

Abstract

Polyamines are evolutionarily conserved, positively charged, small organic molecules, made up of two or more amino groups, which are indispensable for normal cellular growth of all organisms ranging from viruses up to humans. They play important roles in different cellular processes such as replication, transcription and translation which involves interaction with negatively charged DNA and RNA moieties in the cell. Putrescine, spermidine and spermine form the major portion of the polycation reservoir in the cell. Ornithine Decarboxylase (ODC) is the rate limiting enzyme for polyamine biosynthesis which decarboxylates ornithine to putrescine. ODC, a potential oncogene, shows elevated levels in rapidly proliferating cells and neoplastic tissues. ODC protein levels are maintained in the cell by its rapid degradation predominantly *via* ubiquitin-independent pathway. This pathway involves another regulatory protein called antizyme (AZ). In previous studies from our lab, it was established that ODC antizyme in yeast (Oaz1) undergoes ubiquitin-dependent degradation. In this study, we verify two previously known E3 ligases, which came up in a genetic screen for proteins involved in Oaz1 degradation, as the *bona fide* ubiquitin ligase of Oaz1. Single gene deletion mutants displayed increased Oaz1 level compared to wild-type cells. Double gene deletion mutants showed even higher stabilization of Oaz1 than single mutants proving that the two ligases are supplementary in their function to degrade Oaz1. Under *in vitro* conditions, both ligase proteins demonstrated specific, non-covalent association with Oaz1, which is inhibited by polyamines. Different deletion variants of one of the ligases indicated that the N terminus of the ligase is important for downregulating its own stability as well as for targeting Oaz1. Ligase-dependent ubiquitylation of Oaz1 could not be achieved *in vitro*. Interestingly, however, Oaz1-induced auto-ubiquitylation activity of the ligase was discovered. *In vivo* experiments established, that fluctuation of Oaz1 levels during the cell division cycle and upon DNA damage are mediated by the ligases indicating that these ligases regulate Oaz1 stability *via* ubiquitin-dependent proteasomal degradation. Surprisingly, ligase levels were down-regulated synchronously with those of Oaz1. These data together with those from the *in vitro* experiments suggested a novel mechanism, in which ligase activation and/or substrate targeting eventually trigger ligase degradation.

In a distinct set of experiments, decoding of human antizyme (AZ1) mRNA was studied in the yeast model system. Ribosomal frameshifting (RFS) could only be observed after replacing the penultimate serine sense codon ORF1 to a GCG alanine codon, which is recognised by a near-cognate tRNA in yeast. This modified AZ1 version displayed polyamine-dependent regulation of RFS. However, much lower polyamine levels led to an induction of RFS for AZ1 in comparison to yeast Oaz1. Further experiments suggested, similar to what was earlier observed for yeast Oaz1, that the N- and C-terminal parts of the encoded AZ1 polypeptide affect the translational efficiency of antizyme mRNA.

Together, the results of this study provide helpful information towards an understanding of the cellular regulation and homeostasis of antizyme levels by translational and proteolytic mechanisms, which could be valuable in the future in the development of therapeutic strategies to target tumour cells' capacity to synthesize polyamines.

Zusammenfassung

Polyamine sind kleine, evolutionär konservierte, durch zwei oder mehrere Aminogruppen positiv geladene organische Biomoleküle, ohne die zelluläres Wachstum oder Vermehrung aller biologischer Systeme, vom Virus zum Mensch, nicht möglich ist. Polyamine haben wichtige Funktionen in den verschiedensten zellulären Prozessen wie Replikation, Transkription und Translation, wobei sie meist mit negativ geladenen DNA- und RNA-Molekülen interagieren. Putrescin, Spermidin und Spermin bilden einen großen Anteil des Reservoirs an Polykationen einer Zelle. Die Ornithin-Decarboxylase (ODC) ist ein Geschwindigkeits-limitierendes Enzym in der Synthese von Polyaminen. Es decarboxyliert Ornithin zum Diamin Putrescin. ODC ist ein potentiell Oncogen und ist in erhöhten Mengen in schnell proliferierenden Zellen und neoplastischen Geweben zu finden. Die zelluläre ODC-Konzentration wird durch selektive, überwiegend Ubiquitin-unabhängige Proteolyse eingestellt. Eine zentrale Komponente dieses Abbauwegs ist ein regulatorisches Protein, das Antizym (AZ). Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, daß das ODC-Antizym (Oaz1) der Bäckerhefe selbst durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse kontrolliert wird.

