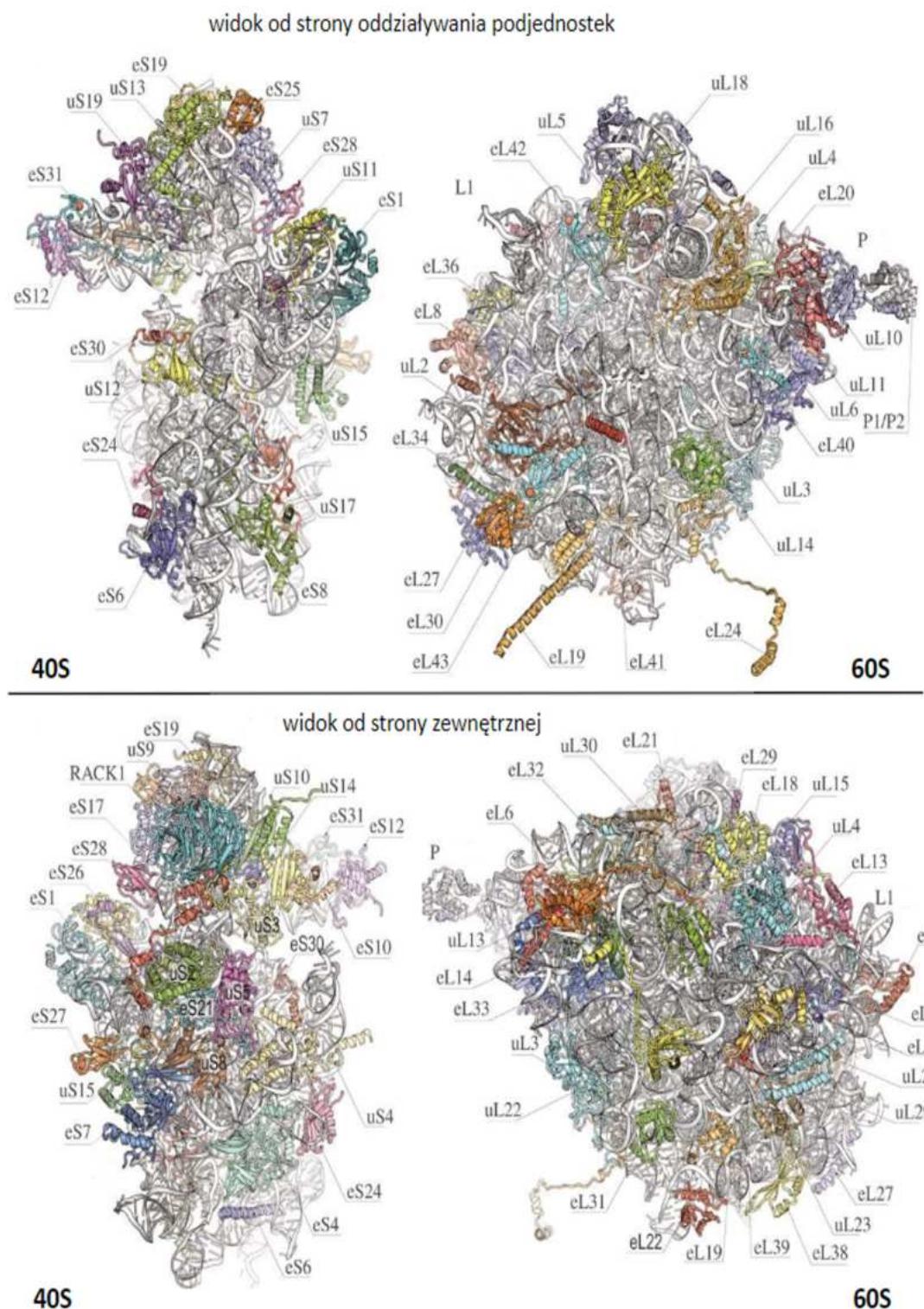
Warto w tym miejscu wspomnieć, że w związku z rozwiązańiem struktur rybosomów przez wiele grup badawczych, z wielu organizmów i niekiedy w jednakowym niemalże czasie, w wielu przypadkach przypisywano identyczne nazwy białkom rybosomalnym z różnych gatunków, które nie są spokrewnione pod względem struktury i funkcji. Stąd, po roku 2010, zaproponowano ujednoliczoną nomenklaturę białek rybosomalnych [15], którą będziemy się posługiwać w niniejszym artykule. Ponieważ białka rybosomalne z *Escherichia coli* zostały jako pierwsze wyizolowane i w pełni zsekwencjonowane oraz są obszernie opisane w literaturze, w obowiązującej nomenklaturze RP, domyślna nazwa dla każdego białka występującego w konserwowanym rdzeniu rybosomu to nazwa bakteryjna. Białka znalezione w rybosomach ze wszystkich trzech domen mają przedrostek „u” (od „uniwersalne”), po którym następują ich nazwy z *E. coli*. Białka bakteryjne bez homologów eukariotycznych (lub z archeonów) oznacza się przedrostkiem „b” (od „bakterie”). Podobnie białka rybosomalne archeonów pozbawione homologów zarówno w rybosomach eukariotycznych, jak i rybosomach prokariotycznych mają być identyfikowane przez przedrostek „a” (od „archeony”). Te eukariotyczne białka rybosomalne, które nie mają homologów u bakterii, oznaczane są przy użyciu przedrostka „e” (od „eukaryony”).

W rybosomie *S. cerevisiae* występuje 79 białek (Ryc. 2), każde w jednej kopii, oprócz słupka białek P (4 kopie) [5,6]. Rybosom 80S drożdży zawiera 46 białek specyficznych dla eukariontów (18 w podjednostce 40S, 28 w podjednostce 60S, Ryc. 2). Piętnaście RP małej podjednostki i 19 RP dużej podjednostki posiada swoje homologи w rybosomie bakteryjnym i są to białka stanowiące rdzeń rybosomu.

STECIOMETRY BIAŁEK RYBOSOMALNYCH

Powszechnie uważa się, że rybosomy mają ustaloną stochiometrię białek rdzeniowych, jednak ostatnie liczne badania sugerują ich zmienny skład. W badaniu z 2018 roku, grupa naukowców z Uniwersytetu Stanforda dokonała pomiaru częstości występowania 15 z 80 rdzeniowych białek rybosomalnych w polisomach pochodzących z mysich embrionalnych komórek macierzystych (ang. *mouse embryonic stem cells*, mESC). Okazało się, że spośród badanych białek aż 6 wykazuje cechy substochiometryczne, a 4 z nich występują wyłącznie na 60–70% mysich polisomów. Wyniki te jednoznacznie wskazują na istnienie rybosomów pozbawionych przynajmniej jednego z białek rdzeniowych [1].

Kolejne opisane doświadczenia dostarczyły informacji na temat międzygatunkowych i wewnętrzgatunkowych różnic w składzie rybosomalnych białek i rRNA. Wśród badanych organizmów znalazły się między innymi myszy, drożdże, muchówki, *Danio* pręgowane, a także ludzkie linie komórkowe [3,16,17]. Obok modyfikacji rRNA, koncepcja heterogeniczności rybosomów, wynikająca również z braku obecności niektórych RP lub ich modyfikacji, stawała się coraz bardziej zasadna. Zmiany w składzie lub budowie białek rybosomalnych nie zawsze skutkują różnicami w funkcjonowaniu całego rybosomu. Jeśli jednak rearanżacje składu RP objawiają się odmiennymi sposobami regulacji translacji mRNA przez różne populacje rybosomów w tych samych komórkach lub na konkretnym etapie rozwoju, mówimy o specjalizacji rybosomów [1,2]. Z tego powodu w ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem obdarzono badania nad rybosomami wyjaśniające wpływ zmian o charakterze stochiometrycznym RP na selektywność wobec określonych grup mRNA, a także na rolę jaką RP spełniają w regulacji translacji. Proces ten może być ustalany po-



Rycina 2. Architektura podjednostek rybosomu z oznaczonymi białkami (na podstawie [9]). Białka rybosomów ze wszystkich trzech domen mają przedrostek „u”. Białka specyficzne dla eukariotów mają przedrostek „e”. Przedstawiono widok od strony oddziaływania podjednostek oraz widok od strony zewnętrznej rybosomu.

przez mechanizmy molekularne związane między innymi z rekrutacją podjednostek rybosomowych do regionów niepodlegających translacji (ang. *untranslated region*, UTR) oraz otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), rozpoznawaniem kodonu stop, czy parowaniem zasad miRNA/lncRNA-mRNA, a także mechanizmami wpływającymi na szybkość poszczególnych faz biosyntezy białek [3,18].

Badania przeprowadzone na drożdżach piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) wykazały, że zawartość RP w rybosomach jest zależna od źródła węgla w pożywkach ho-

dowlanych. Analiza rybosomów drożdży hodowanych na pożywce o niższym stężeniu glukozy ujawniła większą ilość monosomów (obserwowaną jako wyższy pik absorbancji podczas profilowania polisomowego), dlatego spodziewa się, że zmienne warunki dostępności węgla przyczyniają się do różnego składu białkowego rybosomów i odmiennej regulacji translacyjnej [19,20].

Niekorzystnym skutkiem zmian stochiometrycznych w RP może być powstawanie poważnych wad rozwojowych. Przykładem takich aberracji są różnego stopnia zaburzenia oczu, tułowia, a także mózgu u *Danio* pregowanego (*Danio rerio*), wywołane wyłączeniem 19 białek rybosomalnych z rybosomów z 21 testowanych podczas badania. Okazuje się więc, że zmiany w składzie białek rybosomów mogą generować zmienne fenotypy komórkowe [21,22].

Istotnymi badaniami w kontekście możliwych anomalii fizycznych generowanych przez zmiany w białkach rybosomalnych są te przeprowadzone na Myszy domowej (*Mus musculus*). Wykazano, że niedobór białka RPL24/eL24 powoduje hamowanie syntezy białek i proliferacji komórek. Wynikiem takich zmian może być skrócony ogon u badanych organizmów, a także polidaktylia przedosiowa – wada genetyczna, która u człowieka skutkuje obecnością dodatkowego kciuka [21,23]. Z kolei delecja RPL38/eL38 u *M. musculus* powoduje poważne zaburzenia neuronalne, a więc upośledzony wzorzec szkieletowy, skutkujący przekształceniem przodu pierwszego kręgu lędźwiowego w kręg piersiowy. Następstwem tej modyfikacji jest obecność 14, a nie 13 żeber. Brak białka RPL38/eL38 objawia się utratą zdolności do translacji podzbioru mRNA homeoboksyjnych (HOX) – krytycznych regulatorów nadzorujących morfologię osiową szkieletu, przy jednaczesnym braku zmian globalnego procesu translacji. Obecność tego białka jest więc konieczna do przeprowadzenia translacji mRNA HOX. Analiza sekwencji RNA w regionie 5'-UTR HOX ujawniła także specyficzne struktury przypominające wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry site*, IRES). Wspomagają one rekrutację rybosomalną przez RPL38/eL38 [3,24,25]. Istnieją przesłanki, iż przyciąganie specyficznych rybosomów do 5'-UTR wielu komórkowych IRES, na przykład takich znajdujących się w protoonkogenach c-Myc, może zależeć od zawartości w rybosomach białka RPS25/eS25 [3, 26]. To samo białko spełnia funkcje kontrolne inicjacji translacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), infekującego komórki ludzkie [3,27].

Różne typy komórek charakteryzują się specyficznym wzorcem ekspresji białek rybosomalnych. Wnioski te wyciągnięto na podstawie badań sekwencji RP w mysich i ludzkich tkankach, w komórkach krwiotwórczych i ludzkich liniach komórek nowotworowych. Okazało się, że brak lub wzmożona ekspresja wielu białek rybosomalnych powoduje powstawanie specyficznego fenotypu nowotworowego [19,28]. Na przykład, mutacje wiążące się z utraceniem funkcji jednego allelu genu kodującego białko RPS5/uS7, RPS14/uS11 i RPS28/eS28 wpływają hamującą na różnicowanie embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ESC), przy czym nie upośledzają ich samoodnawiania. ESC osiągają także dość wysoki stosunek ilości monosomów do polisomów. Tłumacząco, że taki

stan zwiększa zdolność regulacji translacji przez rybosomy [19,29]. Dowiedziono także, że częste mutacje białek rybosomalnych RPL5/uL18 i RPL10/uL16 związane z utratą pewnych funkcji w procesie nowotworowym, powiązane są ze wz bogaceniem puli monosomów w mRNA, z kolei obecność i zwiększoną ekspresja RP przyczyniających się do powstania nowotworów, takich jak RPL30/eL30, RPS20/uS10 i RPL39/eL39, powoduje wz bogacenie puli polisomów. Oba te mechanizmy sprzyjają wzrostowi komórek rakowych [3,19,30]. Ponadto, wiele polisomów pochodzących z różnych linii komórek nowotworowych wyróżnia się podobnym składem pod względem białek rybosomalnych [31].

Niezwykle ważnym aspektem są także ludzkie zaburzenia neurorozwojowe, rybosomopatie, a więc jednostki chorobowe związane z mutacjami genów kodujących białka rybosomalne oraz białka wspomagające proces powstawania rybosomów. Zakłócenia składu specyficznych populacji rybosomów mogą powodować poważne choroby. Jedną z nich jest niedokrwistość Diamonda-Blackfana (DBA), objawiająca się niewydolnością szpiku kostnego, na skutek zaburzonego różnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych. Uważa się, że za chorobę mogą odpowiadać mutacje występujące w aż 15 białek rybosomalnych, między innymi RPS19/eS19, RPS24/eS24, RPS17/eS17, RPL5/uL18, RPL11/uL5 i RPL35A/eL33 [1, 32, 33]. Podejrzewa się również, że ten rodzaj niedokrwistości może być wywoływaną zmniejszoną zawartością funkcjonalnych rybosomów na skutek mutacji białkowych. To z kolei mogłoby wpływać na szybkość procesu translacji i defekty komórkowe. Rozwój DBA nie wymaga mutacji we wszystkich białkach rybosomalnych. Wykazano, że zmniejszenie ekspresji jednego białka, RPS19/eS19, powoduje opisywaną chorobę, poprzez wpływ na syntezę specyficznych białek [34]. Także inne białka rybosomalne, RPS7/eS7 oraz RPS26/eS26, ulegające mutacjom w niedokrwistości Diamonda-Blackfana, okazują się substochiometryczne. Dzięki temu rybosomy ulegają specjalizacji i powodują wiele wad wrodzonych charakterystycznych dla komórek tego typu zaburzenia [35]. Wśród nich mogą znaleźć się wady kończyn, nieprawidłowości rozwojowe serca, niewydolność wzrostu, a nawet predysponowanie do rozwoju nowotworów. Brak białka RPSA/uS2 skutkuje asplenią – wrodzonym brakiem śledziony lub ustaniem jej funkcji [36], a mutacje w RPL21/eL21 mogą doprowadzić do utraty włosów. Do poważnych objawów klinicznych powiązanych z chorobą DBA należą także małogłówie spowodowane utratą funkcji RPL10/uL16. Kilka rodzajów mutacji tego białka powoduje zaburzenia ze spektrum autyzmu [3,37,38].

Przykłady białek rybosomalnych omawianych w niniejszej pracy, przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych zostały zebrane w tabeli 1.

PARALOGI BIAŁEK RYBOSOMALNYCH

Znaczna część rybosomalnych białek obecnych u niższych, a także wyższych eukariontów takich jak: Żaba szponiasta (*Xenopus laevis*) [39], muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*) [40], *M. musculus* [16] lub nicienie *Caenorhabditis elegans* [41], jest kodowana przez paralogi, odznaczające się

Tabela 1. Przykłady białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych.

Białko	Organizm	Heterogeniczność	Objawy
RPL3/uL3	<i>M. musculus</i>	Paralog	Wzrost mięśni szkieletowych
	<i>H. sapiens</i>	Paralog	Migotanie przedsionków
RPL5/uL18	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPL7/uL30	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Oporności na lek staurosporynę Pączkowanie
RPL10/uL16	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów Niedokrwistość Diamonda-Blackfana Małoglowie Autyzm
	<i>M. musculus</i>	Paralog	Spermatogeneza
RPL12/uL11	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Pączkowanie
RPL22/eL22	<i>D. rerio</i>	Paralog	Rozwój układu krwiotwórczego
	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Odporność na stres oksydacyjny Pączkowanie
RPL24/eL24	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Skręcony ogon Polidaktylia przedosiowa
RPL30/eL30	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
RPL38/eL38	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Upośledzony wzorzec szkieletowy
RPL39/eL39	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
	<i>M. musculus</i>	Paralog	Spermatogeneza
RPS5/uS7	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Rozwój oocytu
RPS7/eS7	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPS14/uS11	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
RPS15A/uS8	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Utrzymanie macierzystych linii germinalnych
RPS18/uS13	<i>S. cerevisiae</i>	Paralog	Pączkowanie
RPS19/eS19	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
	<i>D. melanogaster</i>	Paralog	Utrzymanie macierzystych linii germinalnych Różnicowanie w germarium jajnika
RPS20/uS10	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Wpływ na ilość monosomów/polisomów
RPS25/eS25	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Kontrola inicjacji translacji wirusa HCV
RPS26/eS26	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Niedokrwistość Diamonda-Blackfana
RPS28/eS28	<i>M. musculus</i>	Stechiometria	Hamujący wpływ na różnicowanie
RPSA/uS2	<i>H. sapiens</i>	Stechiometria	Asplenia

wysokim podobieństwem sekwencji. Obecnie zjawisko to jest najlepiej poznane w linii wiodącej *S. cerevisiae*. Początkowo twierdzono, że występowanie paralogicznych genów białek rybosomalnych u drożdży jest wynikiem podwojenia genomu, które miało miejsce we wczesnym etapie ewolucji, a w późniejszym czasie uległo utrwaleniu. Nieco odmienny punkt widzenia przedstawili jednak Marcket-Houben i Gabaldón, którzy w odniesieniu do drożdży zasugerowali, że na pierwszym etapie musiało dojść do skrzyżowania dwóch

blisko spokrewnionych gatunków, a natomiast samo podwojenie genomu wynikało z konieczności przywrócenia płodności [42–44].

Dotychczas prowadzone badania, mające na celu określenie roli poszczególnych paralogów białek rybosomalnych, m. in. w drożdżach, amebach, muchach oraz kregowcach, wykazały, że pary paralogów RP w większości miały odmienne, a często nawet przeciwnie wzorce ekspresji, a co

za tym idzie, cechowały się odmiennymi, specyficznymi funkcjami [45–47]. Ponadto, zgromadzone jak dotąd dane transkryptomiczne oraz proteomiczne potwierdzają specyficzną tkankową i funkcjonalną znacznej części analizowanych paralogów [3]. Nawiązuje do tego „kod rybosomalny”, czyli opracowany model specyficzności paralogu, który zakłada, że różne paralogi rybosomalnych białek są w stanie regulować odmienne procesy fizjologiczne [48]. W związku z tym w komórkach mogą występować różne subpopulacje rybosomów, cechujące się odmiennym składem paragonu RP.

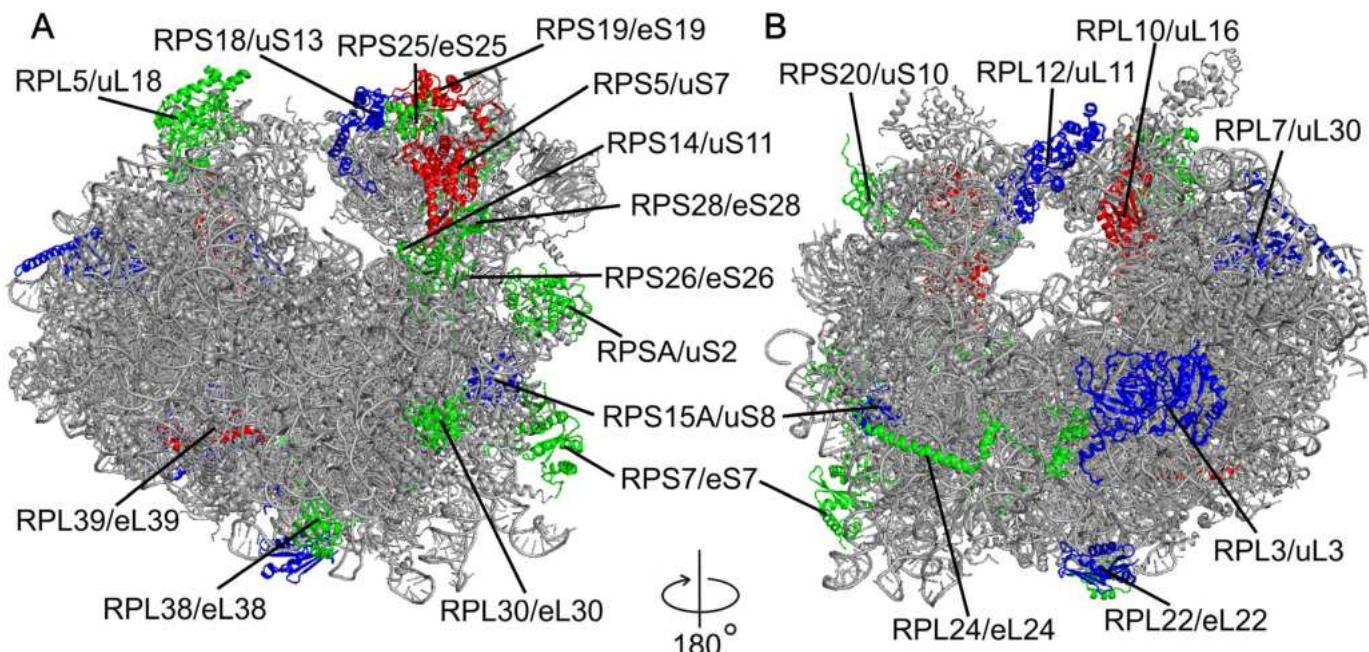
Przykładowo, u gryzoni ekspresję specyfczną dla jąder wykazują RPL10L/uL16L i RPL39L/eL39L, co może świadczyć o potencjalnym mechanizmie specjalizacji rybosomów podczas spermatogenezy [3,49]. Co więcej, wykazano, że paralogi RPL39/eL39 oraz RPL39L/eL39L są konieczne do przebiegu spermatogenezy u myszy. Natomiast w przypadku delekcji RPL39L/eL39L zaobserwowano spadek proliferacji komórek macierzystych spermatogoniów, zniekształcenie wici plemników oraz mitochondriów, co ostatecznie przyczyniło się do zmniejszenia płodności u samców. Przedstawione dane jednoznacznie wskazują, że utrzymanie proteostazy jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy [50].

Z kolei inne badania wykazały specyficzność tkankową paragonu RPL3L/uL3L dla tkanki mięśni poprzecznie prążkowanych, a w szczególności dla mięśni szkieletowych, gdzie RPL3L/uL3L pełni rolę w regulacji ich wzrostu [51]. Co więcej w mięśniu szkieletowym, a także w ludzkim sercu zlokalizowano najwyższy poziom RNA dla paragonu RPL3L/uL3L, którego mutacja została powiązana ze zwiększoną ryzykiem migotania przedśionków [52].

W przypadku badań na zarodkach Danio przeprowadzanego zauważono, że paralogi RPL22/eL22 i RPL22L1/eL22L1 pełnią zasadniczą i ograniczoną tkankowo rolę w trakcie rozwoju układu krwiotwórczego [28]. RPL22L1/eL22L1 promuje ekspresję genu Smad1, a także powstanie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC), przeciwnie do roli RPL22/eL22, który wykazuje działanie hamujące na ekspresję Smad1 i powstanie HSC. W związku z tym krytycznym, odrębnym oraz antagonistycznym udziałem paralogów w tworzeniu się HSC, obserwujemy rozwój limfocytów T pod wpływem działania RPL22L1/eL22L1 oraz zahamowanie jako efekt działania RPL22/eL22 [53].

Badania przesiewowe skoncentrowane na interferencji RNA u *Drosophila* uwiadomiły, że parologiczne białka rybosomalne są niezwykle ważne na różnych etapach rozwoju oocytów. Funkcje paragonów RP obejmują utrzymanie macierzystych linii germinalnych (RPS15Ab/uS8b i RPS19b/eS19b), a także wcześnie różnicowanie w germarium jajnika (RPS19a/eS19a), co sugeruje, że rybosomy przeprowadzają translację różnych pul mRNA. Również pary paragonów RPS5a/uS7a i RPS5b/uS7b zostały precyzyjnie opisane u *D. melanogaster* jako pełniące odmienne funkcje podczas rozwoju oocytów. RPS5a ulega ekspresji w komórkach pęcherzyka otaczającego linię zarodkową, a RPS5b jest obecny w komórkach linii zarodkowej [3].

Wystawienie drożdży *S. cerevisiae* na stres prowadzi do modyfikacji stosunku ekspresji paragonów, poprzez represję ekspresji głównego paragonu, a to z kolei skutkuje zwiększeniem puli rybosomów posiadających drugi paragon [54]. Skład rybosomów, jak i translacja ulega modyfikacji pod-



Rycina 3. Lokalizacja białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych. Przedstawiono strukturę krystaliczną rybosomu 80S *S. cerevisiae* (na podstawie [6]). (A) Widok od strony miejsca E wiązania tRNA. (B) Widok od strony miejsca A wiązania tRNA. Białka rybosomalne powodujące heterogeniczność rybosomów oznaczono kolorem niebieskim (paralogi), zielonym (zmiany stochiometryczne) oraz czerwonym (paralogi i zmiany stochiometryczne). Pozostałe białka rybosomalne oraz rRNA oznaczono kolorem szarym.

wpływem ekspozycji na leki. Duplikacja genów może mieć zastosowanie jako mechanizm adaptacji do czynników stresowych, który poprzez zróżnicowany poziom ekspresji paralogów RP moduluje globalny proteom. Przykładowo, dla pary RPL7A/uL30A i RPL7B/uL30B optymalną biogenezę rybosomów i wzrost komórek zapewnia hipoacetylowany dominujący paralog RPL7A/uL30A, który sprzyja translacji mRNA z krótkimi otwartymi ramkami odczytu. Do uzyskania optymalnej oporności na lek staurosporynę, konieczny jest hiperacetylowany RPL7B/uL30B, który zwiększa translację długich otwartych ramek odczytu [55]. W badaniu poświęconym wrażliwości drożdży na stres oksydacyjny wykryto wzrost ekspresji paralogu RPL22A/eL22A. Dodatkowo, wyniki jednoznacznie potwierdziły, że brak paralogu RPL22A/eL22A przyczyniał się do zwiększonej wrażliwości na nadtlenek wodoru, wskazując na jego znaczącą rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny [56].

