

# Mechanisms regulating ribosomal frameshifting in decoding Ornithine Decarboxylase Antizyme mRNA

## Abstract

ODC antizyme is the conserved non-competitive inhibitor of Ornithine decarboxylase (ODC), the rate limiting enzyme in the biosynthesis of polyamines. Polyamines are essential organic polycations which are indispensable for multiple cellular activities including DNA packaging, transcription, cell division and carcinogenesis. Antizyme mRNA consists of two partially overlapping open reading frames, a short *ORF1* and long *ORF2*. Polyamines mediate the synthesis of functional antizyme by inducing +1 ribosomal frameshifting which bypasses a translational STOP at the end of *ORF1*. Here it is shown that in yeast antizyme (*OAZ1*), the conserved region encompassing the intermittent stop codon (Frameshifting core element, FCE) serves as a unique stretch of mRNA which is capable of mediating constitutive +1 ribosomal frameshifting. Furthermore, we show that the penultimate codon before the intermittent stop codon (GCG), which does not have a cognate tRNA in yeast, is essential for the constitutive frameshifting ability of the FCE. By combination of systematic deletion and mutational analysis we show that, by a rare mechanism, the cis acting repressive signals encrypted in the N terminus of the nascent polypeptide constitutively inhibits the frameshifting capability of the core element. Surprisingly, depending on the cellular polyamine levels, the C terminus of the Orf2 nascent polypeptide modulates frameshifting by inducing ribosome stalling. We show that lower cellular polyamine levels induce ribosome stalling and reduced translation rates while higher polyamine levels induce the release of stalled ribosomes resulting in the complete synthesis of Oaz1. Purified Oaz1 protein binds directly to radio labeled polyamines. Taken together, this suggests that polyamines directly bind to the C-terminal polyamine sensing modulator, resulting in smooth translation and release of the nascent polypeptide, thereby inducing frameshifting. Our data reveal a unique mechanism by which expression of *OAZ1* is regulated co-translationally by a cross talk between two of the nascent Oaz1 peptide elements.

## Zusammenfassung

ODC-Antizym ist der konservierte nicht-kompetitive Inhibitor der Ornithindecaboxylase (ODC), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym in der Polyaminbiosynthese. Polyamine sind essentielle organische Polykationen, die für viele verschiedene zelluläre Prozesse unerlässlich sind, darunter finden sich die Packung der DNA, Transkription, Zellteilung und Karzinogenese. Die Antizym mRNA besteht aus zwei partiell überlappenden offenen Leserastern (ORF), einem kurzen *ORF1* und einem langen *ORF2*. Polyamine bewirken einen ribosomalen +1 Leserastersprung, bei dem das STOP-Codon am Ende von *ORF1* umgangen wird und es somit zur Synthese von funktionalem Antizym kommt. In dieser Arbeit wurde im Antizym von *Saccharomyces cerevisiae* (*OAZ1*) eine konservierte Sequenz um das STOP-Codon (Frame Shift Core Element, FCE) identifiziert, welche die Fähigkeit zu einem konstitutiven +1 ribosomalen Leserastersprung vermittelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das letzte Codon vor dem unterbrechenden STOP (GCG), für das keine passende tRNA in Hefe existiert, essentiell für die Fähigkeit des FCE zum Leserastersprung ist. Durch die Kombination von systematischen Deletionen und Mutationen wurde ein seltener Mechanismus entdeckt: *cis*-wirkende Elemente im N Terminus des naszierenden Polypeptids inhibieren konstitutiv die Fähigkeit des FCE zum Leserastersprung. Überraschenderweise moduliert der C Terminus von *ORF2* des naszierenden Polypeptids den Leserastersprung abhängig von der zellulären Polyaminkonzentration. Es wurde gezeigt, dass bei niedriger Polyaminkonzentration die Ribosomen ins Stocken geraten und die Translationsrate reduziert ist, während bei hoher Polyaminkonzentration die stockenden Ribosomen freigegeben werden und somit die vollständige Synthese von *OAZ1* erfolgt. Aufgereinigtes *OAZ1* Protein kann radioaktiv markierte Polyamine direkt binden. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine direkte Bindung von Polyaminen an einen Polyamin-erkennenden Regulator hin. Dadurch erfolgt eine gleichmäßige Translation und das naszierende Polypeptid wird freigesetzt, wodurch der Leserastersprung induziert wird. In dieser Arbeit wurde ein einzigartiger Mechanismus für die kotranslationale Regulation der Expression von *OAZ1* durch ein Zusammenspiel von zwei Elementen im naszierenden *OAZ1* Peptid enthüllt.