In dieser Arbeit konnte nun die Rolle zweier E3-Enzyme, die zuvor in einer genetischen Selektion identifiziert worden waren, als Ubiquitin-Ligasen spezifisch für die Kontrolle von Oaz1 verifiziert werden. Hefestämme mit Einzeldelationen wiesen erhöhte Oaz1-Konzentrationen im Vergleich zum Wild typ auf. Doppeldelations-Mutanten zeigten noch deutlich höhere Oaz1-Mengen, was auf eine synergistische Rolle der beiden Ligasen für den Abbau von Oaz1 hinweist. Durch *In vitro*-Bindungsstudien konnte demonstriert werden, daß beide Proteine spezifisch mit Oaz1 interagieren und dass diese Bindung durch Polyamine gehemmt wird. Verkürzte Varianten einer der Ligasen zeigten, daß N-terminale Domänen eine wichtige Funktion auf der einen Seite für dessen negative Regulation haben und auf der anderen Seite für die Zielsteuerung von Oaz1 erforderlich sind. Ubiquitylierung von Oaz1 konnte zwar nicht *in vitro* rekonstituiert werden. Interessanterweise konnte aber eine Oaz1-stimulierte Autoubiquitylierungs-aktivität der Ligase in diesen Versuchen entdeckt werden.

In vivo-Experiments zeigten, dass die Oaz1-Konzentration während des Zellteilungszyklus und in der Folge von DNA-Schäden fluktuiert und daß Ubiquitin-vermittelte Proteolyse ursächlich für

diese Schwankungen ist. Überraschenderweise konnte beobachtet werden, dass die Konzentration der Ligase synchron mit der des Oaz1-Proteins herunterreguliert wird. Diese Daten deuten, zusammen mit denen aus den *In vitro*-Experimenten, auf einen neuen Mechanismus hin, bei dem die Aktivierung der Ligase oder deren Interaktion mit dem Substrat letztlich auch deren eigenen Abbau auslöst.

In einer weiteren Experimentreihe wurde die Bäckerhefe als Modellsystem verwendet, um die Dekodierung der mRNA des menschlichen Antizym-Gens (AZ1) zu untersuchen. Ribosomale Leserastersprünge (RFS) konnte nur beobachtet werden, wenn das letzte Codon vor dem STOP-Codon von ORF1 in ein GCG-Alanin-Codon mutiert wurde, welches in der Hefe von einer tRNA mit schwach basenpaarendem Anticodon (*non-cognate* tRNA) ausgelesen wird. Die so modifizierte AZ1-Version zeigte dann auch ein Polyamine-Regulation des RFS, wenn auch bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als das Oaz1 der Hefe. Zusätzliche Experimente wiesen darauf hin, dass N- und C-terminale Teile des naszierenden AZ1-Proteins, ähnlich wie zuvor bei Oaz1 beobachtet, einen Einfluss auf die Effizienz der Translation der AZ1-mRNA haben.

Zusammen genommen tragen die Ergebnisse dieser Arbeit hilfreiche Informationen zum Verständnis der zellulären Regulation und der Homöostase der Antizym-Konzentrationen durch translationale und proteolytische Mechanismen bei, welche wertvolle Hinweise für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Hemmung der Polyaminsynthese in Tumorzellen darstellen können