Odkryto, że rybosomy zawierające białka RPL7A/uL30A, RPL22A/eL22A, RPL12A/uL11A oraz RPS18B/uS13B regulują translację ASH1, białka odgrywającego kluczową rolę w bezpłciowym rozmnażaniu, pączkowaniu. Regulacyjnych funkcji tych RP nie mogą natomiast spełnić właściwe im paralogi [3,48].

Lokalizację omawianych białek rybosomalnych przyczyniających się do heterogeniczności rybosomów eukariotycznych przedstawiono na rycinie 3.

PODSUMOWANIE

Regulacja translacji poprzez zmiany składu białek rybosomalnych spełnia istotną rolę dla funkcjonowania wielu komórek i tkanek. Dodatkowo, zależnie od rodzaju tkanki oraz warunków, komórki posiadają zdolność zmiany składu rdzeniowych białek rybosomów, modulując w ten sposób wydajność translacji specyficznych mRNA. Aktualnym wyzwaniem dla rozwoju nauki w kontekście heterogeniczności rybosomów wpływającej na ich specjalizację, jest problem z ograniczoną możliwością bezpośredniego wykrywania swoistości interakcji między konkretnymi białkami rybosomalnymi a specyficznymi pulami mRNA. Wyniki badań wskazują podobne efekty regulatorowe różnych zmian struktury dla wielu białek rybosomalnych. Ważnym celem najnowszych badań z pewnością stanie się także próba odkrycia które części białek rybosomalnych są niezbędne do rozpoznawania preferencyjnych mRNA oraz czy wiązanie RP z odpowiednim transkryptem zmienia strukturę całościową rybosomu. Związanie mRNA może bowiem spowodować dodatkową rearanżację białkową, w jeszcze lepszy sposób dostosowującą translację do specyficznych mRNA. Jedna zmiana w składzie białkowym może powodować kolejne w obrębie danego rybosomu. Delekcja RPS25/eS25 powoduje wzrost paralogu RPL22L1/eL22L1 kosztem RPL22/eL22. Podczas gdy większość paralogów RP jest bardzo podobna na poziomie sekwencji, ludzkie RPL22/eL22 i RPL22L1/eL22L1 są dość rozbieżne i w zależności od porównywanych izoform są w 50–70% identyczne [57].

PIŚMIENNICTWO

- Genuth NR, Barna M (2018) The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell* 71:364–374.
- Emmott E, Jovanovic M, Slavov N (2019) Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *Trends Biochem Sci* 44:95–109.
- Norris K, Hopes T, Aspden JL (2021) Ribosome heterogeneity and specialization in development. *WIREs RNA* 12(4), e1644.
- Gerst JE (2018) Pimp My Ribosome: Ribosomal Protein Paralogs Specify Translational Control. *TIG* 34:832–845.
- Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006) Crystal Structure of a 70S Ribosome-tRNA Complex Reveals Functional Interactions and Rearrangements. *Cell* 126:1065–1077.
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JHD (2005) Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* 310:827–834.
- Selmer M, Dunham CM, Murphy FV, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70 S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313:1935–1942.
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JHD, Noller HF (2001) Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* 292:15.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2010) Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* 330:1203–1209.
- Ben-Shem A, de Loubresse NG, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2011) The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* 334:7.
- Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 19:560–567.
- Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N (2012) Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* 37:189–198.
- Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A, Ban N (2011) Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science* 331:8.
- Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N (2011) Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6. *Science* 334:9.
- Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DL, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, McAlear MA, Moore PB, Noller HF, Ortega J, Panse VG, Ramakrishnan V, Spahn CM, Steitz TA, Tchorzewski M, Tollervey D, Warren AJ, Williamson JR, Wilson D, Yonath A, Yusupov M (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 24:165–169.
- Hebras J, Krogh N, Marty V, Nielsen H, Cavaillé J (2020) Developmental changes of rRNA ribose methylations in the mouse. *RNA Biol* 17:150–164.
- Krogh N, Jansson MD, Häfrner SJ, Tehler D, Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Lund AH, Nielsen H (2016) Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 44:7884–7895.
- Tahmasebi S, Amiri M, Sonenberg N (2019) Translational Control in Stem Cells. *Front Genet* 9:709.
- Slavov N, Semrau S, Airolidi E, Budnik B, van Oudenaarden A (2015) Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins. *Cell Rep* 13:865–873.
- Vaidyanathan PP, Zinshteyn B, Thompson MK, Gilbert WV (2014) Protein kinase A regulates gene-specific translational adaptation in differentiating yeast. *RNA* 20:912–922.
- Li D, Wang J (2020) Ribosome heterogeneity in stem cells and development. *J Cell Biol* 219:e202001108.
- Uechi T, Nakajima Y, Nakao A, Torihara H, Chakraborty A, Inoue K, Kenmochi N (2006) Ribosomal Protein Gene Knockdown Causes Developmental Defects in Zebrafish. *PLoS ONE* 1:e37.

23. Oliver ER, Saunders TL, Tarlé SA, Glaser T (2004) Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (*Bst*), a mouse *Minute*. *Development* 131:3907–3920
24. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, Ishiijima J, Shiroishi T, Barna M (2011) Ribosome-Mediated Specificity in Hox mRNA Translation and Vertebrate Tissue Patterning. *Cell* 145:383–397
25. Xue S, Tian S, Fujii K, Kladwang W, Das R, Barna M (2015) RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 517:33–38
26. Hertz MI, Landry DM, Willis AE, Luo G, Thompson SR (2013) Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting. *Mol Cell Biol* 33:1016–1026
27. Landry DM, Hertz MI, Thompson SR (2009) RPS25 is essential for translation initiation by the *Dicistroviridae* and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev* 23:2753–2764
28. Guimaraes JC, Zavolan M (2016) Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biol* 17:236
29. Fortier S, MacRae T, Bilodeau M, Sargeant T, Sauvageau G (2015) Haploinsufficiency screen highlights two distinct groups of ribosomal protein genes essential for embryonic stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:2127–2132
30. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505:495–501
31. Reschke M, Clohessy JG, Seitzer N, Goldstein DP, Breitkopf SB, Schmolze DB, Ala U, Asara JM, Beck AH, Pandolfi PP (2013) Characterization and Analysis of the Composition and Dynamics of the Mammalian Riboproteome. *Cell Rep* 4:1276–1287
32. Boria I, Garelli E, Gazda HT, Aspasia A, Quarello P, Pavesi E, Ferrante D, Meerpohl JJ, Kartal M, Da Costa L, Proust A, Leblanc T, Simansour M, Dahl N, Fröjmark A-S, Pospisilova D, Cmejla R, Beggs AH, Sheen MR, Landowski M, M. Buros C, M. Clinton C, J. Dobson L, Vlachos A, Atsidaftos E, Lipton JM, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I (2010) The ribosomal basis of diamond-blackfan anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* 31:1269–1279
33. Danilova N, Gazda HT (2015) Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* 8:1013–1026
34. Horos R, Ijspeert H, Pospisilova D, Sendtner R, Andrieu-Soler C, Taskesen E, Nieradka A, Cmejla R, Sendtner M, Touw IP, von Lindern M (2012) Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* 119:262–272
35. Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M (2017) Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell* 67:71–83.e7
36. Bolze A, Mahlaoui N, Byun M, Turner B, Trede N, Ellis SR, Abhyankar A, Itan Y, Patin E, Brebner S, Sackstein P, Puel A, Picard C, Abel L, Quintana-Murci L, Faust SN, Williams AP, Baretto R, Duddridge M, Kini U, Pollard AJ, Gaud C, Frange P, Orbach D, Emile J-F, Stephan J-L, Sorense R, Plebani A, Hammarstrom L, Conley ME, Selleri L, Casanova J-L (2013) Ribosomal Protein SA Haploinsufficiency in Humans with Isolated Congenital Asplenia. *Science* 340:976–978
37. Brooks SS, Wall AL, Golzio C, Reid DW, Kondyles A, Willer JR, Botti C, Nicchitta CV, Katsanis N, Davis EE (2014) A Novel Ribosomopathy Caused by Dysfunction of RPL10 Disrupts Neurodevelopment and Causes X-Linked Microcephaly in Humans. *Genetics* 198:723–733
38. Kampen KR, Sulima SO, Verbelen B, Girardi T, Vereecke S, Rinaldi G, Verbeeck J, Op de Beeck J, Uyttebroeck A, Meijerink JPP, Moorman AV, Harrison CJ, Spincemaille P, Cools J, Cassiman D, Fendt S-M, Vermeersch P, De Keersmaecker K (2019) The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* 33:319–332
39. Shigeoka T, Koppers M, Wong HH-W, Lin JQ, Cagnetta R, Dwivedy A, de Freitas Nascimento J, van Tartwijk FW, Ströhl F, Cioni J-M, Schaeffer J, Carrington M, Kaminski CF, Jung H, Harris WA, Holt CE (2019) On-Site Ribosome Remodeling by Locally Synthesized Ribosomal Proteins in Axons. *Cell Rep* 29:3605–3619.e10
40. Magee CM, Ware VC (2019) Specialized eRpL22 parologue-specific ribosomes regulate specific mRNA translation in spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *MBio* 30:2240–2253
41. Cenik ES, Meng X, Tang NH, Hall RN, Arribere JA, Cenik C, Jin Y, Fire A (2019) Maternal Ribosomes Are Sufficient for Tissue Diversification during Embryonic Development in *C. elegans*. *Dev Cell* 48:811–826.e6
42. Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708–713
43. Hu X, Jiang S, Xu F, Zeng C, Wang X, Liu W, Cheng A, Ma C, Gao N, Zhao Y, Dai J, Zhao G (2022) Engineering and functional analysis of yeast with a monotypic 40S ribosome subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 119:e2114445119
44. Wolfe KH (2015) Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol* 13:e1002221
45. Shi Z, Barna M (2015) Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:31–54
46. Dimman JD (2016) Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture. *J Mol Biol* 428:2186–2194
47. Xue S, Barna M (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:355–369
48. Komili S, Farny NG, Roth FP, Silver PA (2007) Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell* 131:557–571
49. Sugihara Y, Honda H, Iida T, Morinaga T, Hino S, Okajima T, Matsuda T, Nadano D (2010) Proteomic Analysis of Rodent Ribosomes Revealed Heterogeneity Including Ribosomal Proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J Proteome Res* 9:1351–1366
50. Zou Q, Yang L, Shi R, Qi Y, Zhang X, Qi H (2021) Proteostasis regulated by testis-specific ribosomal protein RPL39L maintains mouse spermatogenesis. *iScience* 24:103396
51. Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ (2014) Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass: RIBOSOME BIOGENESIS IN SKELETAL MUSCLE. *J Cell Physiol* 229:1584–1594
52. Thorolfsdottir RB, Sveinbjörnsson G, Sulem P, Nielsen JB, Jonsson S, Halldorsson GH, Melsted P, Ivarsdottir EV, Davidsson OB, Kristjansson RP, Thorleifsson G, Helgadottir A, Gretarsdottir S, Nordahl G, Rajamani S, Torfason B, Valgardsson AS, Sverrisson JT, Tragante V, Holmen OL, Asselbergs FW, Roden DM, Darbar D, Pedersen TR, Sabatine MS, Willer CJ, Løchen M-L, Halldorsson BV, Jónsdóttir I, Hveem K, Arnar DO, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, Holm H, Stefansson K (2018) Coding variants in RPL3L and MYZAP increase risk of atrial fibrillation. *Commun Biol* 1:68
53. Zhang Y, Duc A-CE, Rao S, Sun X-L, Bilbee AN, Rhodes M, Li Q, Kappes DJ, Rhodes J, Wiest DL (2013) Control of Hematopoietic Stem Cell Emergence by Antagonistic Functions of Ribosomal Protein Paralogs. *Dev Cell* 24:411–425
54. Ghulam MM, Catala M, Abou Elela S (2020) Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress. *Nucleic Acids Res* 48:1954–1968.
55. Malik Ghulam M, Catala M, Reulet G, Scott MS, Abou Elela S (2022) Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance. *Nat Commun* 13:4938
56. Chan CTY, Pang YLJ, Deng W, Babu IR, Dyavaiah M, Begley TJ, Dedon PC (2012) Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun* 3:937
57. Johnson AG, Flynn RA, Lapointe CP, Ooi YS, Zhao ML, Richards CM, Qiao W, Yamada SB, Couthouis J, Gitler AD, Carette JE, Puglisi JD (2020) A memory of eS25 loss drives resistance phenotypes. *Nucleic Acids Res* 48(13):7279–7297

Ribosome heterogeneity as a new element of translation regulation

Piotr Jerzy Pietras^{1✉}, Katarzyna Kamińska², Sebastian Pęcherz², Julia Sobkowiak², Kamilla Grzywacz¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań

²Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań

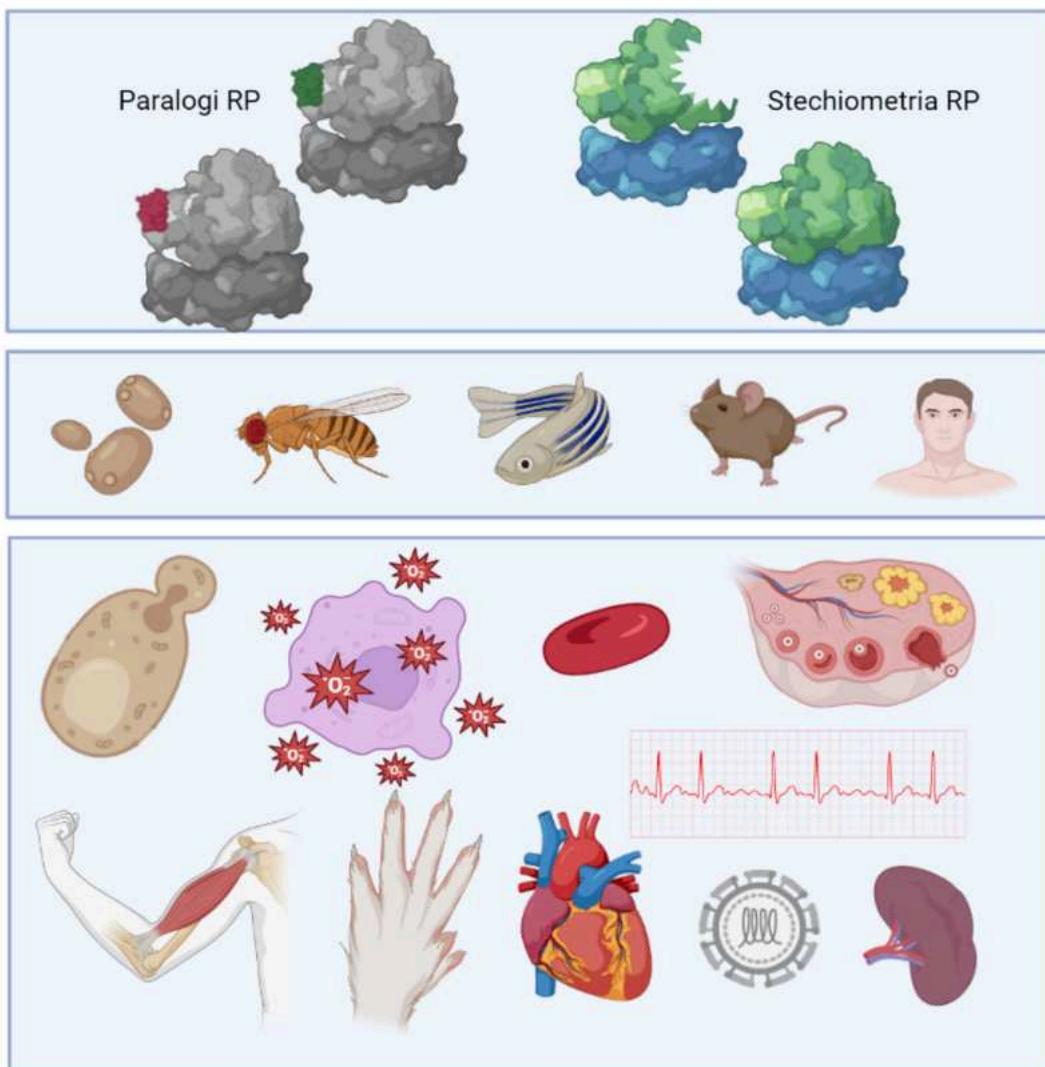
[✉]ppietras@ibch.poznan.pl

Keywords: ribosome heterogeneity, ribosomal proteins, paralogs, regulation of translation

ABSTRACT

All living cells depend on the fine-tuning of gene expression and protein biosynthesis. Ribosomes, the molecular machines at the center of translation, have been previously considered the invariable driving force of protein production. However, recent studies indicated that the ribosomes are actively involved in the regulation of translation, influencing the control of translation initiation, the elongation speed, and the mRNA translation selectivity. This is due to the presence of subpopulations of the ribosomes, which differ in rRNAs and protein composition, their modifications and protein stoichiometry. In this publication, we focused our attention on the ribosomal heterogeneity in eukaryotes, which results from the changes in the stoichiometry of the ribosomal proteins and the existence of protein paralogs.

HETEROGENICZNOŚĆ RYBOSOMÓW



Piotr J. Pietras
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w publikacji pt. „Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji”, opublikowanej w: Postępy Biochemii, 2022, 68(4):425-433, autorstwa: Pietras PJ, Kamińska K, Pęcherz, S, Sobkowiak J, Grzywacz K, która stanowi część mojej pracy doktorskiej, polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, wyselekcjonowaniu publikacji włączonych do analizy, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.

Piotr J. Pietras
Piotr J. Pietras

Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Kamilla Grzywacz

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

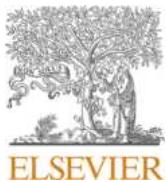
Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Jako autor korespondencyjny w publikacji pt. „Heterogeniczność rybosomów jako nowy element regulacji translacji”, opublikowanej w: Postępy Biochemii, 2022, 68(4):425-433, autorstwa: Pietras PJ, Kamińska K, Pęcherz, S, Sobkowiak J, Grzywacz K, oświadczam, że udział Piotra J. Pietrasa w w/w publikacji polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, wyselekcjonowaniu publikacji włączonych do analizy, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.



Kamilla Grzywacz



Saccharomyces cerevisiae recovery from various mild abiotic stresses: Viability, fitness, and high resolution three-dimensional morphology imaging

Piotr J. Pietras ^a, Monika Chaszczewska-Markowska ^b, Daniel Ghete ^c, Agata Tyczewska ^a, Kamilla Bąkowska-Żywicka ^{a,*}

^a Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznań, Poland

^b Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53-114 Wrocław, Poland

^c Bioscience Technology Facility, Department of Biology, University of York, YO10 5DD York, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Saccharomyces cerevisiae
Stress conditions
Stress recovery
Growth analysis
Holotomography
Label-free live single cell imaging
Single-cell morphology

ABSTRACT

Environmental conditions have a huge impact on the development of all living things but are especially important in the case of single-celled organisms such as *Saccharomyces cerevisiae* that must respond quickly and appropriately to any change. Many molecular mechanisms of response to stress have been identified in yeast, but only a few reports address physiological and morphological changes. To investigate *S. cerevisiae* recovery from ten mild stress conditions and to describe the viability and fitness, we performed a series of growth analysis experiments. Moreover, label-free live cell imaging of yeast subjected to ten environmental stresses has been achieved using holotomography - a leading-edge high resolution 3D quantitative phase imaging. We determined that recovery times of yeast cultures subjected to hyperosmotic and sugar starvation stresses were the shortest, as were the doubling times. Substantially lower proliferation capacity was recorded in yeast after applying sugar- and AA starvation, and high pH stresses, compared to control. Furthermore, the stationary growth was much shorter after subjecting yeast to hypoosmotic and heat stresses, and much longer after anaerobic and UV stresses. Further, we determined changes in shape, colony formation, cell wall damage, volume, sphericity, protein and lipid contents in yeast cells under stress conditions. The most prominent changes were observed for UV and hyperosmotic stresses. Concluding, stress conditions applied to yeast cultures affected them differently, causing detrimental effects to their growth, metabolism, fitness and morphology. Moreover, we have proven that holotomography is excellent for precisely determining morphological changes of single cells.

1. Introduction

The development and maturation of organisms are constantly influenced by environmental or growth conditions, such as the availability of nutrients, temperature, osmotic pressure, concentration of cytotoxic substances, etc. Microorganisms, e.g. *Saccharomyces cerevisiae* maintain very specific and well-balanced internal conditions (so called homeostasis) for optimal growth and functioning. Moreover, these single-celled organisms exposed to many adverse environmental conditions have developed stress responses, which are a key survival strategy. When environmental conditions change rapidly, yeast cells

quickly adjust their internal balance at all levels (anatomical, morphological, cellular, biochemical, and molecular) to that required for growth under the new unfavorable conditions. A variety of molecular mechanisms of the stress response in yeast have already been described, such as the environmental stress response triggered by many different stress factors and numerous mechanisms specific to particular stress factors. However, the physiological and morphological changes of single cells exposed to stress conditions have only been described by a few research groups (Reis et al., 2014; Aon et al., 2018; Zakhartsev and Reuss, 2018; Canetta et al., 2006).

Imaging of budding yeast colonies under an electron microscope

* Corresponding author at: Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Noskowskiego St. 12/14, 61-704 Poznań, Poland.

E-mail addresses: ppietras@ibch.poznan.pl (P.J. Pietras), monika.chaszczewska-markowska@hirschfeld.pl (M. Chaszczewska-Markowska), daniel.ghete@york.ac.uk (D. Ghete), agatat@ibch.poznan.pl (A. Tyczewska), bakowska@ibch.poznan.pl (K. Bąkowska-Żywicka).

began already in the 1950s (Bartholomew and Mittwer, 1953). The existence of two types of scars (birth and bud scars) was further confirmed in the 1970s when vegetative cells of *Saccharomyces uvarum* Beijerinck were examined in the exponential growth phase (Belin, 1972). Since then, various super-resolution microscopic techniques have broken the barrier of diffraction-limited optical resolution, leading to the creation of a *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database (SCMD) providing quantitative data e.g. shapes of the daughter and parental cells of multiple yeast mutants (Saito et al., 2004). SCMD uses an image-processing program that automatically characterizes each yeast cell using several morphological parameters (e.g. cell size, roundness, bud neck position angle, and bud growth direction). Although several studies tackled the point of *S. cerevisiae* colony morphology under stress conditions, it remains unclear how single-cell morphology is altered under environmental stress. Moreover, a comprehensive morphological imaging of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to a wide panel of stress conditions has never been reported so far.

We have therefore analyzed a wide range of external stimuli that yeast may encounter during its growth or industrial use, to describe the viability, fitness and morphological features of single *S. cerevisiae* cells under unfavorable growth conditions. We performed a series of growth analysis experiments to address *S. cerevisiae* recovery from stress. Moreover, we employed cutting-edge 3D quantitative phase imaging, holotomography, that uses optical diffraction tomography (ODT) for high-resolution three-dimensional live cell imaging of yeast cells subjected to environmental stress. This is the first report describing qualitative and quantitative changes in yeast viability, fitness, and morphology under mild temporary abiotic stress.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strain and growth conditions

Saccharomyces cerevisiae wild-type strain BY4741 (MAT α ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0) was used in all assays. The cultures were initiated by inoculating frozen stock cultures onto solid YPD plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 2% agar). Then, single colonies from YPD plates were inoculated onto YPD liquid medium and grown at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm. Cells were grown in 11 different growth conditions. To ensure uniformity across all experiments, one *S. cerevisiae* batch culture was grown to OD₆₀₀ = 0.3, and was then divided into 11 equal parts. Stress conditions were applied for 15 min:

- 1) heat shock (37 °C) was carried out by the addition of an equal volume of YPD pre-warmed to 49 °C, incubated for 15 min at 37 °C, and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 2) cold shock (15 °C) was carried out by the addition of an equal volume of YPD chilled to 4 °C, incubated for 15 min at 15 °C, and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 3) high salt conditions (1 M NaCl) was obtained by addition of 4 M NaCl to a final concentration of 1 M NaCl and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 4) UV exposure (120 J/m² 254-nm UV light) - the cell suspension (9 × 10⁶ cells/ml) was aseptically transferred to a Petri dish, irradiated with a UV dose of 120 J/m², returned to the flask and further grown at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 5) anaerobic conditions were obtained by transferring of the yeast culture to the flask with a capacity of equal to the yeast liquid culture, sealed with a Parafilm and incubating at 30 °C without agitation,
- 6) high pH conditions (pH 7.9) were obtained by supplementation of yeast culture with 0.1 M Tris-HCl pH 8.3 resulting in a final pH of 7.9, and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,

- 7) amino acid starvation - cells were collected by centrifugation at 3000 xg for 10 min and further grown in medium lacking amino acids (Yeast Nitrogen Base without amino acids, nitrogen source: ammonium sulfate 5 g/L) supplemented with 2% glucose at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 8) sugar starvation - cells were collected by centrifugation at 3000 xg for 10 min and further grown in medium lacking dextrose as a carbon source (1% yeast extract, 2% peptone, no glucose) at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 9) hyperosmotic shock (1 M sorbitol) - the culture was supplemented with 6 M sorbitol to reach final concentration of 1 M sorbitol, and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm,
- 10) hypoosmotic shock - cells were grown to OD₆₀₀ = 0.3 in YPD medium supplemented with 1 M sorbitol, and stress was induced by collecting the cells by centrifugation at 3000 xg for 10 min, transfer to YPD medium without sorbitol, and further growth at 30 °C with continuous agitation at 180 rpm.

Control samples were grown parallel at optimal conditions. The experiments were performed at least in triplicate.

