

DISS. ETH NO. 29885

MOLECULAR MECHANISMS BALANCING RIBOSOME BIOGENESIS AND DEGRADATION

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)**

Presented by

ELIANA BIANCO

M.Sc. in Biotecnologie Molecolari e Bioinformatica
Università degli Studi di Milano

Born on 4th July 1991

accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter
Prof. Karsten Weis
Prof. Vikram G. Panse
Prof. David Shore

2024

Abstract

The genetic information encoded by DNA and transmitted to mRNA in a four-letter code is translated into proteins using a twenty-letter code by molecular factories called ribosomes.

Ribosomes are complex assemblies of RNA and proteins and govern cell growth rate. Ribosomes are assembled by a multi-step and highly regulated process that involves synthesis and assembly of RNA and ribosomal proteins, facilitated by ribosome assembly factors and non-coding RNAs. Such process is referred to as ribosome biogenesis. Ribosomes are also subject to degradation for recycling nucleotides and amino acids during nutrient starvation, stress or ribosomal defects. Ribosome abundance is determined by both ribosome biogenesis and ribosome degradation. Ribosome homeostasis process controls abundance of ribosomes and is crucial for cellular growth and maintenance. The molecular mechanisms governing ribosome biogenesis, degradation and the regulatory pathways of ribosome homeostasis are not well understood.

In this study, we developed a tool to *in vivo* mark and isolate old ribosomes from starving cells. Our adaptable and scalable system, based on biotin pulse and chase, is suitable for biochemical studies and can be applied to various experimental conditions, as well as it can be applied to various experimental conditions. The *in vivo* pulse chase biotinylation system enables the investigation of ribosome protection and degradation mechanisms.

To investigate the molecular mechanisms of ribosome biogenesis and degradation, we focused on an evolutionarily conserved yeast ribosome hibernation factor, Stm1, that protects ribosomes from degradation during nutrient starvation. Our findings reveal that Stm1 also functions as a ribosome biogenesis factor and can switch between the two roles depending on the metabolic state of the cell. Furthermore, we identified specific protein domains in Stm1 governing these functions.

In conclusion, our study advances understanding of the fundamental process of ribosome homeostasis and suggests new research directions for comprehending ribosome biogenesis, degradation and their regulation. We propose a broader perspective on ribosome hibernation factors as sensor and guardians of ribosome homeostasis.

Sommario

L'informazione genetica codificata dal DNA e trasmessa all'mRNA in un codice a quattro lettere viene tradotta in proteine utilizzando un codice a venti lettere da macchinari molecolari chiamate ribosomi.

I ribosomi sono particelle di RNA e proteine che regolano il tasso di crescita cellulare. I ribosomi vengono assemblati tramite un processo altamente regolato e a più fasi che prevede la sintesi e l'assemblaggio di RNA e proteine ribosomiali e l'attività di fattori ribosomiali e RNA non codificanti. Tale processo è noto come biogenesi dei ribosomi. I ribosomi sono anche soggetti a degradazione per riciclare nucleotidi e aminoacidi in caso di carenza di nutrienti, stress o difetti ribosomiali. I livelli cellulari di ribosomi dipendono sia dalla biogenesi che dalla degradazione dei ribosomi. Il processo di omeostasi dei ribosomi controlla l'abbondanza dei ribosomi ed è cruciale per la crescita e l'omeostasi cellulare. I meccanismi molecolari alla base della biogenesi ribosomiale e della degradazione dei ribosomi così l'omeostasi dei ribosomi non sono ben compresi.

In questo studio, abbiamo sviluppato un metodo per identificare *in vivo* e isolare i ribosomi vecchi da cellule in carenza di nutrienti. Il nostro sistema, adattabile e scalabile, è basato su un *pulse-chase* di biotina. Questo metodo è adatto per studi biochimici e può essere applicato in varie condizioni sperimentali. Il sistema di biotinilazione *pulse-chase in vivo* consente di indagare i meccanismi di protezione e degradazione dei ribosomi.

Per studiare i meccanismi molecolari della biogenesi e degradazione dei ribosomi, ci siamo concentrati su Stm1, un fattore di ibernazione dei ribosomi presente in lievito e conservato nei processi evolutivi. Questa proteina protegge i ribosomi dalla degradazione in assenza di nutrienti. Le nostre scoperte rivelano che Stm1 funge anche da fattore di biogenesi dei ribosomi e si alterna tra le due funzioni a seconda dello stato metabolico della cellula. Inoltre, abbiamo identificato specifici domini proteici in Stm1 che regolano queste funzioni.

In conclusione, la nostra ricerca avanza la conoscenza del processo fondamentale dell'omeostasi dei ribosomi e suggerisce nuove direzioni di ricerca per comprendere la biogenesi, la degradazione dei ribosomi e la loro regolazione. Inoltre, proponiamo una nuova e più ampia prospettiva riguardo i fattori di ibernazione dei ribosomi come sensori e guardiani dell'omeostasi dei ribosomi.