2.2. RNA isolation

Total RNA was isolated from *S. cerevisiae* using MasterPure™ Yeast Purification kit (Epicentre), following the manufacturer's protocol. The RNA concentration and quality were assessed using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The RNA size distribution was assessed with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

2.3. Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) assay

The induction of stresses was verified by quantification of the expression levels of HSP12 (heat-shock protein 12), GPD1 (NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase), and EXO1 (5'-3' exonuclease and flap-endonuclease) genes. 5S rRNA gene (RDN5) was used as a reference. Reverse transcription reactions were carried out using a Superscript reverse transcriptase IV (SS RT IV) system (Invitrogen). Sequences of the primers are as follows: HSP12 Fwd 5'-TCTTCCAAGGTGTCACGAC-3'; HSP12 Rev. 5'-TCGTTCAACTTG-GACTTGGC-3' (product size: 126 nt); GPD1 Fwd 5'-GGTTGGAAA-CATGTGGCTCT-3'; GPD1 Rev. 5'-GGCAGGTTCTTCATTGGTA-3' (product size: 180 nt); EXO1 Fwd 5'-TGGTGATGCCATTCCAGTTA-3'; EXO1 Rev. 5'-AACGGAGCCACTATGTACCG-3' (product size: 213 nt); RDN5 Fwd 5'-AGATTGCAGCACCTGAGTTT-3'; RDN5 Rev. 5'-GGTTGCGGCCATATCTACCA-3' (product size: 106 nt). Quantitative PCRs were performed using the Eva green system (Solis Biodyne). Data sets were collected on an Agilent real-time PCR system and analyzed using MaxPro version 3.1 software. The cycling conditions were as follows: 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles consisting of 45 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, 20 s at 72 °C, and 10 min at 4 °C. Fluorescence signal data were collected during the 72 °C phase of each cycle. Melt curves at temperatures from 56 °C to 95 °C (in 0.5 °C increments, measuring fluorescence at each temperature) were collected for all samples following the last cycle and showed the presence of only one product in each reaction. The standard curves were used to derive the copy number of each transcript in each RNA sample, which was determined in triplicate. Data was collected in triplicate from at least three independent experiments.

2.4. Recovery assays and growth kinetics

A sample of cell culture was collected after applying the stress and centrifuged (3000 xg, 10 min). The resulting cell pellet was suspended in YPD liquid medium and grown at 30 °C with constant agitation at 180 rpm for an indicated time of 30 min, 4 h, and 70 h. Growth was monitored by OD measurements (600 nm) every 15 min (for 4 h

recovery assays) or every 3 h (for growth curves of recovered cultures). The doubling time (dt) and specific growth rate (μ) were calculated using nonlinear regression in GraphPad Prism software version 9.0. for growth kinetics of yeast recovered from abiotic stresses in a narrowed time-frame of 30 min, OD_{600} was automatically monitored every 30 s, using VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader.

2.5. Flow cytometry analyses

One milliliter of the *S. cerevisiae* sample (3×10^7 cells) was subjected to quantitatively distinguish live and dead yeast. The cells were washed once with 1 % BSA/PBS (bovine serum albumin/phosphate buffered saline, Thermo Fisher Scientific), and pelleted cells were suspended in the staining medium, containing propidium iodide (PI, which only penetrates membrane-damaged cells) in 3 % BSA/PBS (30 min, 4 °C in the dark). Stained cells were analyzed immediately by flow cytometry to assess particular subpopulations of live (PI-negative) and dead (PI-positive) cells. The intensity of red fluorescence was analyzed with 488 nm excitation by a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and detection was performed with FL2 filter (PI excitation - 535 nm, emission – 617 nm).

2.6. Confocal microscopy analyses

Yeast cells cultured in YPD medium in optimal conditions and at heat shock conditions were harvested by centrifugation at 3000 xg for 10 min. Next, 100 μ l of cells (3×10^6 cells) were centrifuged at 16,200 xg for 5 min, washed twice in PBS, and resuspended in 500 μ l of fresh DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco, USA). Finally, cells were stained and analyzed using a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope. Image processing was controlled using Leica LAS AF 2.7.3 software. Fluorescence intensity and size were analyzed using Leica LAS X 3.3.3 software with 2D or 3D deconvolution modules.

2.7. Single-cell morphology examinations with holotomography

Twenty microliters of the *S. cerevisiae* sample (6×10^5 cells) were added to a TomoDish (Tomocube Inc.) fluidic chamber. Data was acquired by 3D quantitative phase imaging (QPI) using a holotomographic microscope HT-2H (Tomocube Inc), employing Mach-Zehnder interferometry and a digital micromirror device. 2D holographic images were acquired from 48 azimuthally symmetric directions with a polar angle (64.5°) controlled by a digital micromirror device (DMD) and used to construct a 3D tomogram based on refractive index (RI). The diffracted beams from the sample were collected using a high numerical aperture (NA) objective lens (NA = 1.2, UPLSAP 60XW, Olympus), and recorded using a complementary sCMOS image sensor (Blackfly S BFS-U3-28S5M, FLIR Systems Inc.). The measurements were all done based on at least 60 images per stress condition. The most important steps of single-cell yeast morphology examinations with holotomography are presented in Fig. 1.

2.8. Lipid droplet and protein quantification

The segmentation of 3D data acquired with HT-2H microscope was done using a commercially available software LipidAnalysis (Tomocube Inc.) designed to analyze images and extract quantitative information about lipids and proteins of the cells. The segmentation uses Refractive Index (RI) thresholding in combination with size, shape, sphericity and other exclusion parameters that allow for accurate segmentation of individual yeast cells out of the volume in which the cells are imaged in. After the segmentation, from the 3D RI tomograms, the software calculated the dry mass of proteins or lipids inside the segmented yeast cells. The dry mass calculation was done based on an equation that uses Refractive Index Increment (RII) which has a specific value for proteins (0.1900 fL/pg) and lipids (0.1350 fL/pg). Each cell was segmented from the surrounding medium based on a predetermined threshold RI value and dry mass calculations of total protein and total lipid levels were generated. The data was imaged and visualized using commercial software (TomoStudio v 3.3.9, Tomocube Inc., Korea).

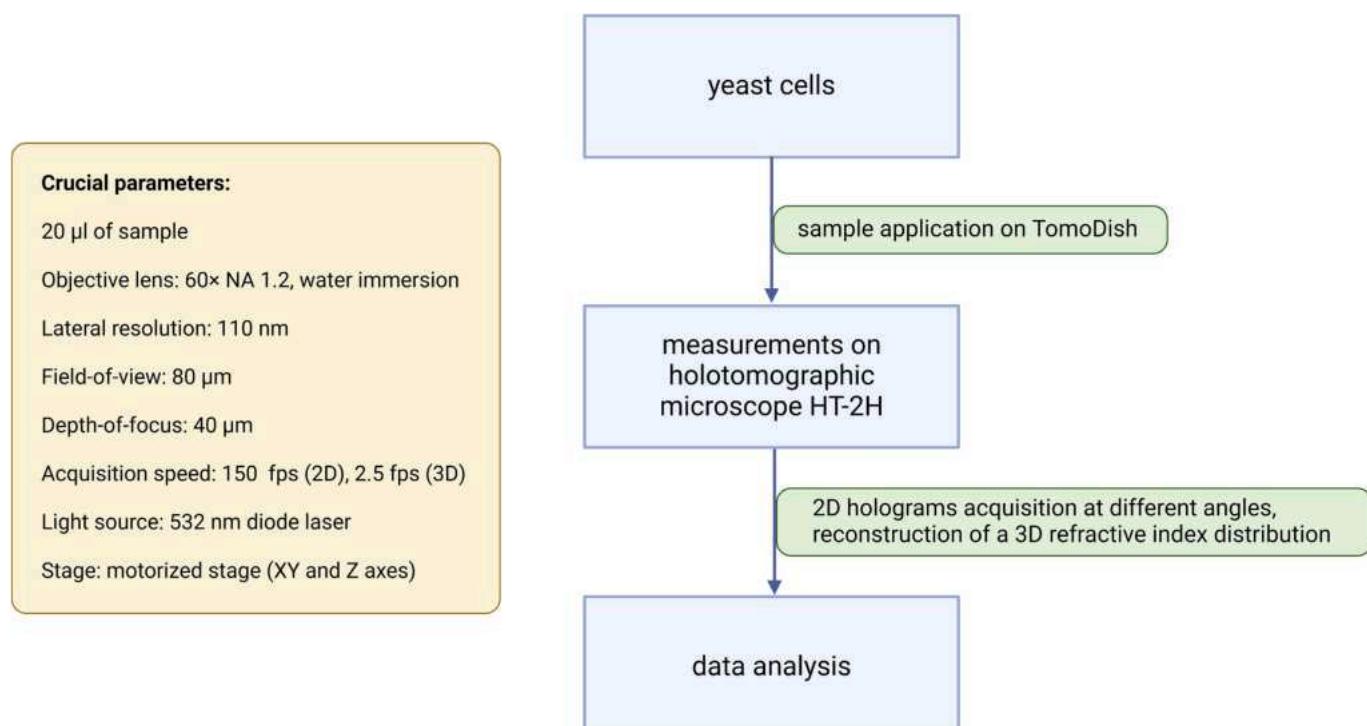


Fig. 1. Schematic representation of single-cell yeast morphology examinations with holotomography with the most important steps and crucial technical parameters.

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism software version 9.0. The normality of the data was examined by the Shapiro-Wilk test, the variables were not normally distributed. Numerical variables were compared by using Kruskal-Wallis test. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. The expression of *HSP12*, *GPD1*, and *EXO1* is deregulated during mild temporary abiotic stress

In the present study we used *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to 11 growth conditions. The duration of stress was based on previous data reported by Causton et al. (2001) who tested 15, 30, 45, 60, and 120 min of stress and reported the exposition to 15-min stress alters the expression of 66 % of *S. cerevisiae* genes. Moreover, in our own studies, after 15-min stress we have observed prominent changes in ribosome-associated small RNAs (Zywicki et al., 2012), differential processing of almost all individual tRNAs (Bąkowska-Żywicka et al., 2016a), as well as the composition of the ribosomes (Pietras et al., 2024). We have controlled the status of the cell stress by analyzing the expression of selected well-known stress-regulated genes. Our quantitative real-time PCR analysis showed that, as expected, the *HSP12* (heat-shock protein 12), *GPD1* (NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase), and *EXO1* (5'-3' exonuclease and flap-endonuclease) gene expression was changed in particular stresses when compared to the optimal growth conditions, confirming the induction of the stress response in yeast cells (Fig. 2). The highest expression of *HSP12* was recorded for hyperosmotic

(50-fold increase), and high salt (50-fold increase), and heat shock (10-fold increase) stresses, of *GPD1* for high salt and hyperosmotic stresses, and of *EXO1* for UV exposure (8-fold increase), anaerobic growth (7-fold increase) and high pH stresses (6-fold increase).

The expression change of 3 stress-regulated yeast genes (*HSP12*, *GPD1*, and *EXO1*) is shown. Expression changes are presented as the expression relative to the optimal growth conditions (fold-change). Significance was designated as ** *p*<0.01, and *** *p*<0.001.

3.2. Mild temporary abiotic stress affects yeast growth kinetics

Growth curves can be used to discriminate between phenotypes of *S. cerevisiae* to determine the time needed for cell recovery from stress. Therefore, we performed batch cultures of *S. cerevisiae* cells growing exponentially at 30 °C, subjected them to eleven different growth conditions for 15 min, and afterwards returned for growth at optimal conditions for another 4 h (see the scheme of the recovery experiment in Fig. 3). At indicated times, aliquots were taken to measure cell concentration (OD_{600}) in order to investigate cell recovery after stress. It appeared that already 30 min after the transfer from stress to optimal conditions, all cells reached the OD_{600} values of non-stressed cells (Fig. 3). Moreover, after 60 min, all cultures (except those recovering from heat shock), manifested higher growth rate than the control cells, which was additionally reflected by shortening of the doubling time (Table 1). The shortest doubling time was recorded for hyperosmotic and sugar starvation stresses, 97, and 98 min, respectively, compared to control – 106 min.

The scheme of the recovery experiment is presented in the top right corner. The growth kinetics is presented as a function of absorbance (A) to time. The absorbance was measured at $\alpha = 600$ nm (OD_{600}) and was

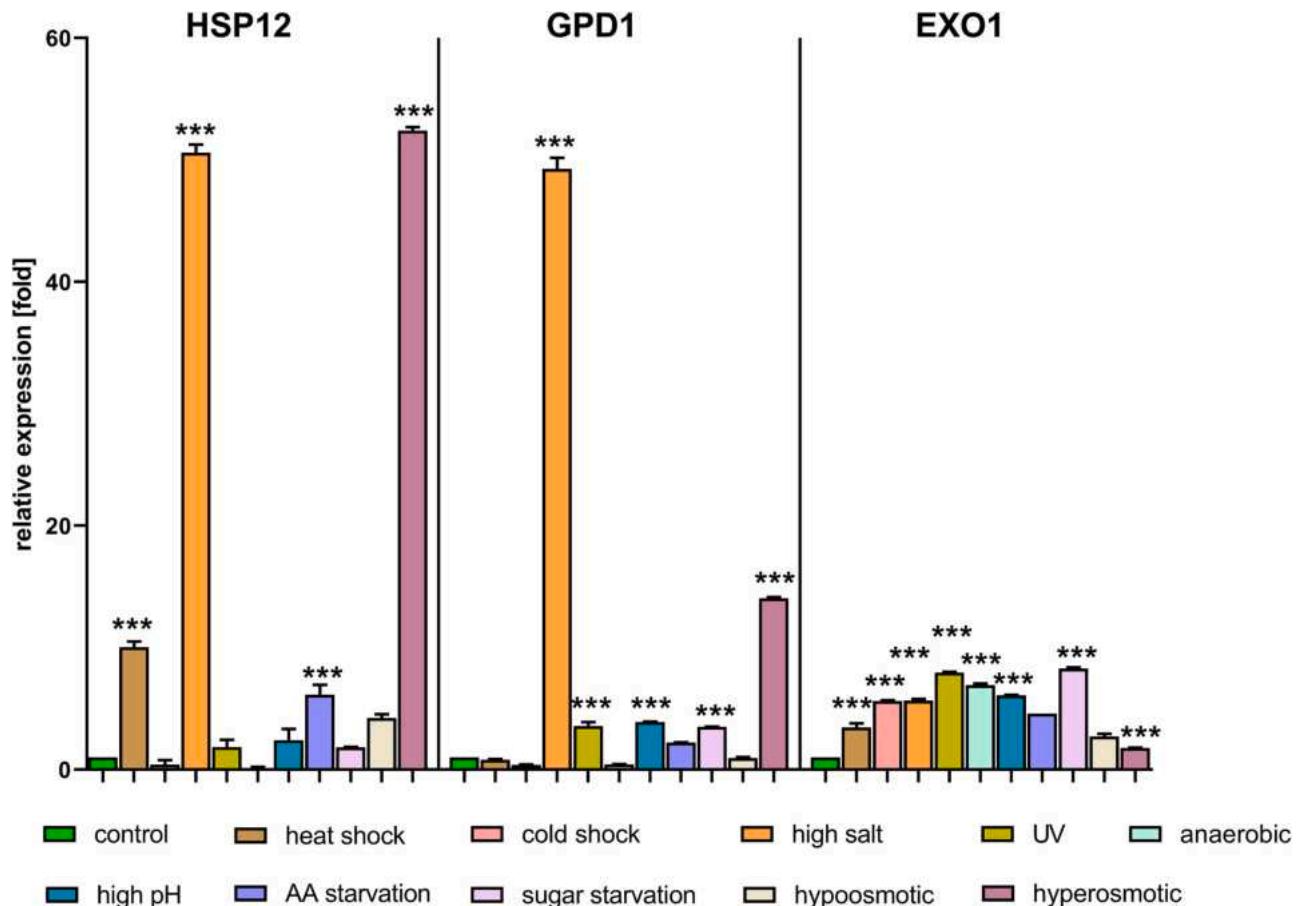


Fig. 2. Status of a cell stress analyzed by quantitative real-time PCR method.

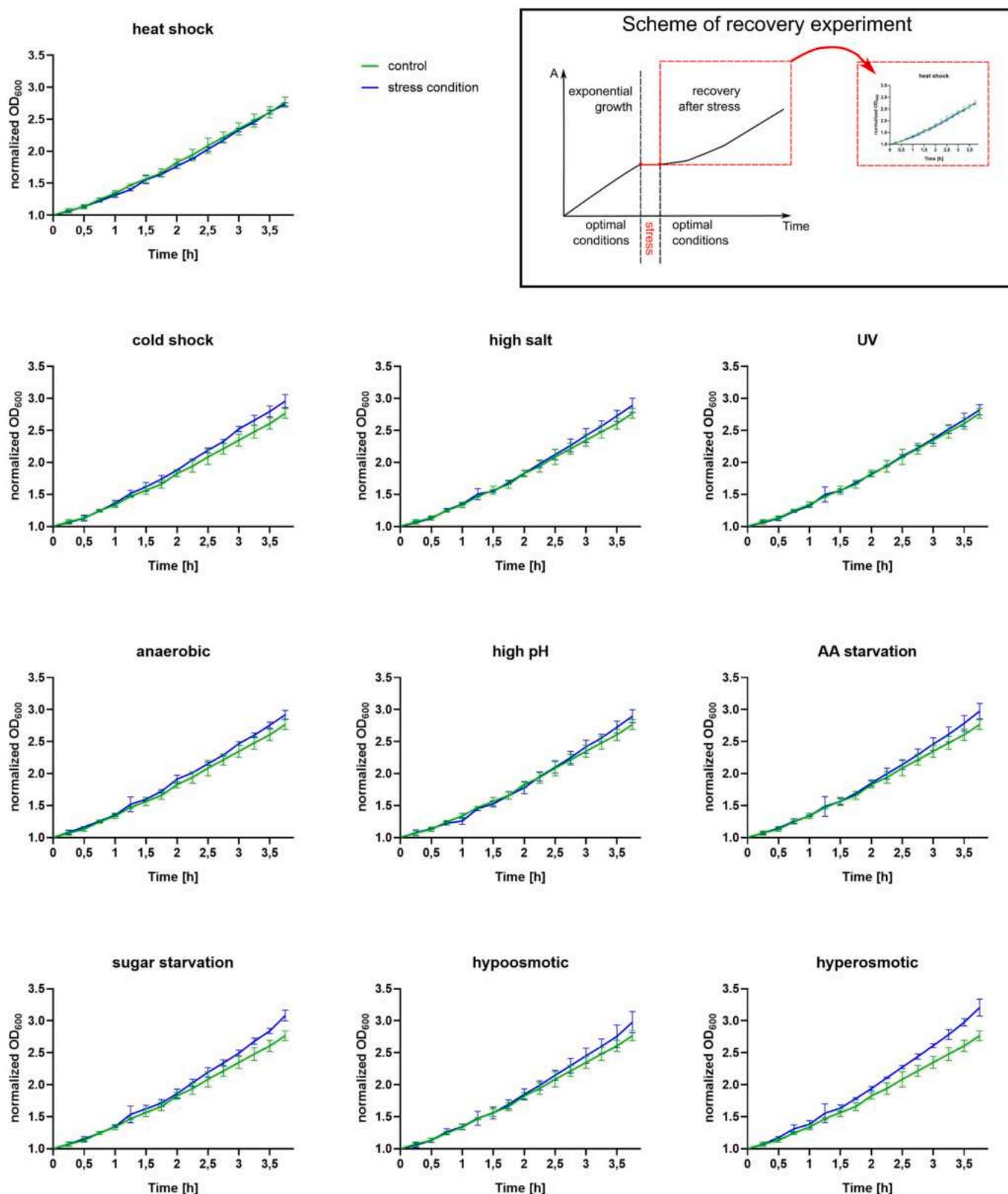


Fig. 3. *Saccharomyces cerevisiae* recovery from stress during the first 4 h.

normalized to the time 0. OD₆₀₀ measured for the control conditions is presented in green, OD₆₀₀ measured for particular stress condition is presented in blue. Results from five independent measurements are presented.

We have therefore inspected the time of recovery from stress in a

narrowed time frame (up to 30 min) with automated OD₆₀₀ measurements every 30 s. Using this approach we were able to precisely specify the time needed for stressed *S. cerevisiae* to match the growth of control culture (so called recovery time) (Fig. 4). The analyses clearly showed that yeast subjected to hyperosmotic shock and sugar starvation

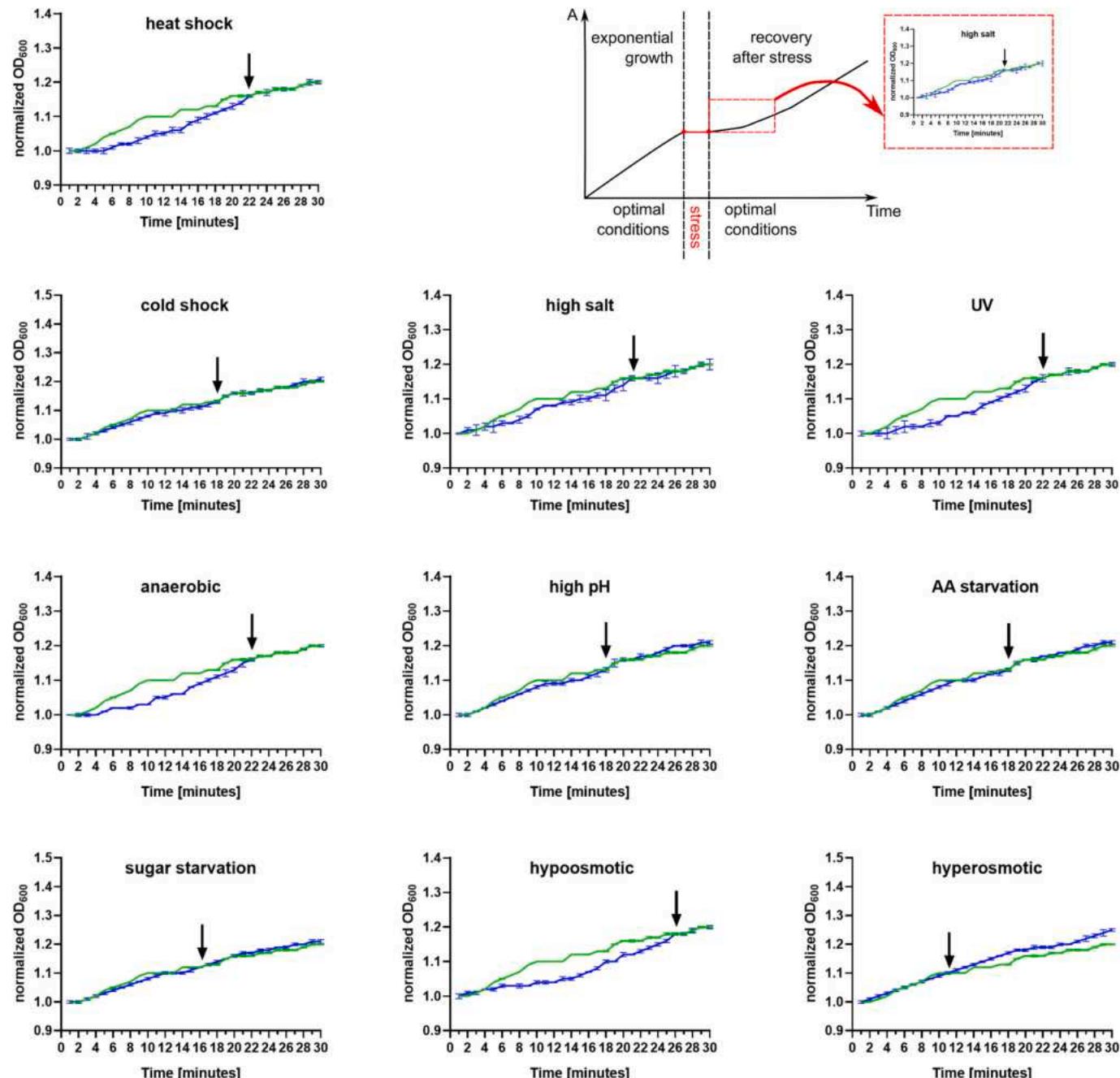
Table 1Growth kinetics of *S. cerevisiae* recovering from stress.

Recovery from:	Doubling time [min]	Growth rate	Recovery time [min]
control	106	0.390	
heat shock	106	0.389	22
UV	106	0.391	18
anaerobic	104	0.400	22
hypotonic	104	0.401	26
high salt	101	0.413	21
high pH	100	0.415	18
cold shock	100	0.416	18
AA starvation	100	0.417	18
sugar starvation	98	0.425	16
hyperosmotic	97	0.429	11

achieved it most quickly (after 11 and 16 min, respectively), which is in agreement with the calculated growth rate (**Table 1**). On the other hand yeast subjected to hypoosmotic or heat shock, anaerobic growth, or high salt reached an OD₆₀₀ value equal to the control culture 26, 22, 22, and 21 min, respectively, after transfer from stress to optimal conditions.

The scheme of the recovery experiment is presented in the top right corner. The growth kinetics is presented as a function of absorbance (A) to time. The absorbance was measured at $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀) and was normalized to the time 0. OD₆₀₀ measured for the control conditions is presented in green, OD₆₀₀ measured for particular stress condition is presented in blue. Arrows indicate the recovery time (the time when yeast recovering from stress reaches OD₆₀₀ of control yeast). Results from five independent measurements are presented.

In the next step, we have inspected the growth curves of yeast cultures recovered from ten different stress conditions. Using this approach

**Fig. 4.** *Saccharomyces cerevisiae* recovery from stress during the first 30 min.

we were able to specify the time needed for *S. cerevisiae* to reach the stationary phase, where the number of dividing cells equals the number of dying cells. The duration of exponential (Log) phase, when the cells are dividing by binary fission and doubling in numbers after each generation time, was shorter for all cultures recovering from stress when compared to the control culture, grown in optimal conditions (Fig. 5). As an example, *S. cerevisiae* control culture entered the stationary phase after 10 h and 36 mins, whereas those recovering from sugar starvation – after 8 h and 24 min (Table 2). Another important observation is that

after applying sugar, AA starvation, high pH, cold and heat shocks the number of cells at the end of Log phase was lower than in control. The observed OD₆₀₀ values were: ~4.4; ~4.5; and ~4.7; ~5.4 and ~5.4 respectively, compared to control at ~6.5 (Fig. 4.). Moreover, significant reduction of stationary phase duration has been observed after applying hypoosmotic stress and heat shock, to 16 h 48 min and 21 h 42 min, respectively, compared to control (28 h 36 min) (Fig. 5). Applying other stress conditions lead to stationary phase elongation, with the longest after anaerobic and UV stresses, to 41 h and 43 h 36 min,

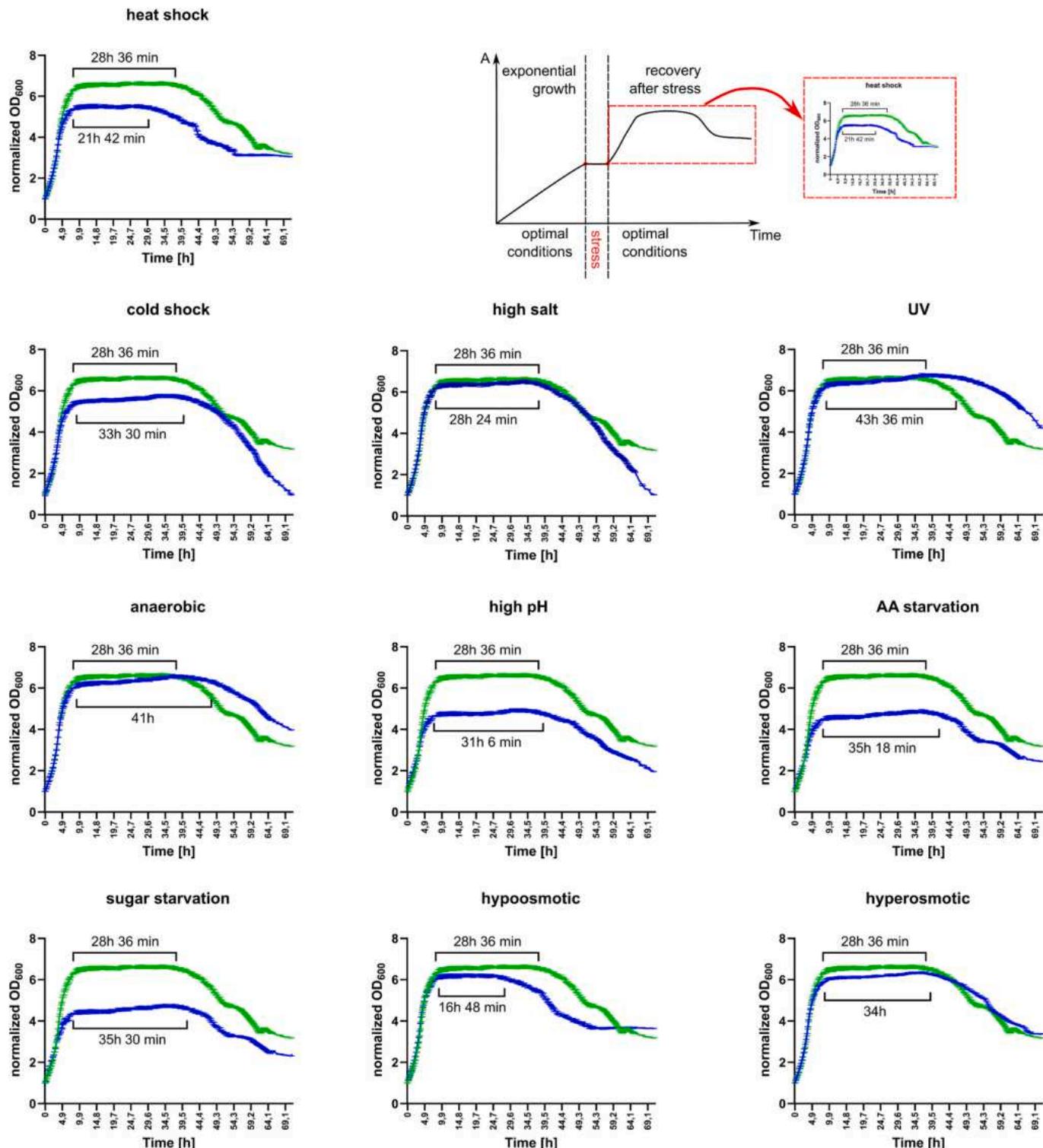


Fig. 5. Growth curves of *Saccharomyces cerevisiae* recovered from stress.

Table 2Growth parameters of *S. cerevisiae* recovering from stress.

Recovery from:	Log phase duration [h]	Stationary phase duration [h]	Entry to death phase [h]
control	10.6	28.6	39.2
high salt	10.6	31.1	41.7
UV	10.4	43.6	54.0
hyperosmotic	10.4	34.0	44.4
anaerobic	9.6	41.0	50.6
hypoosmotic	9.6	16.8	26.4
high pH	9.1	31.1	40.2
AA starvation	9.1	35.3	44.4
heat shock	8.9	21.7	30.6
cold shock	8.9	33.5	42.4
sugar starvation	8.4	35.5	43.9

respectively.

The scheme of the recovery experiment is presented in the top right corner. The growth kinetics is presented as a function of absorbance (A) to time. The absorbance was measured at $\alpha = 600$ nm (OD_{600}) and was normalized to the time 0. OD_{600} measured for the control conditions is presented in green, OD_{600} measured for particular stress condition is presented in blue. Duration of the stationary phase is presented. Results from five independent measurements are presented.

3.3. UV exposure and hyperosmotic stress lead to reduced survival of *S. cerevisiae*

Flow cytometry was utilized to evaluate the percentage of live and dead yeast cells subjected to different stress conditions, analyzed directly after applying stress (Fig. 6). The obtained results revealed a low number of cells stained with PI, indicating a high number of cells with an intact cell membrane under optimal conditions (0.21 % of dead cells) as well as during anaerobic stress (0.21 %), hypoosmotic stress (0.24 %), heat shock (0.27 %), high pH (0.31 %), high salt (0.33 %), sugar starvation (0.35 %), cold shock (0.41 %), and AA starvation (0.67 %). However, after UV exposure and hyperosmotic stress, there was a considerable increase in cells with damaged cell membranes (PI-positive cells), to 1.79 % and 1.98 %, respectively.

To corroborate on these findings, we analyzed yeast viability using confocal microscopy by double-staining the cells with Hoechst and PI (Fig. 7). For this experiment we chose *S. cerevisiae* subjected to heat shock, since in flow cytometry assays, the viability of cells under elevated temperature was very similar to that in many stress conditions and slightly lower than in optimal conditions. While PI can only penetrate permeable cells (red fluorescence), Hoechst binds to DNA (blue fluorescence) regardless of the cell membrane status. Thus, red cells are considered dead and blue cells as viable. In line with the results obtained from flow cytometry analysis, we observed higher number of blue-stained and lower number of red-stained cells in the control samples (yeast grown under optimal conditions of 30 °C), than in the heat-shocked samples (yeast grown under 37 °C for 15 min), which further confirmed results obtained using flow cytometry (Fig. 5). Such result indicated that the viability of *S. cerevisiae* is affected by mild temperature stress, however to a moderate extent, since a prominent number of viable cells was observed.

3.4. Single cell morphology is drastically influenced by mild abiotic environmental stress

In the next step, we employed holotomography microscopy to visualize the actual structure and morphology of *S. cerevisiae* during optimal and non-optimal growth conditions at a single-cell level (Figs. 8, 9, and 10). *S. cerevisiae* cells grown under optimal conditions (control cells) were of typical ellipsoidal shape, with buds of different sizes (small, medium, and large buds), and visible colony formation with fully-sized daughter cells. The cell wall was visible as a continuous, uninterrupted

structure (Fig. 8). The cells were also intact under high salt conditions, UV exposure, and hypo- and hyperosmotic shock (Fig. 9). During heat and cold shock, high pH, AA- and sugar starvation, and anaerobic conditions we observed visible cell wall damage or a presence of dead cells devoid of their content (Fig. 10).

Some of the stresses visibly influenced cell shape. During high salt and hypoosmotic stresses, the cells were round, and during sugar starvation, there were populations of cells with different shapes, including round, ellipsoidal, or irregular shapes (Fig. 9). Stress conditions influenced also the ability to produce buds. No buds were observed under hyperosmotic conditions. Small buds occurred under high salt and hypoosmotic stress (Fig. 9). The cells subjected to the remaining of the abiotic stresses possessed medium-sized buds. The striking observation from multiple stress conditions, including heat and cold shock, UV stress, anaerobic stress, high pH, and AA- and sugar starvation was the presence of vacuoles of a prominent size (visible as darker areas on bright field images and empty spaces in holographic reconstructions, Figs. 9, 10). During cold shock, UV stress, and sugar starvation some mother cells possessed two vacuoles, and three vacuoles were visible in cells after UV irradiation solely.

3.5. Cell morphology parameters, including volume, length, and sphericity are deregulated during stress

Quantitative analysis of the refractive index (RI) tomogram projection data indicated that yeast cells subjected to UV stress had significantly higher volume ($79.7 \pm 25.8 \mu\text{m}^3$) than cells grown under optimal conditions ($65.8 \pm 34.4 \mu\text{m}^3$, $p = 0.0021$, Fig. 11A, B). Conversely, cells during high pH, AA, or sugar starvation, anaerobic growth, cold shock, high salt stress, and hyperosmotic stress were of significantly smaller volume than in the control conditions. The highest reduction in the cell volume was observed in yeast undergoing hyperosmotic stress ($36.4 \pm 18.8 \mu\text{m}^3$, $p = 0.0000$), which means that cells were 1.8 times smaller than in the control conditions and 2.2 times smaller than under UV stress. Neither hypoosmotic nor heat shock influenced significantly the cell volume.

Enlarged cell volume under UV stress was additionally reflected in significantly increased cell length (8.3 ± 1.5 , $p = 0.0013$, Fig. 10C, D), compared to control (7.5 ± 1.8 , $p = 0.0013$). Similar dependencies were observed for hyperosmotic stress – smaller volumes of cells were also manifested with significantly smaller lengths than in the control conditions (5.4 ± 1.4 , $p = 0.0000$). *S. cerevisiae* cells treated with heat shock, AA- or sugar starvation, cold shock, high salt or pH, and anaerobic conditions had significantly smaller length than cells grown under optimal conditions (Fig. 11C, D). The hypoosmotic shock did not significantly influence the cell length.

Cells under hyperosmotic shock were characterized by significantly higher sphericity (0.73 ± 0.13 , $p = 0.0000$, Fig. 10E, F), compared to control (0.65 ± 0.09). Cell sphericity was also significantly higher under high pH (0.72 ± 0.12 , $p = 0.0000$), during anaerobic growth (0.71 ± 0.10 , $p = 0.0001$), and in hypoosmotic shock (0.70 ± 0.10 , $p = 0.0015$). Sugar starvation, high salt, AA starvation, heat or cold shock, and UV did not significantly influence cell sphericity (Fig. 11E, F). None of the stress conditions resulted in decreased cell sphericity.

3.6. Yeast cell shrinkage under hyperosmotic shock is manifested with reduced amounts of proteins and lipids

Since we have observed the most prominent morphological changes of yeast cells during UV and hyperosmotic stresses, we have inspected in detail the molecular equipment of yeast cells under these two stress conditions. Therefore, we have calculated the contents of two major cellular components, namely total cell proteins and total cell lipids contents (Fig. 12A, B). It appeared that UV stress did not influence neither the total protein content (0.176 pg , $p = 0.3977$, compared to the control value of 0.175 pg), nor the total lipid content (0.248 pg , $p =$

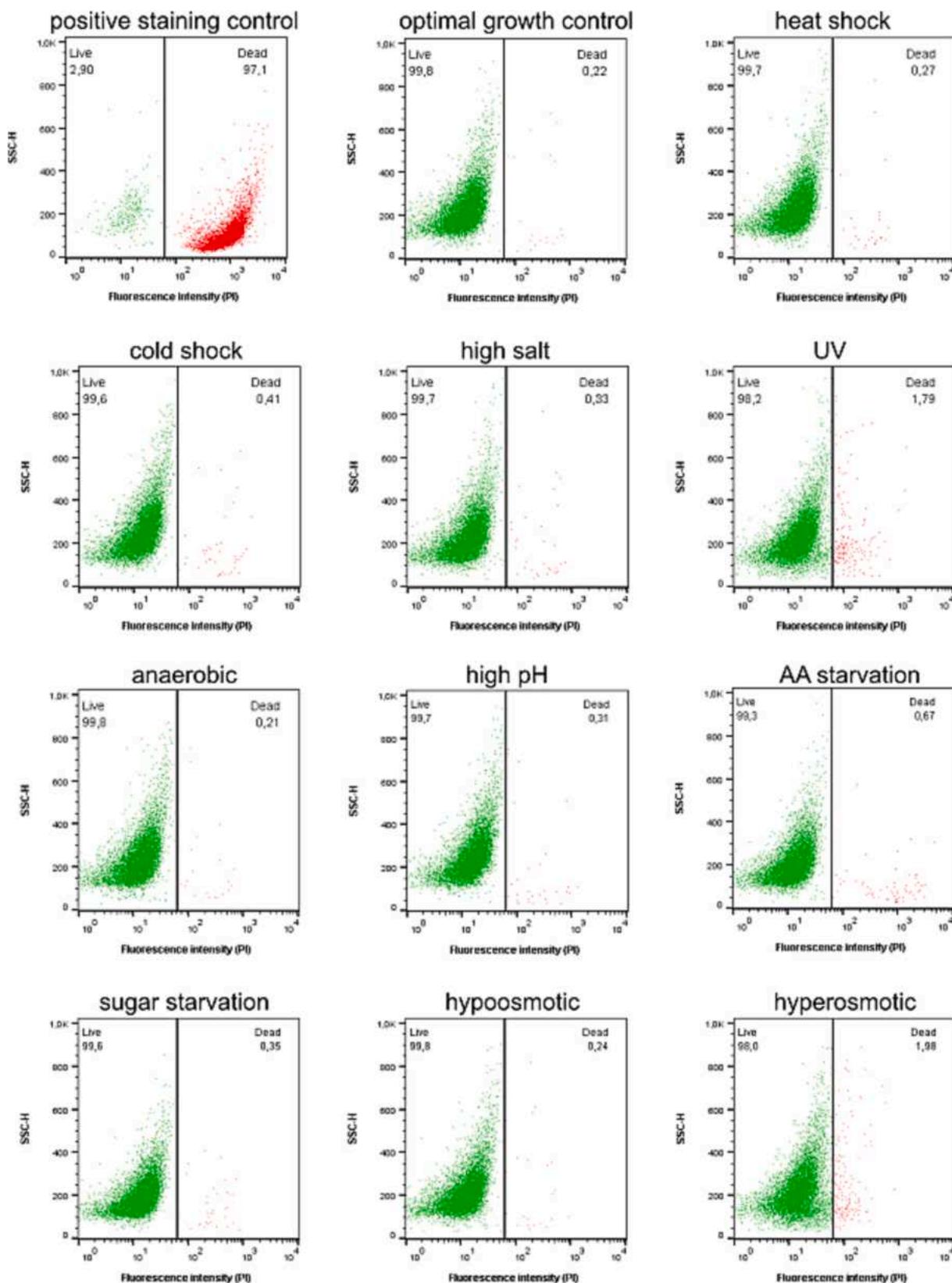


Fig. 6. Effect of stress conditions on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Representative flow cytometry plots presenting subpopulations of analyzed cells. Green and red dots correspond to live and dead cells, respectively. Numbers correspond to the mean percentage of live and dead cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

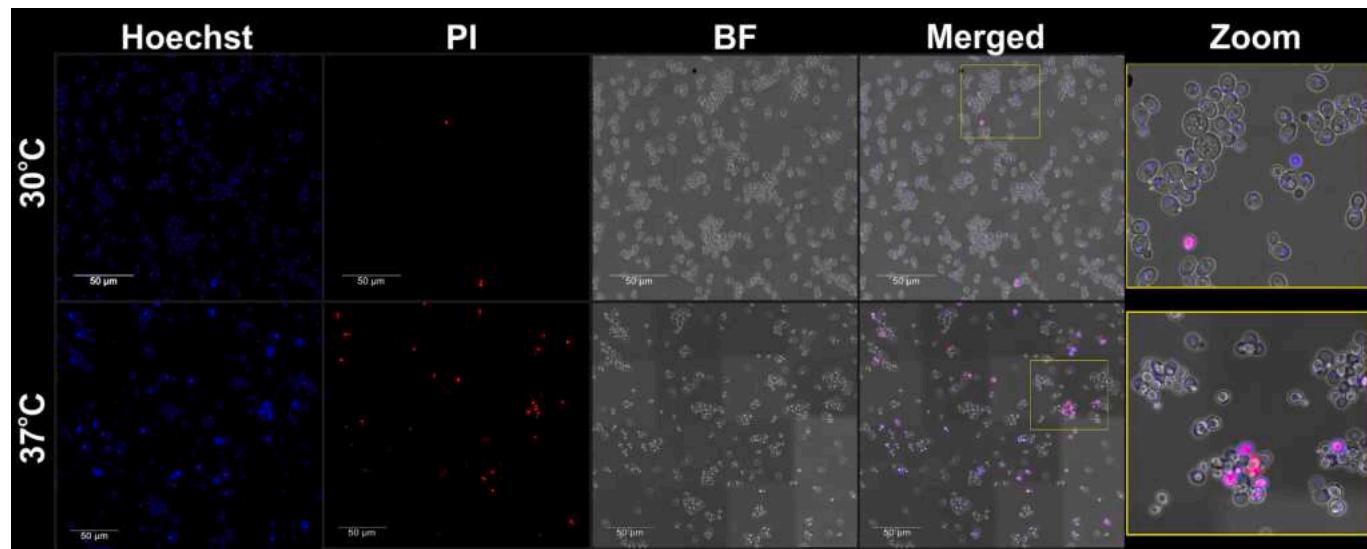


Fig. 7. Effect of heat shock on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Representative confocal microscopy imaging of *S. cerevisiae* cells grown at optimal (30°C) and elevated (37°C) temperature using Hoechst 33342 and PI staining. Blue (ex/em: 405/435–480 nm) and red (ex/em: 543/585–640 nm) fluorescence correspond to live and dead cells, respectively. BF – bright field. Merged images are shown on the two right panels. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

0.3987, compared to the control value of 0.246 pg) within the cells. However, hyperosmotic shock resulted in significantly lower contents of both, total cell proteins (0.151 pg, $p = 0.0000$), and total cell lipids (0.213 pg, $p = 0.0000$), when compared to the optimal growth (0.175 pg for proteins, and 0.246 pg for lipids).

Data are presented on graphs as scatter plots, and in tables as mean \pm standard deviation (additionally, minimal and maximal values are presented). p value versus control conditions is shown.

3.7. The number of lipid droplets is severely downregulated under UV and hyperosmotic stress

Lipids are the major building blocks of cellular membranes, energy stores, and signaling molecules. Most eukaryotic cells can store lipids in the form of lipid droplets, which play vital roles in the cellular stress response. Taking into account both, and the observation of stress-dependent changes in cell morphology (UV and hyperosmotic stress) and total lipid content (hyperosmotic stress), we have focused our attention on the detailed characteristics of lipid droplets in yeast cells during UV and hyperosmotic stresses. Lipid volume, mass, and length in lipid droplets were significantly elevated under UV conditions and significantly reduced under hyperosmotic conditions than in the control. Lipid volume was 2.1-fold higher under UV ($p = 0.0000$) stress and 21.2-fold lower during hyperosmotic shock ($p = 0.0000$), when compared to the control conditions (Fig. 13). Similarly, lipid mass was 2.2-fold higher under UV stress ($p = 0.0000$) and 21.3-fold lower during hyperosmotic shock ($p = 0.0000$), when compared to the control conditions (Fig. 13), whereas lipid length was 2.8-fold higher under UV stress ($p = 0.0000$) and 1.7-fold lower during hyperosmotic shock ($p = 0.0000$), when compared to the control conditions (Fig. 13). Lipid sphericity was not altered neither during UV nor hypoosmotic shock (Fig. 13, $p = 0.0536$, $p = 0.0869$, respectively) compared to control. Clear differences were observed in the lipid droplet count: there were significantly fewer lipid droplets in both UV and hyperosmotic conditions (4.2-fold and 2.7-fold less, respectively). Lipid concentration within the droplets was not altered during hyperosmotic shock (0.37 ± 0.01 , $p = 0.3030$), however it was significantly higher (0.39 ± 0.01 , $p = 0.0000$) under UV stress when compared to the optimal growth conditions (0.37 ± 0.07 , $p = 0.0000$).

Data are presented on graphs as scatter plots, and in tables as mean

\pm standard deviation (additionally, minimal and maximal values are presented in tables). p value versus control conditions is shown. Data have been ordered from the largest to the smallest value.

4. Discussion

This study demonstrates *Saccharomyces cerevisiae* recovery process from ten different mild stress conditions as well as prominent stress-dependent changes observed in morphological and biological features, which include single-cell shape, dimensions, molecular content (proteins, lipids, and lipid droplets), and the ability to reproduce (bud size). Although all of these particular features have been studied in yeast using different methods in the last decades, this is the first detailed report on *S. cerevisiae* recovery from ten mild, temporary abiotic stresses analyzed with modern biological and imaging techniques. Such a holistic approach allowed us to accurately describe how *S. cerevisiae* cells respond to the various growth conditions they may encounter in the environment and during industrial processing.

Different stressful factors that directly affect the yeast appear in the environment. Among them are e.g. temperature, osmotic stresses, nitrogen starvation, high or low external pH, or prolonged anaerobiosis. As a shield against them, microorganisms have created defense responses specific to each type of stress, as well as a general environmental stress response. Causton et al. (2001) found that approximately two-thirds of the *S. cerevisiae* genome is involved in the response to environmental changes. In order to ensure that *S. cerevisiae* are indeed undergoing stress conditions applied we examined the expression levels of known stress-regulated genes: *HSP12*, *GPD1*, and *EXO1* (Fig. 2). A significant upregulation of *HSP12* was noted during heat shock (10-fold), osmostress (high salt – 50-fold and hyperosmotic conditions - 50-fold), and significant downregulation during cold shock (5-fold) and anaerobic growth (40-fold), which is in accordance with literature data (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000; Praekelt and Meacock, 1990, Carmona-Gutierrez et al., 2010). *GPD1* was significantly upregulated during high salt and hyperosmotic stress, similarly to previous observations (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000; Hirayama et al., 1995; Siderius et al., 1997). The expression of *EXO1* was significantly upregulated (8-fold) after UV exposure, which is in agreement with the results of Albertyn et al. (1994). Furthermore, *EXO1* was upregulated during anaerobic growth (7-fold) and under high pH (6-fold).

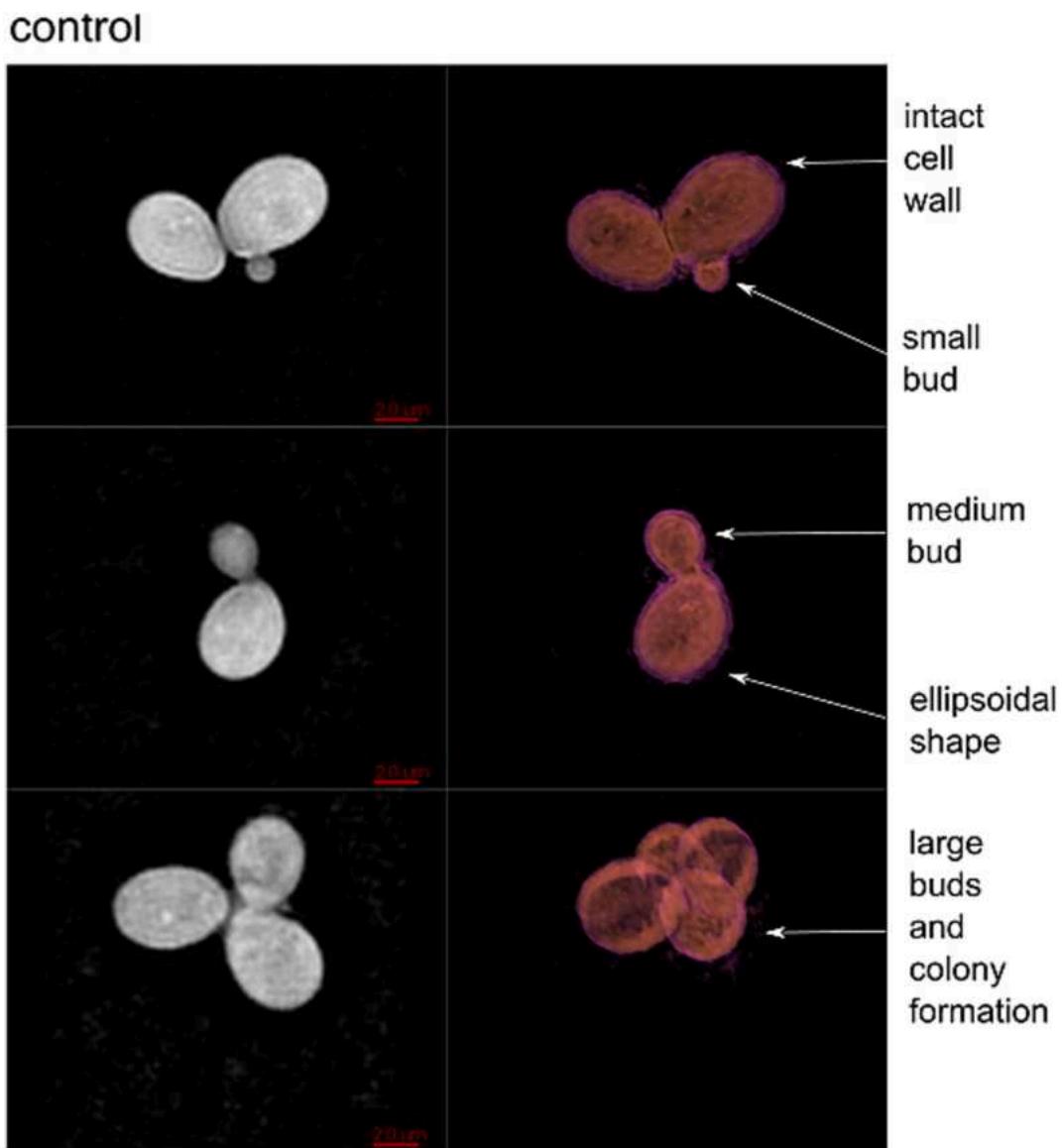


Fig. 8. The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* cells at single-cell level. Representative images taken with HT-2H microscope using refractive index (RI) thresholding. Left panel – bright field, right panel - holographic reconstruction.

It is well known that throughout the lives of all organisms a variety of suboptimal environmental conditions affect their ability to grow and multiply. The potentiality of an organism to survive to reproductive age, reproduce, and produce offspring, in other words biological fitness, is a quantitative representation of an individual's reproductive success (Orr, 2009). Consequently, through evolution, organisms have acquired the ability to cope with non-optimal conditions by navigating between proliferation and survival (Hernández-Elvira and Sunnerhagen, 2022). When the benefit of fitness in one aspect increases the cost of fitness in another aspect, a fitness trade-off occurs (Kim et al., 2024). Therefore, in an attempt to better understand the fitness of yeast cells subjected to mild stresses we performed recovery experiments based on the calculation of absorbance (OD_{600}) in complete liquid medium at various time points of stressed cultures after their return to optimal growth conditions. Strikingly, 30 min after transferring stressed cultures to optimal conditions their growth rates matched the one of non-stressed cells. Thirty minutes later, higher growth rates were recorded for all cultures, except for that recovering from heat shock. The shortest recovery times had cells subjected to hyperosmotic and sugar starvation stresses, the longest to hypoosmotic, high salt and anaerobic stresses. The doubling

time of stressed cultures was faster than in the control, except for heat shock and UV stress, which were equal to control. It has been determined decades ago that the first line of response to stresses in yeast is a generic transcriptional induction programme called 'core environmental stress response' (CESR), which is turned on regardless of the type of stress (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001). As a result, there is a decrease in the expression level of genes encoding the translation factors and machinery, and at the same time an increase in the expression level of genes of carbohydrate metabolism, protein folding and defense against oxidative stress (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Spriggs et al., 2010; Shalgi et al., 2013). In the next step, the response to a specific type of stress is initiated; to diminish the energy level spent on protein production, rapidly promote production of stress-protective proteins, and halt proliferation global translation is drastically reprogrammed (Preiss et al., 2003; Smirnova et al., 2005; Shenton et al., 2006; Melamed et al., 2008; Spriggs et al., 2010; Lackner et al., 2012). Additionally, cytoplasmic non-translating mRNAs are degraded (Daugeron et al., 2001; Tucker et al., 2001), for example, the RNA helicase Dhh1 and the decapping enzyme Dcp2 bind to autophagy-related transcripts and promote their degradation under optimal nutrient conditions (Hu

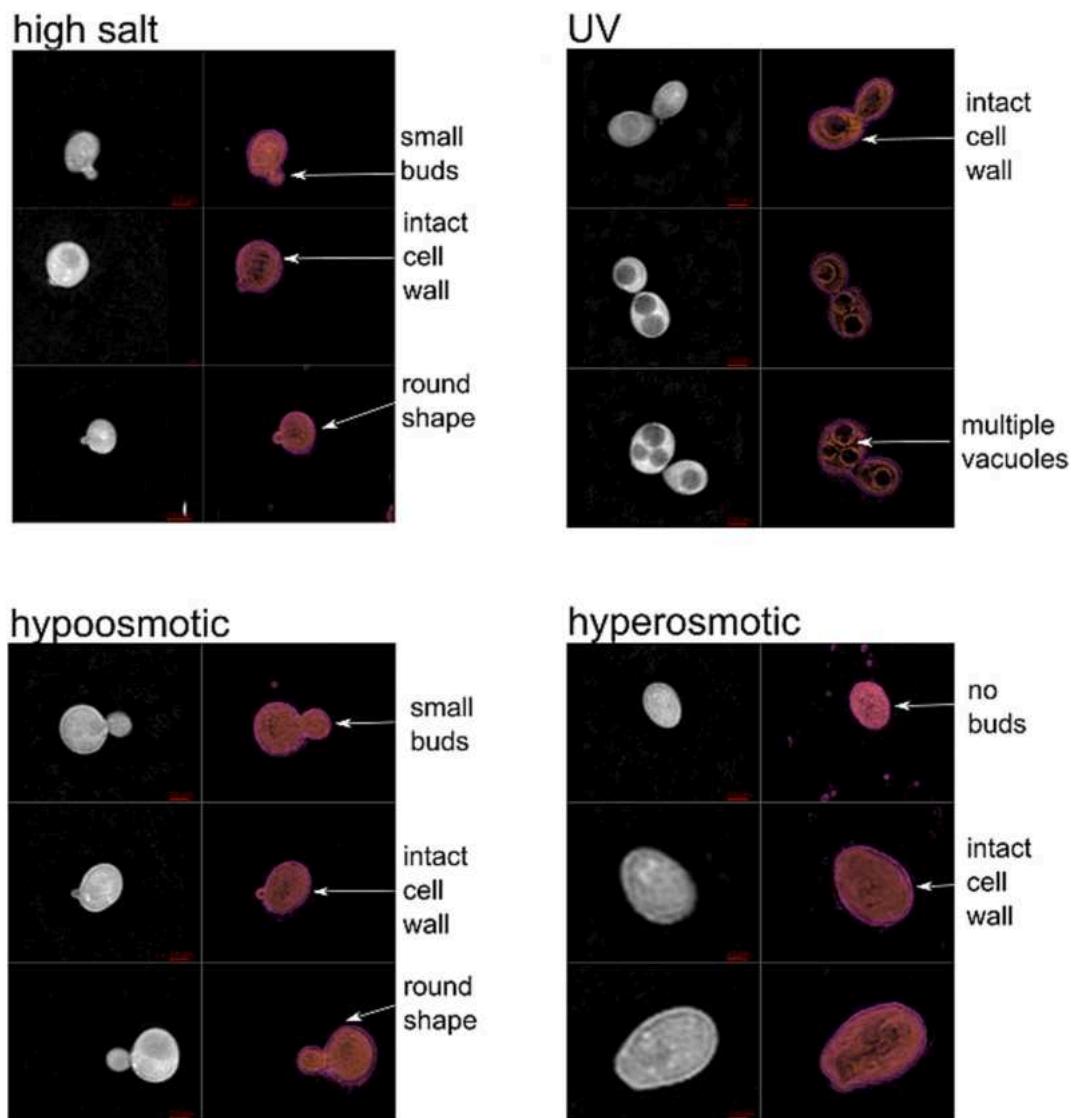


Fig. 9. Effect of high salt conditions, UV exposure, and hypo- and hyperosmotic shock on the morphology of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Representative images taken with HT-2H microscope using refractive index (RI) thresholding. Left panel – bright field, right panel - holographic reconstruction.

et al., 2015). The decrease in the levels of some mRNAs (e.g. pre-mRNAs encoding RPs) may occur via nonsense-mediated decay (NMD) pathway. In *S. cerevisiae* upregulation of NMD ensures a rapid change of translational program during stress (Kawashima et al., 2014). Apart from degradation, some mRNAs are stabilized during stress (Rodríguez-Gabriel et al., 2006; Molina-Navarro et al., 2008; Romero-Santacreu et al., 2009; Miller et al., 2011). It has been proven using dynamic transcriptome analysis (DTA) method, that during first 12 min of osmotic stress the rates of all synthesis and decay decreased, following strong increase in synthesis of a subset of mRNAs during next 12 min, which were then quickly degraded. In the recovery phase, that lasted according to authors about 2 h, the decay rates were restored and a fraction of the synthesis remained at levels different than those of the starting values (Miller et al., 2011). Moreover, in our own studies, we have observed prominent changes in ribosome-associated small RNAs (e.g. Zywicki et al., 2012; Bąkowska-Żywicka et al., 2016b; Mleczko et al., 2019) as well as the composition of the ribosomes after 15-min stress (Pietras et al., 2024).

The long-term stress response analysis (~70 h) revealed that yeast cells recovering from sugar starvation, AA starvation, and high pH stresses, and to a lesser degree heat and cold shocks (4,4; 4,5; 4,7; 5,1; 5,2; respectively) had much lower proliferation capacity than control

(6,5), and other stress-recovering yeast cultures. Moreover, the time necessary to reach stationary growth was shorter for all stresses, with UV, and hyperosmotic shock only slightly shorter, and high salt conditions equally long as control. Importantly, yeast cultures subjected to hypoosmotic and heat stresses had much shorter stationary phase, 16 h 48 min and 21 h 42 min, respectively, compared to control (28 h 36 min). For yeast cultures recovering from other stresses the duration of stationary phase was longer (except for high salt which was virtually equal to control), with the longest being 41 h for anaerobic, and 43 h 36 min for UV stresses. It can be clearly seen that all stress conditions applied to *S. cerevisiae* produced harmful effects on the yeast cells, and as a result, their growth, metabolism, and fitness were changed. Each stress impacted *S. cerevisiae* differently, which we observed at every step of the recovery process.

Previously, it has been proven that an organism with the best performance in one condition might not be able to perform best in another (Kim et al., 2024; Bruggeman et al., 2023). What is more, it has been hypothesized that *S. cerevisiae* belongs to a specific class of microorganisms in which rapid opportunistic growth (r-strategy growth) is the primary growth strategy relative to other cellular functions, a feature usually beneficial in variable and unpredictable environments (Bruggeman et al., 2023). In a study to determine genetic components

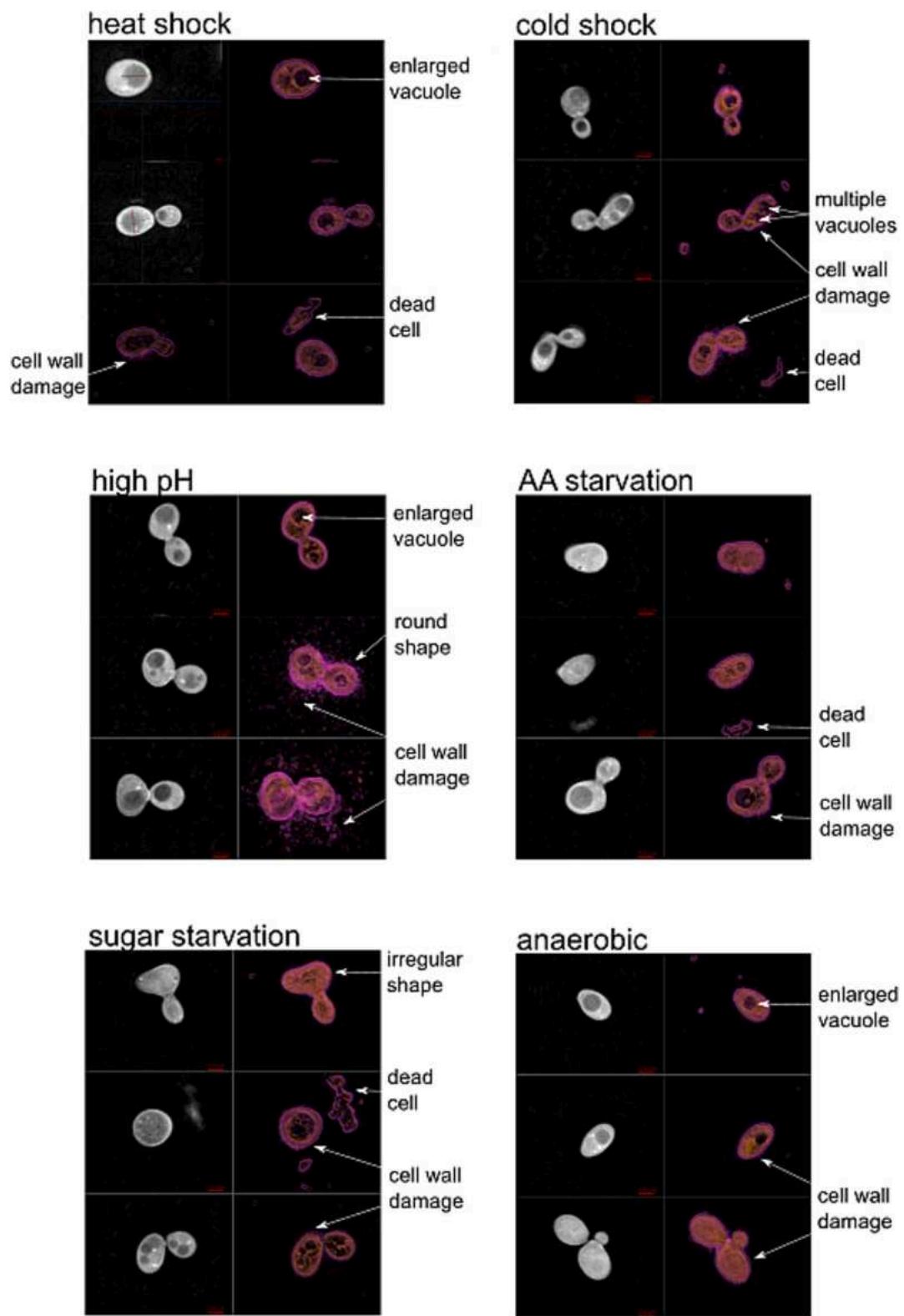


Fig. 10. Effect of heat and cold shock, high pH, AA- and sugar starvation, and anaerobic conditions on the morphology of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Representative images taken with HT-2H microscope using refractive index (RI) thresholding. Left panel – bright field, right panel - holographic reconstruction.

that are associated with the balance between growth and survival two genes were identified. MKT1 is a stress response gene that has multiple phenotypic expressions, contributing to growth advantage in numerous stress environments (Chaithanya and Sinha, 2023). It has been shown that the role of the MKT1 allele in the context of fitness depended on

both the environment and the presence of PBP1 (poly-A binding protein) and PUF3 (PUmilio-homology domain Family 3, a transcript-specific regulator of mRNA degradation) (Olivas and Parker, 2000). MKT1 is known to be associated to multiple gene expression variations and differences in phenotypic traits (Chaithanya and Sinha, 2023; Kim et al.,

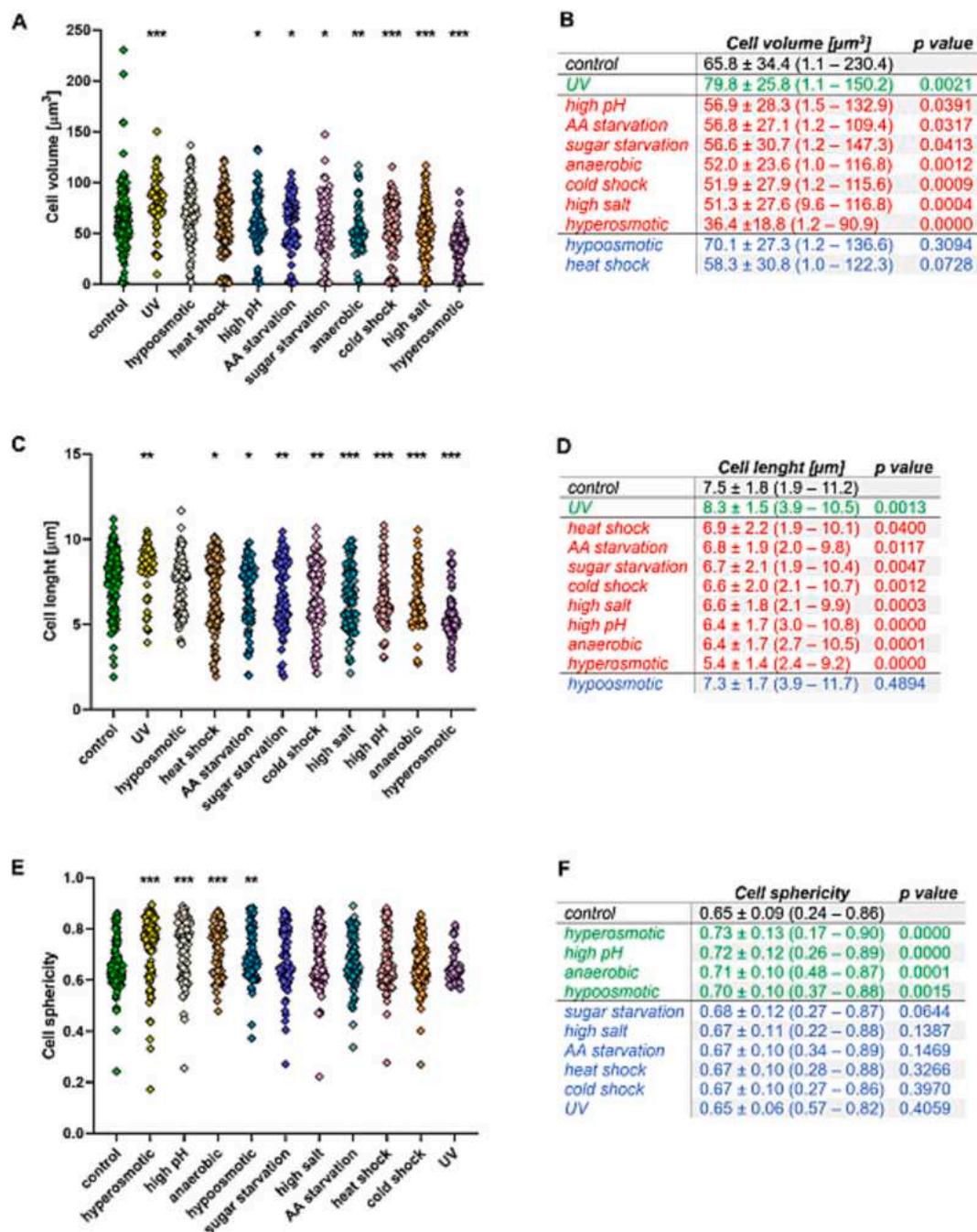


Fig. 11. Quantitative results of cell morphology parameters, including cell volume, length, and sphericity. Data are presented on graphs (A, C, E) as scattered plots, and in tables (B, D, F) as mean \pm standard deviation, minimal and maximal values. *p* value versus control conditions is shown. Data in tables have been ordered from the largest to the smallest value. Colour code on B, D, and F is as follows: black - control condition, green - stress conditions which resulted in significantly increased cell parameter, red - stress conditions which resulted in significantly decreased cell parameter, blue - stress conditions where no changes in cell parameter compared to the control condition were observed.

2024). IRA2, is a GTPase-activating protein, associated with multiple genes expression and phenotypic variability. IRA2 determines the balance between cell growth and survival by negatively regulating RAS, converting it from GTP- to GDP-bound inactive form, required for reducing cAMP levels, e.g. under nutrient limiting conditions (Tanaka et al., 1990; Tanaka et al., 1991; Kim et al., 2024).

Many external triggers have been shown to induce apoptosis in budding yeast including hydrogen peroxide, acetic acid, ethanol, high salt, osmotic stress, lipids, UV irradiation, heat stress, and numerous heavy metal ions (Qiu et al., 1998). Severe stress causes immediate death by complete breakdown of all cellular systems; however, death in

response to mild shocks proceeds slower. In the present analysis, we have found out that most of the mild temporary abiotic stresses do not cause a prominent cell death. Only UV irradiation and hypersmotic shock led to a visible amount (around 2 %) of propidium iodide-sensitive cells, which is the determinant of damaged cell membranes and cell death. This is consistent with data published by other groups. Del Carratore et al. (2002) tested the influence of different dose rates of UV (90, 120, 150, 30,0, and 500 J/m²) on *S. cerevisiae* cell survival. Exposure of cells to 120 J/m² of UV irradiation (the same dose we used in this study) caused the appearance of 25 % of apoptotic cells. This is a significantly higher death rate than in the present study, however, it might be due to

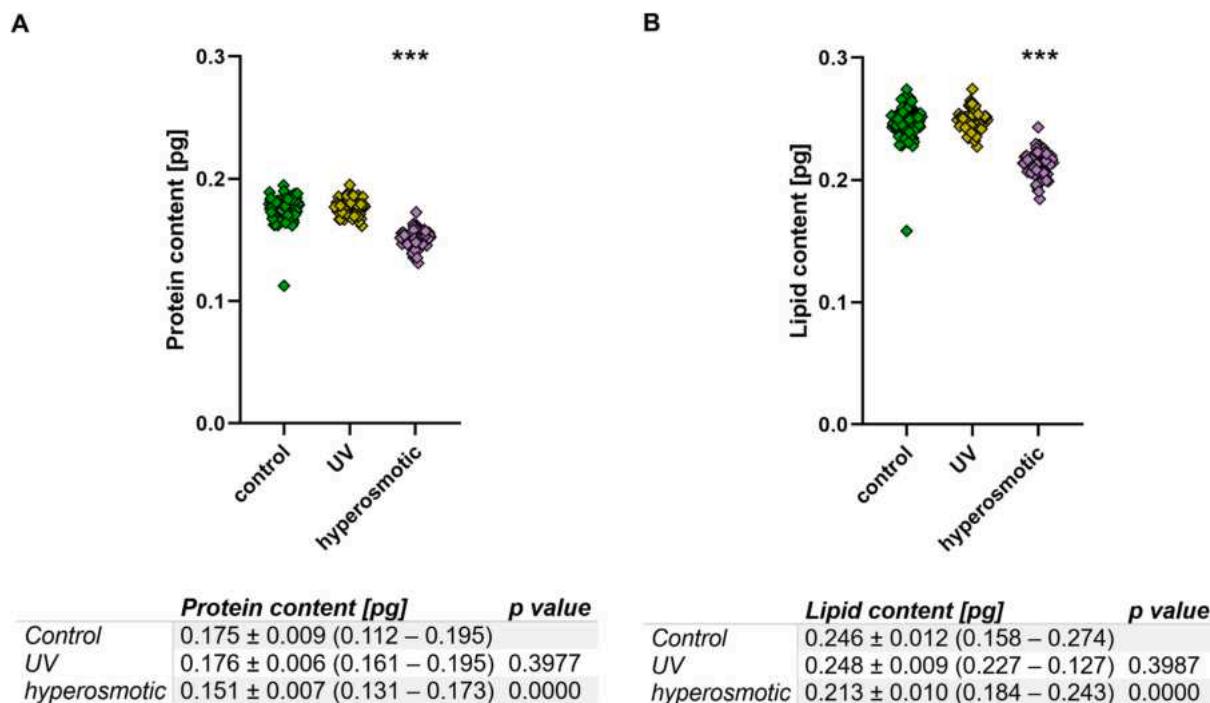


Fig. 12. Quantitative results of total protein (A) and total lipid (B) content in *S. cerevisiae* cells.

the longer observation time point (180 min vs 15 min in our case, respectively), since the apoptosis is progressing with time. Osmotic shock on the other hand causes both necrotic and apoptotic death due to inadequate or anomalous membrane reorganization (Silva et al., 2005). Importantly, hyperosmotic shock is deadly due to the presence of two factors, one of which is dehydration (hyperosmotic shock per se), while the other is subsequent rehydration (i.e., restoration of normal external pressure). Both of these cause noticeable permeabilization of the membrane. Silva et al. (2005) reported for the first time the apoptosis process taking place in *S. cerevisiae* under hyperosmotic stress. They have observed a prominent amount of dead cells (~50 %) already after 5 min of osmotic shock, however, they have induced stress with 60 % sorbitol (4.9 M versus 1 M in this study). However, Canetta et al. (2006) revealed that even after 1 h of osmostress with 20 % sorbitol (~1.6 M), cell viabilities stayed high at 86 %.

By employing label-free holotomography we observed that the morphological features of *S. cerevisiae* cells differed between optimal and non-optimal growth conditions. The cells in the control group were elliptical with smooth surfaces and were free of impurities (e.g. fragments of damaged cell walls of other cells). Compared to the control group, the cells cultured under heat and cold shock, high pH, AA- and sugar starvation were seriously deformed, and rough surfaces were observed. These results clearly show that certain mild temporary abiotic stresses affect *S. cerevisiae* cells, including their cell surface characteristics, cell integrity, cell shape, and cell wall. In addition to these perturbances, we noticed that during 15-min incubation periods, *S. cerevisiae* can modify its volume in response to a wide spectrum of mild abiotic stresses. Size is the most fundamental aspect of cellular forms, and the basis of cell size control is the coupling of growth and division. We observed the most prominent differences in yeast cell sizes when we compared the optimal yeast growth conditions with hyperosmotic stress (smaller volume and length of the cells) and UV stress (enlarged cell volume and increased cell length). The observation of cell shrinkage during hyperosmotic stress was additionally reflected by the reduction of total cellular proteins and lipids contents and is consistent with the assumption that sudden exposure to changed osmolarity leads to water efflux. Canetta et al. (2006) observed similar results: the authors measured the volume of *S. cerevisiae* cells with the means of atomic

force microscopy and revealed that sorbitol-induced hyperosmotic stress affected cell size - at 10 % sorbitol (~0.8 M) size decreased from 253 μm^3 to 245 μm^3 (3 %-decrease) after 10 min when compared with control cells without sorbitol exposure. In the present study, we observed a 29 %-decrease in size, however the stress conditions were slightly different (1 M sorbitol for 15 min). In our opinion longer exposure to hyperosmotic stress caused greater water loss in yeast, leading to more significant cell shrinkage. A similar conclusion might be drawn from a comparison of our data on UV-treated cell enlargement with the data recently presented by Reardon et al. (2022). The authors observed a significant increase in the cell size after mild UV treatment (50 J/m^2), but not until 2 h after the stress. Since we observed cell enlargement already 15 min after the stress, we assume that this might be due to the higher dose of UV (120 J/m^2), which led to faster cell response.

In this study, we have advanced the characterization of *S. cerevisiae* by allowing observation of not only cell morphology and dimensions but also its biological features. Based on the holotomography sphericity measurements we were able to ascertain whether cells were budding. We observed that the decrease in the cell volume during hyperosmotic stress was accompanied by the loss of the ability to form buds, and therefore likely to the inability to reproduce. Additionally, we classified the buds based on their size, which allowed for the observation that only selected stress conditions (high salt and hypoosmotic shock) yield a high level of asymmetry with large mother cells and small-sized daughter cells. In rich media we have observed mother and daughter cells at various stages of budding, with small, medium and large sizes of buds, which indicates that the yeast cells were actively budding. The detected relationship between the sizes of the single cell and the bud resembles a conclusion derived by Porro et al. (2009) - mother cells with small buds in poor media with nitrogen limitation, and Zakharstev and Reuss (2018) - mother-daughter asymmetry with significantly smaller daughter cells under elevated temperatures. All of these observations lead to the conclusion that *S. cerevisiae* division process is not severely disturbed during mild temporary temperature shifts, after low-dose UV irradiation, during short-term anaerobic stress, high pH, and AA- and sugar starvation, as the mother-daughter cell dimensions resembled those observed during optimal yeast growth.

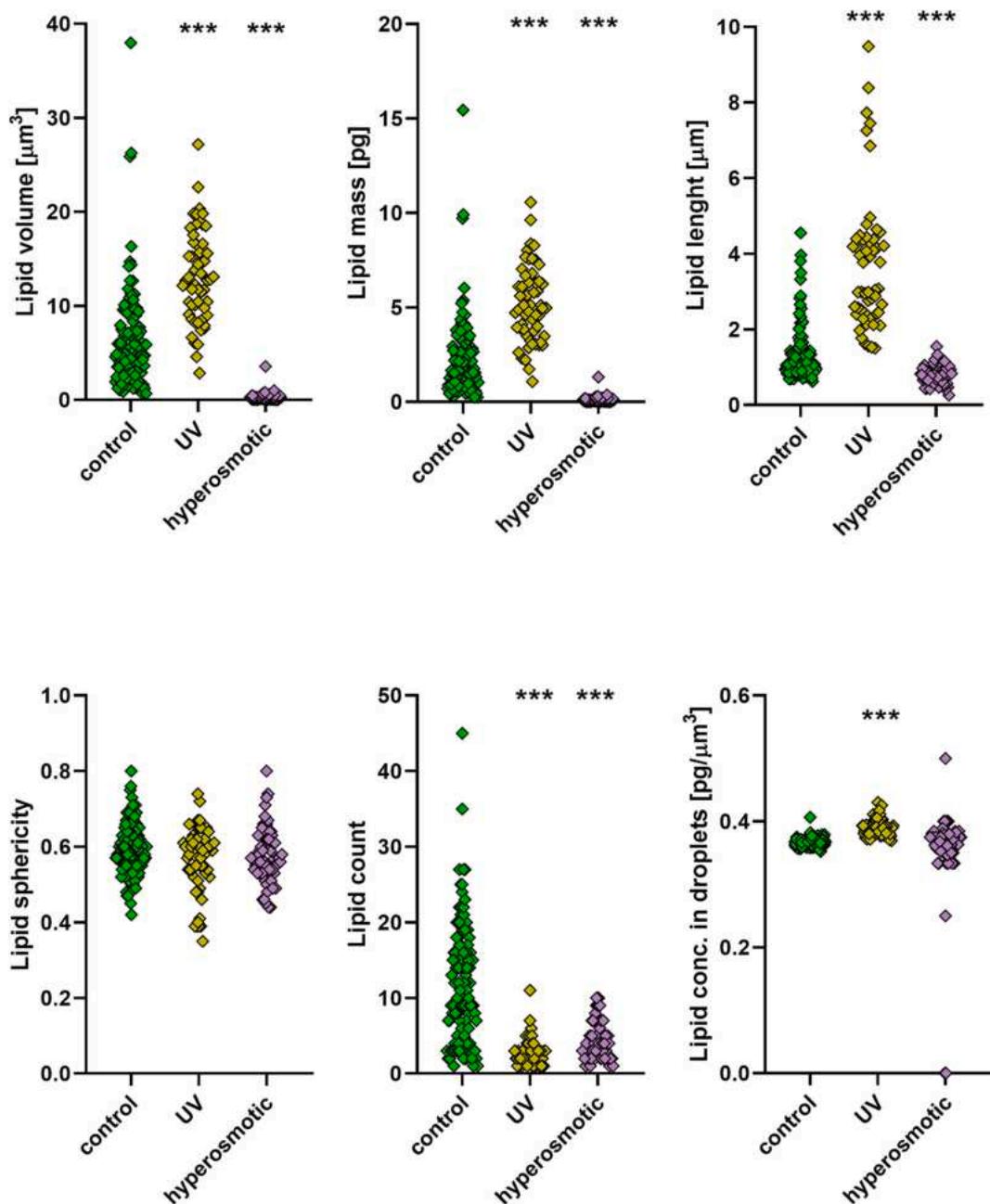


Fig. 13. Quantitative results of lipid content in *S. cerevisiae* cells.

The yeast vacuole carries out essential biochemical functions (degradation, storage, and signaling). Since this organelle contains a large number of unspecific hydrolases and numerous *endo*- and exo-proteinases with a broad substrate specificity, is the main site of intracellular proteolysis, needed especially during protein breakdown caused by unfavorable external conditions (Thumm, 2000). Therefore, the cell is likely to control the organelle's volume during environmental stress (Chan and Marshall, 2012). *S. cerevisiae* cells typically contain 1–5 vacuoles that undergo regulated cycles of membrane fission and fusion, leading to the increase of the vacuole membrane surface (fission) or its internal volume (fusion). Vacuole fission has been already shown two decades ago in *S. cerevisiae* during ethanol and heat shock stresses - vacuolar morphology was altered from segregated structures to single, large organelles (Meaden et al., 1999). More recently vacuole fission was observed under acetate and hypertonic conditions in *S. cerevisiae* (Gokbayrak et al., 2022). In the present study, we observed that multiple

abiotic mild temporary stress conditions, including heat and cold shock, UV stress, anaerobic stress, high pH, and AA- or sugar starvation result in increasing the size of the vacuole. Importantly, in yeast, the vacuoles also act as water reservoirs for cytoplasmic osmotic homeostasis required for survival when challenged with high salinity or drought. Vacuoles fill with water, swell and fuse when environmental water is abundant and release water, shrink, and undergo fission when water is scarce (Okreglak et al., 2023; Gokbayrak et al., 2022). Our observations are consistent with these findings since we were not able to distinguish vacuoles under high salt or hyperosmotic conditions, which might be attributed to the vacuole fission and shrinkage. Furthermore, it has been widely observed that as cells grow larger, their organelles also increase in size (the same situation was observed in the present study – enlarged cells after UV irradiation were characterized with enlarged vacuoles) (Chan and Marshall, 2012). One might therefore suspect that cell shrinkage (during hyperosmotic conditions, as observed here) also leads

to the vacuole size reduction.

When yeast encounters environmental stresses, also the composition of cell membranes changes dramatically. The yeast biological membrane is composed primarily of phospholipids, glycosphingolipids, ergosterol, and proteins (Daum et al., 1998). These building blocks for membrane lipid synthesis are stored in lipid droplets, ubiquitous organelles crucial for lipid homeostasis (Kurat et al., 2006). Except for being fundamental constituents of biological membranes, lipids are metabolic energy stores and important players in many signaling pathways. The metabolic demand for lipids differs greatly in growing, differentiating, or resting cells and therefore the storage of lipids in lipid droplets provides a highly efficient way of dealing with fluctuating nutritional supply. Fatty acids, stored as triacylglycerols are mobilized by lipolytic breakdown to generate cellular energy in times of starvation when yeast is suffering from oxidative stress (Zechner et al., 2012). Our observations performed using ODT, i.e. a significantly lower number of lipid droplets under UV and hyperosmotic stresses point to the same conclusion - the lipid droplets breakdown to generate energy the cell needs during these stress conditions. Importantly, during UV stress we noticed significantly higher lipid amounts (volume, mass, and length) in lipid droplets, which suggests dense packing with lipids of small amounts of lipid droplets. Under hyperosmotic shock, *S. cerevisiae* cells store fewer lipids in the lipid droplets when compared to the yeast under optimal conditions. Such a situation might be explained by cell shrinkage due to water efflux and likely consequent release of plasma membrane material, as well as changes in cell wall structure after sudden exposure to changed osmolarity. Taken together, our analysis of lipid droplets implicates a rapid adaptation of lipid content in response to mild temporary UV irradiation and hyperosmotic conditions, likely to support cellular function.

ODT is a technique that enables quantitative three-dimensional (3D) imaging of biological samples without using exogenous labelling agents at sub-micrometer resolution, because refractive index RI is an innate optical property of materials. It uses interferometry to measure complex optical fields consisting of the amplitude and phase delay of light diffracted by biological samples (Lee et al., 2013). The measurement of the dry mass of each cell is possible due to determination of the 2D optical phase delay of individual cells (Popescu et al., 2008; Sung et al., 2013). Determination of intracellular protein concentration in a single cell is possible by reconstructing the 3D distribution of the refractive index (RI) of biological samples based on measurements of multiple complex optical fields with various incidence angles (Yoon et al., 2015; Lee et al., 2015; Sung et al., 2009; Popescu et al., 2008). In addition, based on the reconstructed 3-D RI distribution of LDs ODT provides quantitative morphological and biochemical information (e.g., lipid concentration, volume, and dry weight) about individual LDs without the need to isolate them from the cell (Beuthan et al., 1996; Kim et al., 2016; Jung et al., 2018). One of the limitations of ODT is its inability to accurately determine the mass of small cells, e.g. bacteria, due to limited spatial resolution and phase noise (Sanz-Jiménez et al., 2022). Another limitation in the use of ODT is that only elements with a homogeneous structure can be accurately characterized, and the 3D measurement of refractive-index and birefringence distribution in optical microelements suffers from low dynamic range and high signal-to-noise ratio. The latter can be overcome by applying appropriate algorithm, as described in (Kozacki et al., 2007).

Quantification of cellular components can be done by using other methods such as chemical extraction by using organic solvents which is laborious, time-consuming and destructive for the studied sample, or fluorometric imaging that depends on the permeability of membranes and uses invasive exogenous dyes that may lead to incorrect results by affecting the physiology and viability of the cells. The individual mass of previously ionized biological particles in ultrahigh vacuum may be determined by measuring mass-to-charge ratio of a single ion (Peng et al., 2004), or by simultaneous measurements of charge and the mass-to-charge ratio of single ion (so called CDMS) (Todd et al., 2020; Keifer et al., 2017; Jarrold, 2022). Raman microscopy allows for detection of

molecular vibrational spectra, chemical fingerprints of molecules, notwithstanding, this technique requires a long acquisition time and a high-powered excitation light (Zhang, 2023; Cavanis et al., 2015).

CRediT authorship contribution statement

Piotr J. Pietras: Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Monika Chaszczewska-Markowska:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Daniel Ghete:** Writing – review & editing, Methodology. **Agata Tyczewska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Formal analysis, Data curation. **Kamilla Bąkowska-Żywicka:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The project received no external funding. We thank the employees of the Laboratory of Subcellular Structures Analyses from the Institute of Bioorganic Chemistry PAS for technical support, especially dr Agnieszka Fedoruk-Wysomirska and dr Paweł Pawelczak.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Albertyn, J., et al., 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4135–4144.
- Aon, J.C., Tecson, R.C., Loladze, V., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* morphological changes and cytokinesis arrest elicited by hypoxia during scale-up for production of therapeutic recombinant proteins. *Microb. Cell Fact.* 17, 195.
- Bąkowska-Żywicka, K., et al., 2016a. The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio* 6, 1186–1200.
- Bąkowska-Żywicka, K., Kasprzyk, M., Twardowski, T., 2016b. tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis in vitro. *FEMS yeast res.* 16, fow077.
- Bartholomew, J.W., Mittwer, T., 1953. Demonstration of yeast bud scars with the electron microscope. *J. Bacteriol.* 65, 272–275.
- Belin, J.M., 1972. A study of the budding of *Saccharomyces uvarum* Beijerinck with the scanning electron microscope. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38, 341–349.
- Beuthan, J., Minet, O., Helfmann, J., et al., 1996. The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Phys. Med. Biol.* 41 (3), 369–382. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/41/3/002>.
- Bruggeman, F.J., Teusink, B., Steuer, R., 2023. Trade-offs between the instantaneous growth rate and long-term fitness: consequences for microbial physiology and predictive computational models. *Bioessays* 45 (10), e2300015.
- Canetta, E., Walker, G.M., Adya, A.K., 2006. Correlating yeast cell stress physiology to changes in the cell surface morphology: atomic force microscopic studies. *ScientificWorld Journal*, 6, 777–780.
- Carmona-Gutierrez, D., et al., 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* 17, 763–773.
- Causton, H.C., et al., 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12, 323–337.
- Cavonius, L., Fink, H., Kiskis, J., et al., 2015. Imaging of lipids in microalgae with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *167* (3), 603–616. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252197>.
- Chaitanya, K.V., Sinha, H., 2023. MKT1 alleles regulate stress responses through posttranscriptional modulation of Puf3 targets in budding yeast. *Yeast* 40 (12), 616–627.
- Chan, Y.H., Marshall, W.F., 2012. How cells know the size of their organelles. *Science* 337, 1186–1189.
- Daugeron, M.C., Mauxion, F., Séraphin, B., 2001. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455.

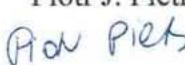
- Daum, G., et al., 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 1471–1510.
- Del Carratore, R., et al., 2002. Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. Mutat. Res. 513, 183–191.
- Gasch, A.P., et al., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell 11, 4241–4257.
- Gokbayrak, Z.D., Patel, D., Brett, C.L., 2022. Acetate and hypertonic stress stimulate vacuole membrane fission using distinct mechanisms. PloS One 17, e0271199.
- Hernández-Elvira, M., Sunnerhagen, P., 2022. Post-transcriptional regulation during stress. FEMS Yeast Res. 22 (1), foac025.
- Hiyama, T., et al., 1995. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 249, 127–138.
- Hu, G., et al., 2015. A conserved mechanism of TOR-dependent RCK-mediated mRNA degradation regulates autophagy. Nat. Cell Biol. 17, 930–942.
- Jarrold, M.F., 2022. Applications of charge detection mass spectrometry in molecular biology and biotechnology. Chem. Rev. 122 (8), 7415–7441. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00377>.
- Jung, J., Hong, S.J., Kim, H.B., et al., 2018. Label-free non-invasive quantitative measurement of lipid contents in individual microalgal cells using refractive index tomography. Sci. Rep. 8 (1), 6524. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24393-0>.
- Kawashima, T., et al., 2014. Widespread use of nonproductive alternative splice sites in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet. 10, e1004249.
- Keifer, D.Z., Pierson, E.E., Jarrold, M.F., 2017. Charge detection mass spectrometry: weighing heavier things. Analyst 142 (10), 1654–1671. <https://doi.org/10.1039/c7an00277g>.
- Kim, K., Lee, S., Yoon, J., et al., 2016. Three-dimensional label-free imaging and quantification of lipid droplets in live hepatocytes. Sci. Rep. 6, 36815. <https://doi.org/10.1038/srep36815>.
- Kim, D., Hwang, C.Y., Cho, K.H., 2024. The fitness trade-off between growth and stress resistance determines the phenotypic landscape. BMC Biol. 22 (1), 62.
- Kozacki, T., Kujawińska, M., Kniażewski, P., 2007. Investigation of limitations of optical diffraction tomography. Opto-Electron. Rev. 15, 102–109. <https://doi.org/10.2478/s11772-007-0006-8>.
- Kurat, C.F., et al., 2006. Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. J. Biol. Chem. 281, 491–500.
- Lackner, D.H., et al., 2012. Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. Genome Biol. 13, R25.
- Lee, K., Kim, K., Jung, J., et al., 2013. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: from principles to applications. Sensors (Basel). 13 (4), 4170–4191. <https://doi.org/10.3390/s130404170>.
- Lee, S., Kim, K., Lee, Y., 2015. Measurements of morphology and refractive indexes on human downy hairs using three-dimensional quantitative phase imaging. J. Biomed. Opt. 20 (11), 111207. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.111207>.
- Meaden, P.G., et al., 1999. Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. Yeast 15, 1211–1222.
- Melamed, D., Pnueli, L., Arava, Y., 2008. Yeast translational response to high salinity: global analysis reveals regulation at multiple levels. RNA 14, 1337–1351.
- Miller, C., et al., 2011. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. Mol. Syst. Biol. 4 (7), 458.
- Mleczko, A.M., et al., 2019. Levels of sRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression. Sci. Rep. 9, 18397.
- Molina-Navarro, M.M., et al., 2008. Comprehensive transcriptional analysis of the oxidative response in yeast. J. Biol. Chem. 283, 17908–17918.
- Okreglak, V., et al., 2023. Cell cycle-linked vacuolar pH dynamics regulate amino acid homeostasis and cell growth. Nat. Metab. 5 (10), 1803–1819.
- Olivas, W., Parker, R., 2000. The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. EMBO J. 19 (23), 6602–6611.
- Orr, H.A., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. Nat. Rev. Genet. 10 (8), 531–539.
- Peng, W.P., Yang, Y.C., Kangm, M.W., et al., 2004. Measuring masses of single bacterial whole cells with a quadrupole ion trap. J. Am. Chem. Soc. 126 (38), 11766–11767. <https://doi.org/10.1021/ja046754l>.
- Pietras, P.J., et al., 2024. Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity. Int. J. Biol. Macromol. 268, 132004.
- Popescu, G., Park, Y., Lue, N., et al., 2008. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 295 (2), C538–C544. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00121.2008>.
- Porro, D., et al., 2009. Analysis and modeling of growing budding yeast populations at the single cell level. Cytometry A 75, 114–120.
- Prakeet, U.M., Meacock, P.A., 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. Mol. Gen. Genet. 223, 97–106.
- Preiss, T., et al., 2003. Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. Nat. Struct. Mol. Biol. 10, 1039–1047.
- Qiu, J., et al., 1998. *Saccharomyces cerevisiae* exonuclease-1 plays a role in UV resistance that is distinct from nucleotide excision repair. Nucleic Acids Res. 26, 3077–3083.
- Reardon, R.M., et al., 2022. An epigenetically inherited UV hyper-resistance phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. Epigenetics Chromatin 15, 31.
- Reis, V.R., et al., 2014. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. Braz. J. Microbiol. 44, 1121–1131.
- Rodríguez-Gabriel, M.A., et al., 2006. Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. Mol. Cell. Biol. 26, 6347–6356.
- Romero-Santacreu, L., et al., 2009. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 2009 (15), 1110–1120.
- Saito, T.L., et al., 2004. SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* morphological database. Nucleic Acids Res. 32, D319–D322.
- Sanz-Jiménez, A., Malvar, O., Ruz, J.J., et al., 2022. High-throughput determination of dry mass of single bacterial cells by ultrathin membrane resonators. Commun. Biol. 5 (1), 1227. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04147-5>.
- Shalgi, R., et al., 2013. Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. Mol. Cell. 49, 439–452.
- Shenton, D., et al., 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. J. Biol. Chem. 281, 29011–29021.
- Siderius, M., Rots, E., Mager, W.H., 1997. High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. Microbiology (Reading). 143, 3241–3250.
- Silva, R.D., et al., 2005. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 58, 824–834.
- Smirnova, J.B., et al., 2005. Global gene expression profiling reveals widespread yet distinctive translational responses to different eukaryotic translation initiation factor 2B targeting stress pathways. Mol. Cell. Biol. 2005 (25), 9340–9349.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Willis, A.E., 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. Mol. Cell. 40, 228–237.
- Sung, Y., Choi, W., Fang-Yen, C., 2009. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging. Opt. Express 17 (1), 266–277. <https://doi.org/10.1364/oe.17.000266>.
- Sung, Y., Tzur, A., Oh, S., et al., 2013. Size homeostasis in adherent cells studied by synthetic phase microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (41), 16687–16692. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315290110>.
- Tanaka, K., et al., 1990. IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. Mol. Cell. Biol. 10 (8), 4303–4313.
- Tanaka, K., et al., 1991. IRA2, an upstream negative regulator of RAS in yeast, is a RAS GTPase-activating protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (2), 468–472.
- Thumm, M., 2000. Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. Microsc. Res. Tech. 51, 563–572.
- Todd, A.R., Barnes, L.F., Young, K., et al., 2020. Higher resolution charge detection mass spectrometry. Anal. Chem. 92 (16), 11357–11364. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02133>.
- Tucker, M., et al., 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 104, 377–386.
- Yoon, J., Kim, K., Park, H., et al., 2015. Label-free characterization of white blood cells by measuring 3D refractive index maps. Biomed. Opt. Express 6 (10), 3865–3875. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.003865>.
- Zakhartsev, M., Reuss, M., 2018. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. FEMS Yeast Res. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy052>.
- Zechner, R., et al., 2012. FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signalling. Cell Metab. 15, 279–291.
- Zhang, C., 2023. Coherent Raman scattering microscopy of lipid droplets in cells and tissues. J. Raman Spectrosc. 54 (9), 988–1000. <https://doi.org/10.1002/jrs.6540>.
- Zywicki, M., Bakowska-Zywicka, K., Polacek, N., 2012. Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis. Nucleic Acids Res. 40, 4013–4024.

Piotr J. Pietras
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w publikacji pt. „*Saccharomyces cerevisiae* recovery from various mild abiotic stresses: viability, fitness, and high resolution three-dimensional morphology imaging”, opublikowanej w: Fungal Genetics and Biology, 2025, autorstwa: Pietras PJ, Chaszczewska-Markowska M, Ghete D, Tyczewska A, Bąkowska-Żywicka K, która stanowi część mojej pracy doktorskiej, polegał na wykonaniu badań i analiz (indukcja warunków stresowych, testy regeneracji, krzywe wzrostu, przygotowanie próbek do analiz holotomograficznych), analizie danych, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.

Piotr J. Pietras


Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN



dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

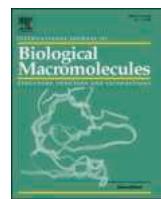
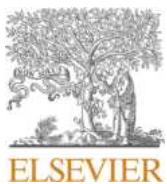
Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Jako autor korespondencyjny w publikacji pt. „*Saccharomyces cerevisiae* recovery from various mild abiotic stresses: viability, fitness, and high resolution three-dimensional morphology imaging”, opublikowanej w: Fungal Genetics and Biology, 2025, autorstwa: Pietras PJ, Chaszczewska-Markowska M, Ghete D, Tyczewska A, Bąkowska-Żywicka K, oświadczam, że udział Piotra J. Pietrasa w w/w publikacji polegał na wykonaniu badań i analiz (indukcja warunków stresowych, testy regeneracji, krzywe wzrostu, przygotowanie próbek do analiz holotomograficznych), analizie danych, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.



Kamilla Grzywacz



Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity



Piotr J. Pietras, Anna Wasilewska-Burczyk, Kamila Peplowska, Łukasz Marczak,
Agata Tyczewska, Kamilla Grzywacz*

Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Ribosome heterogeneity
Translation regulation
Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

Ribosomes, intercellular macromolecules responsible for translation in the cell, are composed of RNAs and proteins. While rRNA makes the scaffold of the ribosome and directs the catalytic steps of protein synthesis, ribosomal proteins play a role in the assembly of the subunits and are essential for the proper structure and function of the ribosome. To date researchers identified heterogeneous ribosomes in different developmental and growth stages. We hypothesized that under stress conditions the heterogeneity of the ribosomes may provide means to prepare the cells for quick recovery. Therefore the aim of the study was the identification of heterogeneity of ribosomal proteins within the ribosomes in response to eleven stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*, by means of a liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and translation activity tests. Out of the total of 74 distinct ribosomal proteins identified in the study 14 small ribosomal subunit (RPS) and 8 large ribosomal subunit (RPL) proteins displayed statistically significant differential abundances within the ribosomes under stress. Additionally, significant alterations in the ratios of 7 ribosomal paralog proteins were observed. Accordingly, the translational activity of yeast ribosomes was altered after UV exposure, during sugar starvation, cold shock, high salt, anaerobic conditions, and amino acid starvation.

1. Introduction

Ribosomes are highly conserved biological macromolecules that translate the information encrypted in the genome to create the proteins in all cells. While the complete crystal structures of less complex prokaryotic ribosomes are being continuously resolved since 2001 [1–4], the only eukaryotic organism for which the atomic structure of the ribosome is known is an unicellular yeast *Saccharomyces cerevisiae* [5,6]. Eukaryote ribosomes vary in size from 3.3 MDa in single-celled yeast to 4.4 MDa in humans. In both yeast and humans the small 40S subunit is composed of 33 ribosomal proteins (r-proteins) and 18S ribosomal RNA (rRNA) [7]. The large 60S subunit contains 46–47 r-proteins in yeast and humans, respectively, as well as three distinct rRNAs: 5S, 5.8S and 25S in yeast and 5S, 5.8S and 28S in humans [8]. The main differences in ribosome sizes between eukaryotes result mainly from expansion segments absent or present in rRNA as well as loss or gain of individual r-proteins.

Strikingly, despite extremely high conservation of the ribosome

function, only 34 r-proteins are shared between prokaryotes and eukaryotes [9]. Furthermore, the expression of some of the ribosomal proteins has been observed to vary between cell types, developmental stages or growth conditions in multiple organisms. Studies that examined ribosomal proteins more globally at organism level, have shown that different ribosomal proteins are expressed at distinct levels in unique cell types [10]. In the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, ribosomes are composed of different ribosomal proteins at two different states of its life cycle, the vegetative and the spore stage. Such results suggest that these r-proteins may be developmentally regulated [11]. Similar situation has been observed in *Escherichia coli*: the composition of ribosome associating proteins changes profoundly as cells transition from exponential to stationary growth phase [12]. Proteomics studies of *S. cerevisiae* ribosomes identified 77 ribosome-associated proteins, which suggests that many additional factors may modulate ribosome activity. Cells lacking some of these proteins showed defects in the rate and fidelity of protein synthesis as well as ribosome biogenesis [13]. Moreover, a large-scale quantitative expression-profiling screens aimed

* Corresponding author.

E-mail address: kamilla.grzywacz@ibch.poznan.pl (K. Grzywacz).

at 72 ribosomal proteins in 14 tissues and cell types in the developing vertebrate embryos revealed dramatic differences in the expression levels of r-proteins among different tissues and cell types and presented co-regulated expression patterns among specific groups of r-proteins [14].

In addition to the fact that ribosomal proteins are expressed at different levels (causing different stoichiometry) under specific conditions, in some organisms r-proteins are encoded by parologue genes. In *S. cerevisiae* 59 out of the 79 r-proteins have two paralogous genes, as a result of an ancient whole-genome duplication [15]. Already in 2007, Komili et al. provided several lines of evidence to suggest that when it comes to the ribosomal proteins' genes in yeast, individual members of a paralogous gene pair are rarely functionally identical [16]. In fact, after comparing the transcriptomes of yeast cells in which paralogs of genes encoding ribosomal proteins have been deleted, the Authors have found substantial differences. These extensive functional analysis lead to the intriguing conclusion that there is a very large variety (a subset of 259) of ribosomes in *S. cerevisiae* with some degree of specialization. Komili et al. proposed that there is a "ribosome code" that influences translation and perhaps other cellular functions. It is therefore clear that the view of the ribosomal proteins as only carrying out scaffolding functions is undergoing a fundamental paradigm shift. However, several crucial questions need to be addressed before a ribosome code for translational control could be accepted and the mechanism by which the cell utilizes this ribosome code to carry out specific functions is yet to be determined.

The reason for the heterogeneity of the ribosomes most probably provides means to prepare the translational program of stressed cells for recovery, because proper ribosome functioning is crucial to the health of the cell. While the concept of specialized ribosomes contributing to proteome modulation as a stress response is tempting, conclusive experimental evidence is still missing. We have therefore aimed at characterizing the heterogeneity of yeast ribosomes in the aspect of ribosomal protein composition as a response to environmental stresses. The ribosomal proteins were analyzed using a liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method. The functional consequences of ribosome heterogeneity have been tested with the means of translation activity tests.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strain and growth conditions

Saccharomyces cerevisiae wild-type strain BY4741 (MAT α ; his3Δ 1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0) was grown in YPD medium with 2 % glucose at 30 °C. Environmental stress was induced as previously described [17,18], in five biological replicates. Briefly, cells were grown to mid-log phase, and stress conditions were applied for 15 min. The duration of stress was based on previous data reported by Causton et al. [19], who tested 15, 30, 45, 60, and 120 min of stress and reported the exposition to 15-minute stress alters the expression of 66 % of *S. cerevisiae* genes. Moreover, in our own studies, we've observed prominent changes in ribosome-associated small RNAs after 15-minute stress (e.g. [18,21]). After exposition to stress, cells were pelleted and stored at -20 °C. Stress conditions were as follows: heat shock (37 °C), cold shock (15 °C), high salt conditions (1 M NaCl), high pH conditions (pH 7.9), UV exposure (120 J/m² UV), hyperosmotic shock (1 M sorbitol), hypoosmotic shock (cells grown to mid-log phase in YPD supplemented with 1 M sorbitol were transferred to YPD without sorbitol), amino acid starvation, sugar starvation, and anaerobic and normal growth.

2.2. Polysome profiling

Polysome profiling was performed as described in [20]. *S. cerevisiae* cell culture was grown to mid-log phase (OD₆₀₀ of 0.8). Next, 500 µg/ml cycloheximide was added to the culture 15 min before harvest. Cell debris was precipitated by centrifuging at 11,300 × g for 2 min at 4 °C.

Lysates were clarified by centrifuging at 11,300 × g for 10 min at 4 °C. Approximately 10 A260 units of cell lysate (1 ml) were loaded onto a linear 8–40 % sucrose gradient. The gradients were centrifuged in a Beckman SW40 Ti rotor at 39,000 rpm for 2.5 h at 4 °C. Sucrose gradients were analyzed by continuously monitoring absorbance at A254 with a UV detector. To analyze translation kinetics, areas under the curve of the monosome and polysome peaks were calculated based on their absorbance profile at 254 nm and the ratio of polysome to monosome (P/M) peak area was calculated.

2.3. Metabolic labeling

Yeast spheroplasts were prepared from a 50 ml culture grown to an OD₆₀₀ of 0.8 by adding 350 U of zymolyase (Zymo Research) and incubating at 30 °C for 25–30 min as previously described [20]. Spheroplasts (115 µl) were combined with 1 ml YPD broth supplemented with 1 M sorbitol and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tubes. Next, 450 µl of the sample was incubated at 30 °C for 15 min before adding 1 µl ³⁵S-methionine (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) and incubated for an additional 1 h. Labeled proteins were precipitated by adding 1 ml 20 % (f.c.) trichloroacetic acid and incubated at 95 °C for 20 min. This solution was then filtered through a glass-fiber filter and quantified by liquid scintillation counting. Metabolic labeling measurements were performed at least in triplicate.

2.4. Ribosome isolation

Yeast ribosomes were prepared as previously described [21]. Briefly, cell pellets were washed with ice-cold water and resuspended in buffer (10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.4 mM PMSF) at 4 °C. Equal volumes of glass beads (400 µm in diameter) were added, and cells were broken using 8 pulses of vortexing (30 s each), punctuated by cooling on ice. Cell debris was precipitated at 11,300 × g for 2 min at 4 °C in Eppendorf centrifuge (F-34-6-38 rotor). Lysate was further clarified by centrifugation at 11,300 × g for 10 min at 4 °C in Eppendorf centrifuge (F-34-6-38 rotor). The ribosomes were pelleted from the lysates by centrifugation at 160,000 × g for 90 min at 4 °C in Beckman centrifuge using 70.1 Ti rotor and suspended in the storage buffer (2 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 20 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20 % glycerol).

2.5. LC-HRMS sample preparation

To the ribosome sample, SDS was added to attain a final concentration of 0.1 %. The sample was then subjected to a 15 min sonication process followed by 10 min of vortexing. To measure the protein abundance in the ribosome probes, BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) was used following the manufacturer's protocol, followed by the measurement of absorbance at the wavelength of 562 nm in Tecan Infinite M200 Pro. Samples containing 10 µg of proteins were filled up to 25 µl with the digestion buffer (50 mM ammonium bicarbonate) and 1.5 µl reducing buffer (100 mM DTT), and allowed for 5 min incubation at 95 °C. After cooling, 3 µl of alkylation buffer (100 mM iodoacetamide) were added and samples were incubated in the dark at room temperature for 20 min. Then, 2 µl trypsin were added and the probes were incubated overnight at 37 °C.

2.6. LC-HRMS

Peptides obtained from digestion (3 µl) were separated using an acetonitrile gradient (from 4 to 60 %, in 0.1 % formic acid) at a flow rate of 300 nL/min for 190 min on a reverse phase Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 column (75 µm × 25 cm, 2 µm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoLC system coupled to a QExactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was utilized for the analysis. The

spectrometer was run in a data-dependent MS/MS mode using survey scans with resolutions of 70,000 at 200 m/z in MS mode and 17,500 at 200 m/z in MS2. Spectra were captured in the positive mode, scanning in the range from 300 to 2000 m/z. Protein identification was carried out using the UniProt yeast database (version 2020.04, which contains 6645 sequence entries), with an accuracy tolerance of 10 ppm for peptide masses and 0.08 Da for fragment ion masses.

Each dataset's raw data was imported into Protein Discoverer v.2.2 (Thermo Fisher Scientific). The Mascot engine (Matrix Science, Boston, USA) was utilized to conduct database searches for protein identification and quantification. Protein was considered positively identified if both search engines found at least two peptides per protein and a peptide score exceeded the significance level FDR = 0.01 (as determined by the Percolator method). The abundance of identified proteins was estimated in the Proteome Discoverer using the Precursor Ions Area detector node (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), which calculates a protein's abundance based on the average intensity of the three most intense distinct peptides for that protein, with further normalization to the total ion current. The data was exported in ASCII format for further investigation.

2.7. LC-HRMS data analysis

For protein stoichiometry, the mass spectrometry results were analyzed using a Perseus 2.0.11.0. For proteins with both paralogs detected, the results from both paralogs were summed for further analysis. Statistically significant differences between the control and tested abiotic stress conditions were determined using one-way ANOVA.

For A/B paralog ratios the mass spectrometry results were analyzed using a method described in [22]. The selection and integration for peptide quantification were performed using unique peptides differentiating duplicated ribosomal proteins (RPs). Normalization across samples was conducted using a pool of 33 peptides from 11 distinct ribosomal proteins. Statistically significant differences of paralogs A and B ratios in tested conditions were determined based on the results of one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Protein stoichiometric heterogeneity of yeast ribosomes during stress

We identified a total of 74 distinct ribosomal proteins within *S. cerevisiae* ribosomes: 31 from the small ribosomal subunit (RPS) and 43 from the large subunit (RPL), with the LC-HRMS means (Fig. 1). Protein stoichiometry analysis revealed that 22 ribosomal proteins displayed statistically significant differential abundances within the ribosomes during stress conditions: 14 RPS and 8 RPL, mostly localized at the outer core of the ribosome (Fig. 2).

Among stress conditions examined, high salt stress exhibited the most pronounced effects on the ribosome composition (Table 1), leading to increased levels of 3 ribosomal proteins from the large ribosomal subunit, with the most prominent effects observed for RPL42/eL42 (1.70-fold change when compared to the control group, $p = 0.0034$). High salt stress also affected 39 % of the small subunit ribosomal proteins, leading to lower incorporation of these RPs into the ribosomes. The most prominent effects were observed for RPS30/eS30 (0.35-fold change when compared to the control group, $p = 0.0479$).

Nine ribosomal proteins were assembled into the ribosomes in increased amounts in stress conditions compared to the control group: 1 RPS and 3 RPL during heat shock, 1 RPL during cold shock, 1 RPS and 1 RPL during sugar starvation, and 2 RPS in hyperosmotic stress. These differences ranged from 1.17-fold change for RPL14/eL14 during sugar starvation ($p = 0.0332$) to 1.46-fold change for RPL40/eL40 during heat shock ($p = 0.0479$). It is important to note here that changes in the protein composition affect only a fraction of the ribosomes, which diminishes the levels of changes when analyzing the entire ribosome

population together.

3.2. Differential incorporation of protein paralogs to yeast ribosomes during abiotic stress

Within 74 identified distinct ribosomal proteins in *S. cerevisiae* ribosomes we detected 21 (of the 57 expected) distinguishable pairs of paralogs (A and B), with the LC-HRMS means and revealed significant differences in the ratios of 7 paralog proteins under almost all stress conditions, except amino acid starvation, compared to the control group (optimal yeast growth conditions). For the ribosomal proteins that exhibited significant differences in paralog ratios under stress conditions, we observed that in the control group RPL14/eL14, RPL22/eL22, and RPS29/uS14 appeared within yeast ribosomes mostly in the form of a paralog A (in 69.19 %, 95.83 %, and 81.60 % of the ribosomes, respectively, Fig. 3). On the other hand, ribosomal proteins RPL16/uL13, RPS1/eS1, RPS7/eS7, and RPS9/uS4 appeared within yeast ribosomes mostly in the form of a paralog B (in 68.32 %, 52.05 %, 69.75 %, and 92.63 % of the ribosomes, respectively, Fig. 3).

Under stress conditions, significant alterations in the ratios of ribosomal paralog proteins were observed (Fig. 3). The most prominent difference, when compared to the control group, was observed for the small ribosomal subunit protein RPS7/eS7, which displayed a 33.46 % increase in the ratio of paralog A to paralog B (A/B) during heat shock (A/B = 63.71 %/36.29 %, $p = 0.0059$). Other ribosomal proteins, for which a significant change in paralogs A/B ratio was observed during stress include: RPL14/eL14 (high salt conditions), RPL16/uL13 (high salt conditions, cold shock, anaerobic stress, high pH stress, sugar starvation, and hyperosmotic shock), RPL22A/eL22A (hyperosmotic shock), RPS1A/eS1A (sugar starvation), RPS9A/uS4A (high pH stress and hypoosmotic shock), and RPS29A/uS14A (UV stress).

3.3. Changes in translation activity of yeast ribosomes during stress

Since we found that multiple stress conditions do influence the 80S ribosome composition, we speculated that the global translational activities might also be affected. We have therefore investigated the kinetics of polysome redistribution upon stress conditions using the translation inhibitor cycloheximide, which is known to stall elongating ribosomes. Extracts from *S. cerevisiae* subjected to 11 growth conditions were examined on polysome gradients to detect monosome and polysome levels. During optimal *S. cerevisiae* growth conditions a profile included an accumulation of multiple ribosomes bound to mRNAs (polysomes) toward the bottom (45 %) of the gradient. Subjection of yeast to multiple stress conditions resulted in a depletion of polysomes and an increase in the monosome peak compared to the control conditions (Fig. 4). This was observed especially after UV exposure and during sugar starvation, where a redistribution of polysomes into the 80S peak was almost complete. Less prominent, but still visible decrease in the polysomes was observed also for cold shock, high salt, anaerobic conditions, and amino acid starvation. High pH, hypo-, and hyper-osmotic conditions did not change significantly the polysome profiles compared to the control. Only one stress (heat shock) resulted in a significant increase in the polysome traces.

These observations were further supported with the analysis of the polysome to monosome ratio (P/M, Fig. 5A). During *S. cerevisiae* growth under stress conditions the P/M ratio was drastically lowered under UV exposure (P/M = 0.1, $p = 0.0000$) and during sugar starvation (P/M = 0.1, $p = 0.0000$) in relation to the control conditions (P/M = 1.0). Significantly lower P/M than in the control was also observed for cold shock (P/M = 0.7, $p = 0.0000$), high salt (P/M = 0.7, $p = 0.0002$), amino acid starvation (P/M = 0.5, $p = 0.0000$), and anaerobic conditions (P/M = 0.4, $p = 0.0000$). Polysome to monosome ratio did not change significantly under high pH (P/M = 1.0, $p = 0.2263$), hypo- (P/M = 0.9, $p = 0.0640$), and hyper-osmotic conditions (P/M = 0.9, $p = 0.0679$). After application of the heat shock a significant increase in the polysome

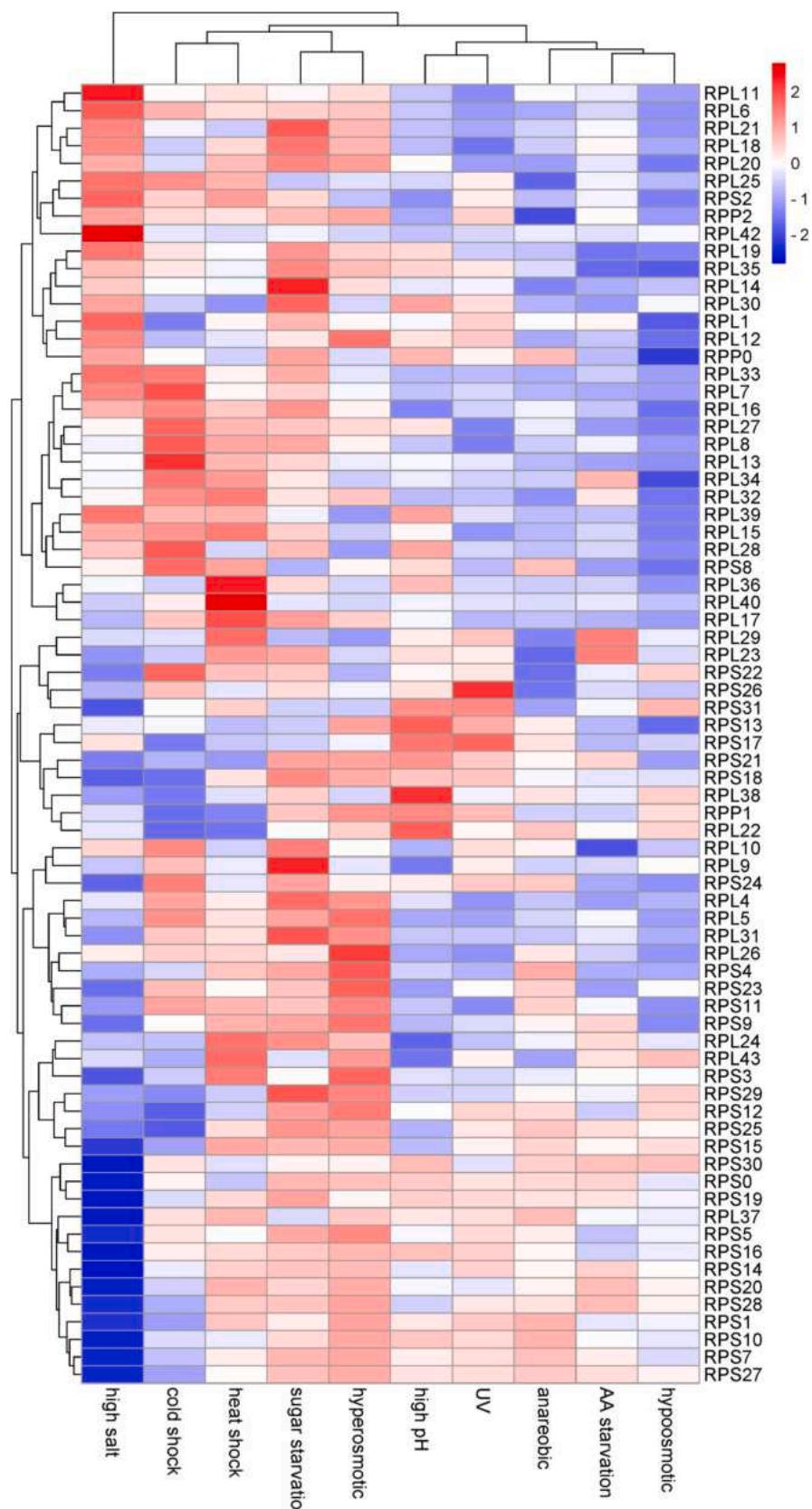


Fig. 1. Global pattern of differential stoichiometry among ribosomal proteins within the ribosomes from *S. cerevisiae* across different growth conditions. Clustered heat map representing the variations in ribosomal proteins abundance within the ribosomes among yeast growth conditions. The color scale (red – blue) encodes for the normalized Z-scores calculated within the rows of the matrix, representing deviation of abundance of a given ribosomal protein in a given condition from the mean abundance of a given ribosomal protein.

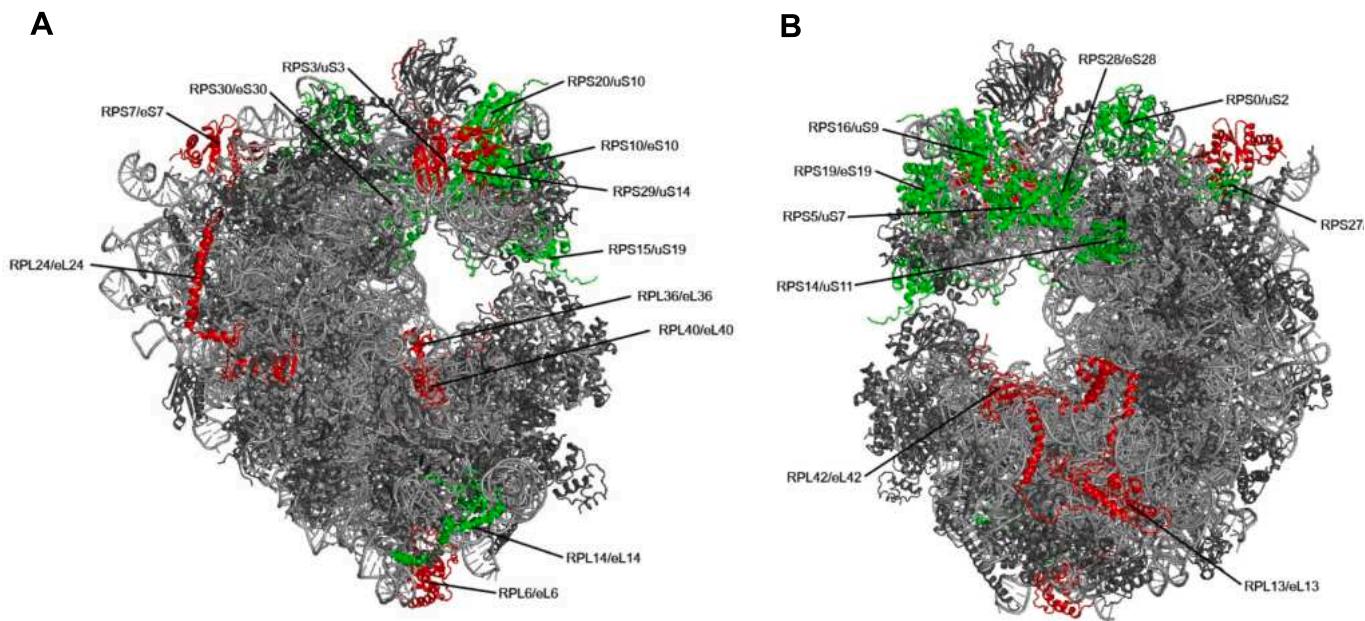


Fig. 2. Location of identified ribosomal proteins within the ribosome structure.

The figure shows the ribosome from the perspective of A) the entry side and B) the mRNA exit tunnel. Ribosomal proteins showing heterogeneity are shown in green (increased abundance) and red (decreased abundance). The remaining proteins are marked in dark gray. rRNA is marked in gray. The ribosome structure was retrieved from RCSB PDB (entry: 4 V88).

Table 1
Stoichiometric alterations in ribosomal proteins.

The table displays ribosomal protein (RP) levels within the ribosomes in *S. cerevisiae* subjected to different growth conditions, in relation to the control group (optimal yeast growth conditions), which was set as 1.0. Only ribosomal proteins with statistically significant differences are presented. Data are extracted from Fig. 1.

Stress condition	RP	RP level	p-Value
Heat shock	RPS3/uS3	1.18	0.0427
	RPL24/eL24	1.20	0.0398
	RPL36/eL36	1.21	0.0485
	RPL40/eL40	1.46	0.0479
	RPL13/eL13	1.19	0.0331
Cold shock	RPS0/uS2	0.75	0.0008
	RPS5/uS7	0.81	0.0151
	RPS7/eS7	0.75	0.0134
	RPS10/eS10	0.78	0.0044
	RPS14/uS11	0.68	0.0002
High salt	RPS15/uS19	0.69	0.0016
	RPS16/uS9	0.79	0.0382
	RPS19/eS19	0.71	0.0013
	RPS20/uS10	0.74	0.0007
	RPS27/eS27	0.74	0.0150
Sugar starvation	RPS28/eS28	0.79	0.0168
	RPS30/eS30	0.35	0.0479
	RPL1/uL1	1.24	0.0121
	RPL6/eL6	1.17	0.0048
	RPL42/eL42	1.70	0.0034
Hyperosmotic stress	RPS29/uS14	1.39	0.0352
	RPL14/eL14	1.17	0.0332

to monosome ratio was observed when compared to the optimal conditions ($P = 1.4$, $p = 0.0000$).

The rate of protein synthesis in a physiological context was further measured by ^{35}S -methionine incorporation *in vivo* into newly synthesized proteins to confirm that the redistribution in polysomes was associated with an inhibition of protein synthesis (Fig. 5B). Yeast spheroplasts incorporated ^{35}S -methionine linearly during optimal

growth conditions ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 5492$). However, upon transfer to stress medium, there was an almost complete inhibition of further ^{35}S -methionine incorporation under UV exposure ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 139$, $p = 0.0000$), and during sugar starvation ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 194$, $p = 0.0000$). Significantly lower incorporation of ^{35}S -methionine into the translatome of yeast spheroplasts than in the control conditions was observed for cold shock ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 2013$, $p = 0.0000$), high salt ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 2937$, $p = 0.0001$), anaerobic conditions ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 2338$, $p = 0.0000$), and amino acid starvation ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 2696$, $p = 0.0001$). The efficiency of metabolic labeling did not change significantly under high pH ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 4685$, $p = 0.0640$), hypo- ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 4684$, $p = 0.0605$), and hyperosmotic conditions ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 4720$, $p = 0.0583$). After application of the heat shock a significant increase in translational activity was observed when compared to the optimal conditions ($\text{CPM}_{\text{mean}} = 10,146$, $p = 0.0005$).

4. Discussion

In this study, we utilized Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry to monitor alterations in the composition of the yeast ribosomes. We observed these changes when yeast cells shifted from growing under control conditions to stress conditions. By employing proteomic method based on the relative quantitation, we were able to both identify and measure the variations in ribosomal proteins, which included paralogs. Following the observation that multiple stress conditions do influence the 80S ribosome composition, we proved that the global translational activities are also affected, most probably due to the polysome redistribution upon stress conditions.

Previous works already described the protein stoichiometry in the ribosome composition in several organisms. Study on human H7 embryonic stem cells and on a mouse model reported a strict selection and a dynamic stoichiometry of 31 RPs at the surface and near the mRNA entry and exit tunnels of polysomes during the progression of differentiation. A total of 14 of these RPs showed at least 10 % change relative to the undifferentiated hESC, including RPL10A/uL1, RPL38/eL38, RPL11/uL5, RPS25/eS25, RPS7/eS7 in mice, and RPS25/eS25, RPS10/eS10 in humans [23,24]. Of all these RPs, we have found prominent

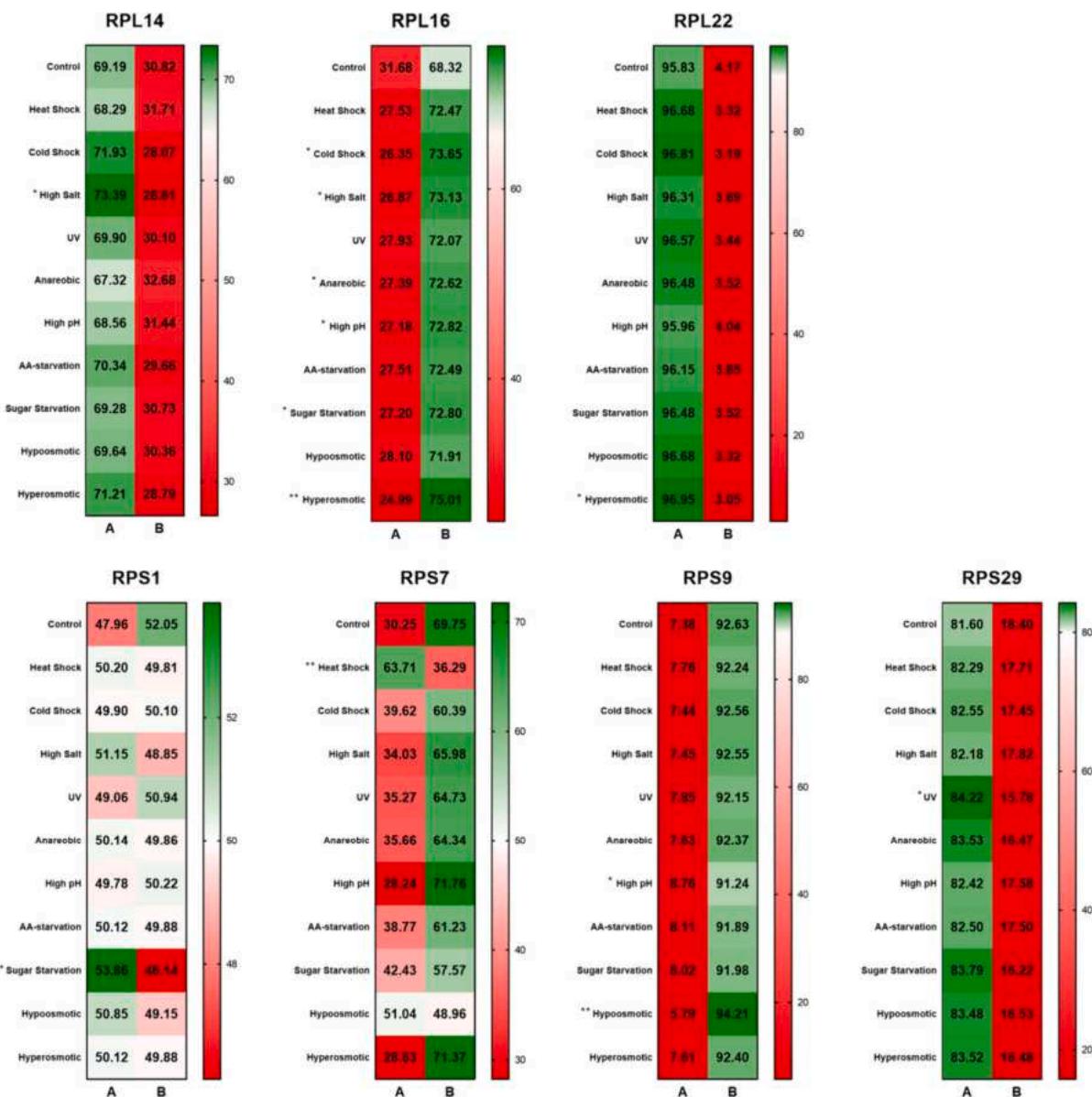


Fig. 3. Ribosomal proteins paralogs A and B ratios across different stress conditions.

Heatmaps represent the percentage contribution of paralogs A and B across different conditions. The color gradient ranges from green to red (indicating a higher and lower percentage of a paralog). Statistically significant differences between the contributions of paralogs A and B are indicated (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

stoichiometry changes of two proteins from the small ribosomal subunit in the present study: RPS7/eS7 and RPS10/eS10. The levels of both of them were significantly lower during high salt stress within yeast ribosomes.

Distinct functions of individual RPs are also affirmed by the functional distinctions observed among RP paralogs [25]. Despite nearly identical amino acid compositions resulting from gene duplication, these paralogs exhibit variations in their expression levels, and - in the context of ribosome heterogeneity - their knockout causes different phenotypes [26]. Usually, under optimal physiological conditions, one member of the paralog pair is dominantly expressed and referred to as the major paralog, while its counterpart, the minor paralog, is expressed under specific conditions. Paralogs may demonstrate preferences for different subsets of mRNAs, thereby serving diverse roles. For instance, in a typical environment, the major paralog of RPL7/uL30 functions as a ribosomal constituent in yeast. However, when exposed to the drug staurosporine, the minor paralog suppresses the major one of RPL7/

uL30. This suppression contributes to the upregulation and translation of long mRNAs associated with cell-wall-related proteins, thereby playing a role in drug resistance [24,27,28]. Gaining resistance to unfavorable growth conditions through incorporation of RPL paralogs might also be the case in our study, since we observed prominent changes in the choice of seven paralogs for ribosome assembly during stress conditions. In all cases this change was statistically significant, reaching up to 6 %. However, in case of RPS7/eS7, the A/B paralog ratio changed >33 % in favor to paralog A during elevated temperature stress. These data suggest yeast cells have a differential requirement for RPS7/eS7A and RPS7/eS7B under the two growth conditions.

There are several techniques allowing for quantitation of proteins in complex mixtures using mass spectrometry-based approach. Methods that are widely used require stable isotope protein labeling for relative quantitation (SILAC). As an example, phosphotyrosine (pTyr) proteomes have been analyzed in cell cultures with the SILAC approach to characterize pTyr-dependent signaling pathways [29]. However, SILAC is

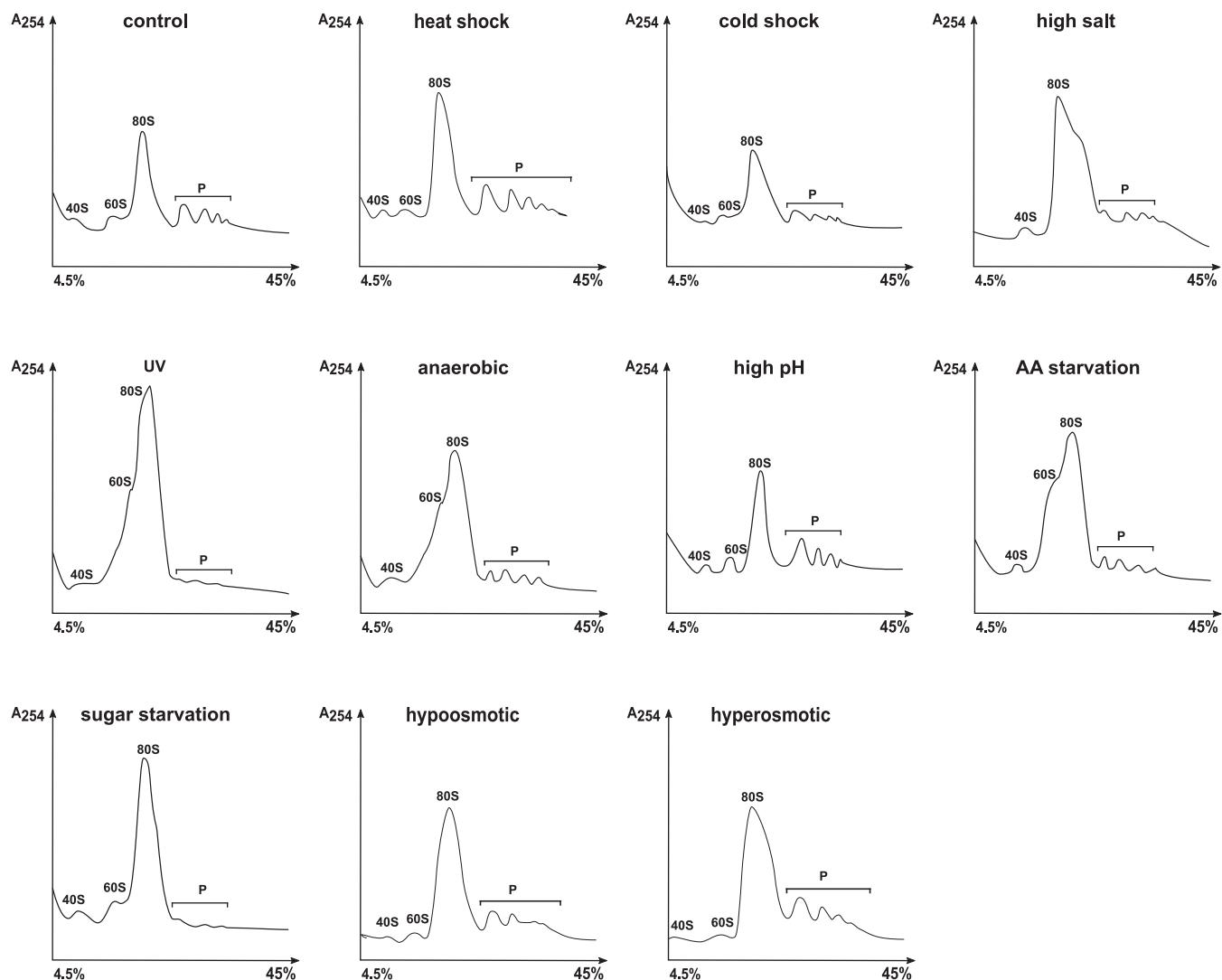


Fig. 4. Polysome profiles in *S. cerevisiae* subjected to stress conditions. The peaks that contain the small ribosomal subunit (40S), the large ribosomal subunit (60S), and both subunits (80S) are indicated. The polysome (P) peaks are bracketed.

limited to cell cultures only and to direct comparison of only two-three samples. Additionally, as quantitation is based on analysis of spectra on MS1 level, their complexity is doubled, which further results in signal suppression. Other techniques such as isobaric labeling (iTRAQ or TMT) allow for sample multiplexing (up to 18 samples in one run) but are expensive and limited only to MS2 analysis, which implies that not all mass analyzers are suited for such analysis [30]. Therefore, we decided to use a bottom-up approach with a label-free quantitation which allows for both identification of ribosomal proteins and relative quantitation of selected peptides. The LC-HRMS method is widely used and can be applied to analyze material from various organisms. The advantage is simultaneous high sensitivity qualitative and quantitative analysis of the samples. So far, the LC-HRMS has been successfully used, e.g., to determine the molecular weight of the ions [31], to detect and quantify cannabinoids and their metabolites in human plasma [32], to determine mycotoxins in pigs and chickens [33], and in pharmacokinetic studies of dried blood spots from rats [34].

When it comes to the ribosome proteomics, the heterogeneity of the ribosome composition has been demonstrated in several organisms. An early study from 1996 analyzed protein components of the small ribosomal subunits from Rat-1 fibroblasts with the means of LC MS/MS [35]. Louie et al. identified 32 ribosomal proteins, of which 4 had more than one mass, which indicated their heterogeneity. In a subsequent study

from 2001, Richard Smith group used LC/FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with capillary reverse-phase liquid chromatography) to characterize intact proteins from yeast large ribosomal subunit [36]. One year later, Karpova et al. identified 22 RPs from large cytoplasmic subunits of human ribosomes and in 11 RPs detected possible post-translational modifications [37]. In the following years, mass spectrometry was used to identify proteins from human small ribosomal subunits in the IRES-bound complex [38], and the whole ribosome composition in mouse embryonic stem cells [39].

Only one study so far aimed at identification of changes in the ribosome protein compositions using mass spectrometry in *Saccharomyces cerevisiae*. The study was conducted by Joachim Frank and Andrew J. Link groups [40], and aimed at ribosome proteomics analysis when shifting from fermentable glucose to the non-fermentable glycerol carbon source. This analysis identified 75 RPs in the 80S complexes, and the following were differentially present in the purified ribosome complexes from yeast cells shifted from glucose to glycerol: RPL3/uL3, RPL5/uL5, RPL8/eL8, RPS1/eS1, RPS2/uS2, RPS5/uS5, RPP0/P1, and RACK1. In our studies we also observed similar stoichiometric changes in levels of RPS5/uS5 (downregulation) ribosomal protein in the ribosome complexes from yeast cells shifted from low to high salt conditions. This could suggest a universal role of incorporation of RPS5/uS5 into the ribosome complexes during adaptation of yeast cells to different stress

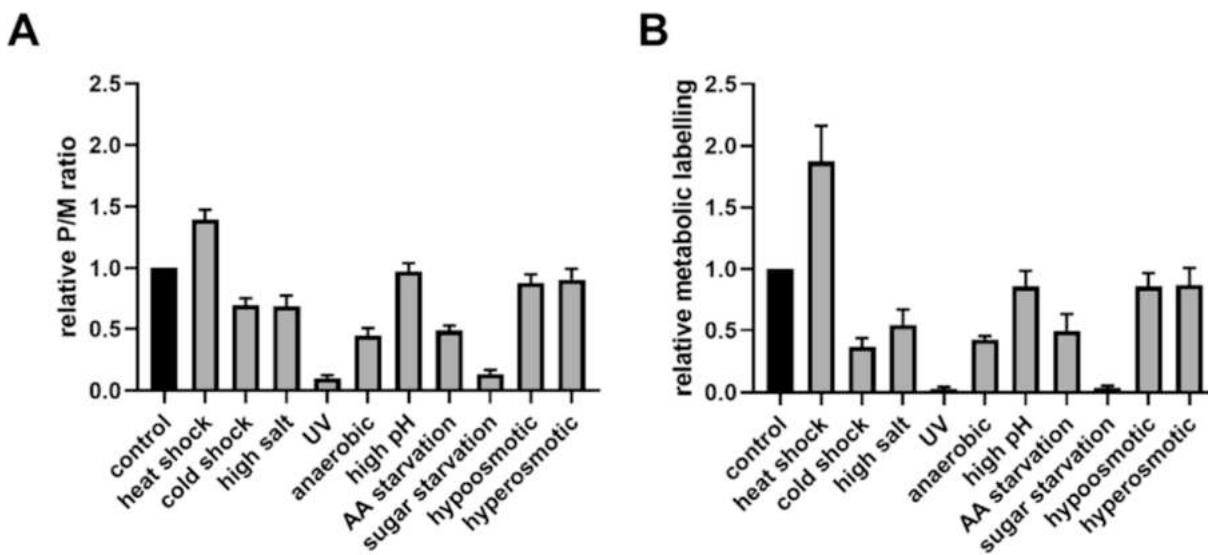


Fig. 5. Translation activity in *S. cerevisiae* subjected to stress conditions. (A) Polysome to monosome (P/M) ratio in relation to control conditions is presented. P/M in optimal growth conditions (control) was set as 1.0 and results obtained in yeast subjected to stress conditions were compared to this value. (B) Incorporation of ^{35}S -methionine into the translome of yeast spheroplasts presented as relative metabolic labeling. The efficiency of metabolic labeling in optimal growth conditions (control) was set as 1.0 and results obtained in yeast subjected to stress conditions were compared to this value.

stimuli.

The last decades has seen the discovery of a number of characteristics defining the control of protein biosynthesis rates in all kingdoms of life [41]. Such mechanisms are of crucial importance in situations where an immediate response to an environmental stress is key for survival. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as single-celled, non-motile organism, must dynamically regulate the protein biosynthesis rates in order to respond to diverse stresses. This study reveals the existence of two layers of such regulation in *S. cerevisiae* during unfavorable environmental conditions: generation of heterogeneous ribosomes via differences in composition of RPs and differential incorporation of RP paralogues.

The most important question raised by the recent direct evidence of ribosome heterogeneity is what is the function of ribosomes that are distinct with respect to either protein or rRNA content? An important functional role of ribosome heterogeneity has been established as the ability of certain RPs to specialize the ribosome for the translation of particular mRNAs, e.g., ribosomes containing RPS25/eS25 or RPL10a/uL1, but not RPL22/eL22, were found to preferentially translate distinct sets of mRNAs. Our observations that different ribosome composition in response to external perturbations regulates global protein biosynthesis levels suggest that there are likely to be many more functions attributable to ribosome heterogeneity. These findings provide a novel layer of regulation to gene expression, enabling coordinate networks of genes to be simultaneously tuned at the level of translation.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland (2017/27/B/NZ1/01416 to KG).

CRediT authorship contribution statement

Piotr J. Pietras: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Anna Wasilewska-Burczyk:** Writing – review & editing, Data curation. **Kamilla Pepłowska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Data curation. **Lukasz Marczak:** Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis. **Agata Tyczewska:** Writing – review & editing, Formal analysis. **Kamilla Grzywacz:** Writing – review & editing, Writing – original

draft, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Kamilla Grzywacz reports financial support was provided by National Science Centre Poland. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] M.M. Yusupov, G.Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T.N. Earnest, J.H. Cate, H.F. Noller, Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science* 292 (2001) 883–896, <https://doi.org/10.1126/science>.
- [2] B.S. Schuwirth, M.A. Borovinskaya, C.W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, J.H. Cate, Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution, *Science* 310 (2005) 827–834, <https://doi.org/10.1126/science.1117230>.
- [3] M. Selmer, C.M. Dunham, F.V. Murphy 4th, A. Weixlbaumer, S. Petry, A.C. Kelley, J.R. Weir, V. Ramakrishnan, Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA, *Science* 313 (2006) 1935–1942, <https://doi.org/10.1126/science.1131127>.
- [4] A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H.F. Noller, Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements, *Cell* 126 (2006) 1065–1077, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.032>.
- [5] A. Ben-Shem, L. Jenner, G. Yusupova, M. Yusupov, Crystal structure of the eukaryotic ribosome, *Science* 330 (2010) 1203–1209, <https://doi.org/10.1126/science.1194294>.
- [6] S. Melnikov, J. Mailiot, B.S. Shin, L. Rigger, G. Yusupova, R. Micura, T.E. Dever, M. Yusupov, Crystal structure of Hypusine-containing translation factor eIF5A bound to a rotated eukaryotic ribosome, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 3570–3576, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.011>.
- [7] J. Rabl, M. Leibundgut, S.F. Ataide, A. Haag, N. Ban, Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1, *Science* 331 (2011) 730–736, <https://doi.org/10.1126/science.1198308>.
- [8] S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, N. Ban, Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6, *Science* 334 (2011) 941–948, <https://doi.org/10.1126/science.111204>.
- [9] S. Melnikov, A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, L. Jenner, G. Yusupova, M. Yusupov, One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 560–567, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>.
- [10] S. Bortoluzzi, F. d'Alessi, C. Romualdi, G.A. Danieli, Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues, *Bioinformatics* 17 (2001) 1152–1157, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1152>.
- [11] S. Ramagopal, H.L. Ennis, Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 3083–3087, <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.3083>.

- [12] S. Lilleorg, K. Reier, A. Pulk, A. Liiv, T. Tammsalu, L. Peil, J.H.D. Cate, J. Remme, Bacterial ribosome heterogeneity: changes in ribosomal protein composition during transition into stationary growth phase, *Biochimie* 156 (2019) 169–180, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.013>.
- [13] T.C. Fleischer, C.M. Weaver, K.J. McAfee, J.L. Jennings, A.J. Link, Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes, *Genes Dev.* 20 (2006) 1294–1307, <https://doi.org/10.1101/gad.1422006>.
- [14] N. Kondrashov, A. Pusic, C.R. Stumpf, K. Shimizu, A.C. Hsieh, J. Ishijima, T. Shiroishi, M. Barna, Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning, *Cell* 145 (2011) 383–397, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.028>.
- [15] M. Kellis, B.W. Birren, E.S. Lander, Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 428 (2004) 617–624, <https://doi.org/10.1038/nature02424>.
- [16] S. Komili, N.G. Farny, F.P. Roth, P.A. Silver, Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression, *Cell* 131 (2007) 557–571, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037>.
- [17] K. Bakowska-Żywcka, A.M. Mleczko, M. Kasprzyk, P. Machtel, M. Żywcka, T. Twardowski, The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Open Bio* 6 (2016) 1186–1200, <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12127>.
- [18] A.M. Mleczko, P. Machtel, M. Walkowiak, A. Wasilewska, P.J. Pietras, K. Bakowska-Żywcka, Levels of sdRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression, *Sci. Rep.* 9 (2019) 18397, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54924-2>.
- [19] H.C. Causton, B. Ren, S.S. Koh, C.T. Harbison, E. Kanin, E.G. Jennings, T.I. Lee, H. L. True, E.S. Lander, R.A. Young, Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 323–337, <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.323>.
- [20] A.M. Mleczko, P. Celichowski, K. Bakowska-Żywcka, Transfer RNA-derived fragments target and regulate ribosome-associated aminoacyl-transfer RNA synthetases, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 9399 (2018) 30380–2, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.06.001>.
- [21] K. Bakowska-Żywcka, M. Kasprzyk, T. Twardowski, tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis in vitro, *FEMS Yeast Res.* 16 (2016) fow077, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow077>.
- [22] M.M. Ghulam, M. Catala, S. Abou Elela, Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 1954–1968, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1183>.
- [23] N.R. Genuth, Z. Shi, K. Kunimoto, V. Hung, A.F. Xu, C.H. Kerr, G.C. Tiu, J.A. Oses-Prieto, R.E.A. Salomon-Shulman, J.D. Axelrod, A.L. Burlingame, K.M. Loh, M. Barna, A stem cell roadmap of ribosome heterogeneity reveals a function for RPL10A in mesoderm production, *Nat. Commun.* 13 (2022) 5491, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33263-3>.
- [24] R.A. Islam, C. Rallis, Ribosomal biogenesis and heterogeneity in development, Disease, and Aging, *Epigenomes*. 7 (2023) 17, <https://doi.org/10.3390/epigenomes7030017>.
- [25] J.E. Gerst, Pimp my ribosome: ribosomal protein paralogs specify translational control, *Trends Genet.* 34 (2018) 832–845, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.08.004>.
- [26] K.L. McCann, S.J. Baserga, Genetics, Mysterious ribosomopathies, *Science*. 341 (2013) 849–850, <https://doi.org/10.1126/science.1244156>.
- [27] H. Guo, Specialized ribosomes and the control of translation, *Biochem. Soc. Trans.* 46 (2018) 855–869, <https://doi.org/10.1042/BST20160426>.
- [28] M. Malik Ghulam, M. Catala, G. Reulet, M.S. Scott, S. Abou Elela, Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance, *Nat. Commun.* 13 (2022) 4938, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32717-y>.
- [29] G. Zhang, T.A. Neubert, Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for phosphotyrosine protein identification and quantitation, *Methods Mol. Biol.* 527 (2009) 79–92, https://doi.org/10.1007/978-1-60327-834-8_7.
- [30] K. Aggarwal, L.H. Choe, K.H. Lee, Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags, *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5 (2006) 112–120, <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell018>.
- [31] J. Aceña, S. Stampachiacchiere, S. Pérez, D. Barceló, Advances in liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6289–6299, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8852-6>.
- [32] M.K. Mohamed, J. Takyi-Williams, B. Baudot, A. Grobler, Development and validation of a LC-HRMS method for the quantification of cannabinoids and their metabolites in human plasma, *Eur. J. Pharm. Sci.* 159 (2021) 105705, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105705>.
- [33] M. Lauwers, S. De Baere, B. Letor, M. Rychlik, S. Croubels, M. Devreese, Multi LC-MS/MS and LC-HRMS methods for determination of 24 mycotoxins including major phase I and II biomarker metabolites in biological matrices from pigs and broiler chickens, *Toxins (Basel)* 11 (2019) 171, <https://doi.org/10.3390/toxins11030171>.
- [34] B. Ramesh, P.R. Rao Vadaparthi, G. Sukumar, N. Manjula, K. Suresh Babu, P. Sita Devi, LC-HRMS determination of piperine on rat dried blood spots: a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 18–23, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.002>.
- [35] D.F. Louie, K.A. Resing, T.S. Lewis, N.G. Ahn, Mass spectrometric analysis of 40 S ribosomal proteins from Rat-1 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28189–98. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28189>.
- [36] S.W. Lee, S.J. Berger, S. Martinović, L. Pasa-Tolić, G.A. Anderson, Y. Shen, R. Zhao, R.D. Smith, Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5942–5947, <https://doi.org/10.1073/pnas.082119899>.
- [37] T.I. Odintsova, E.C. Müller, A.V. Ivanov, T.A. Egorov, R. Bienert, S.N. Vladimirov, S. Kostka, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, G.G. Karpova, Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing, *J. Protein Chem.* 22 (2003) 249–258, <https://doi.org/10.1023/a:1025068419698>.
- [38] Y. Yu, H. Ji, J.A. Doudna, J.A. Leary, Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes, *Protein Sci.* 14 (2005) 1438–1446, <https://doi.org/10.1110/ps.041293005>.
- [39] Z. Shi, K. Fujii, K.M. Kovary, N.R. Genuth, H.L. Röst, M.N. Teruel, M. Barna, Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide, *Mol. Cell* 67 (2017) 71–83.e7, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>.
- [40] P. Samir, C.M. Browne, M. Rahul, B. Sun, W. Shen, J. Li, A.J. Link Frank, Identification of changing ribosome protein compositions using mass spectrometry, *Proteomics* 18 (2018) e1800217, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800217>.
- [41] N.R. Genuth, M. Barna, The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life, *Mol. Cell* 71 (2018) 364–374, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>.

Piotr J. Pietras
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w publikacji pt. „Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity”, opublikowanej w: International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 268(Pt2):132004, autorstwa: Pietras PJ, Wasilewska-Burczyk A, Pepłowska K, Marczak Ł, Tyczewska A, Grzywacz K, która stanowi część mojej pracy doktorskiej, polegał na wykonaniu badań i analiz (indukcja warunków stresowych, profilowanie polisomowe, izolacja rybosomów, przygotowanie próbek do analiz LC/HRMS), analizie danych, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.

Piotr J. Pietras


Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN



dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN
Pracownia Modelowych Organizmów Bezkręgowych

Poznań, 1.03.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Jak autor korespondencyjny w publikacji pt. „Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity”, opublikowanej w: International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 268(Pt2):132004, autorstwa: Pietras PJ, Wasilewska-Burczyk A, Pepłowska K, Marczak Ł, Tyczewska A, Grzywacz K, oświadczam, że udział Piotra J. Pietrasa w w/w publikacji polegał na wykonaniu badań i analiz (indukcja warunków stresowych, profilowanie polisomowe, izolacja rybosomów, przygotowanie próbek do analiz LC/HRMS), analizie danych, przygotowaniu tabel i rysunków oraz pierwszej wersji publikacji.



Kamila Grzywacz