

Abstract

p97 (VCP) is a homo-hexameric triple-A ATPase that exerts a plethora of cellular functions. Heterozygous missense mutations of p97 cause at least five human neurodegenerative disorders. However, the specific molecular consequences of p97 mutations are hitherto widely unknown. Our *in silico* structural models of human and *D. discoideum* p97 showed that the disease-causing R93C, R155H, and R155C as well as R154C, E219K, R154C/E219K mutations of human and *D. discoideum* p97, respectively, are surface exposed amino acid residues. In-gel p97 ATPase activity measurements of p97 monomers and hexamers revealed significant mutation- and species-specific differences. While all human p97 mutations led to a strong increase in ATPase activity, no changes could be detected for the *D. discoideum* R154C mutant, which is orthologous to human R155C. The E219K mutation led to an almost complete loss of activity, which was partially recuperated in the R154C/E219K double-mutant indicating p97 N- and D-interdomain communication. By means of co-immunoprecipitation experiments we identified an UBX-domain containing *D. discoideum* protein as a novel p97 interaction partner. We categorized all eleven UBX-domain containing *D. discoideum* proteins and named the interaction partner UBXD9. Pull-down assays and surface plasmon resonance analyses of *D. discoideum* UBXD9 and the human orthologue TUG/ASPL/UBXD9 demonstrated direct interactions with p97 as well as species-, mutation- and ATP-dependent differences in the binding affinities. Sucrose density gradient experiments revealed that both human and *D. discoideum* UBXD9 proteins very efficiently disassembled wild-type p97, but to a lesser extent mutant p97 hexamers into monomers. Moreover, we generated *D. discoideum* UBXD9 knock-out strains and GST or GFP tagged UBXD9 truncation constructs to further study the UBXD9 dependent p97 function. Irrespective of a very high degree of p97 sequence conservation, our work highlights essential differences in the biochemical properties of *D. discoideum* and human p97 orthologues. Thus, functional data of non-human p97 proteins do not necessarily mirror the human situation and should be interpreted with caution. Furthermore, our work provides evidence that human disease-causing p97 point mutations result in an increased ATPase activity and interfere with the UBXD9-mediated p97 hexamer-monomer equilibrium. Further studies have to address the question whether the late-onset p97 human disease pathology is related to an increased ATPase activity and/or altered UBXD9 protein interactions.

Zusammenfassung

p97 (VCP) ist eine homo-hexamere dreifach-A-ATPase, die in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert ist. Heterozygote Punktmutationen von p97 sind die Ursache von mindestens fünf menschlichen neurodegenerativen Erkrankungen. Jedoch sind die spezifischen molekularen Folgen von p97 Mutationen bisher weitgehend unbekannt. Unsere *in silico* Strukturmodelle von menschlichem und *D. discoideum* p97 zeigten, dass die krankheitsverursachenden R93C, R155H und R155C Mutationen des humanen sowie die R154C, E219K und R154C/E219K-Mutationen des *D. discoideum* p97 oberflächenexponierte Aminosäuren sind. „In-Gel“ ATPase-Aktivitätsmessungen von p97 Monomeren und Hexameren ergaben signifikante mutations- und speziesspezifische Unterschiede. Während alle humanen p97 Mutanten zu einer starken Erhöhung der ATPase-Aktivität führten, konnte keine Veränderung für die *D. discoideum* p97 R154C Mutante nachgewiesen werden, die ein Ortholog der humanen R155C Mutante ist. Die E219K Mutation führte zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität, welche aber zum Teil in der R154C/E219K Doppelmutante wiederhergestellt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die p97 N- und D-Domänen miteinander kommunizieren. Mit Co-Immunpräzipitationstudien identifizierten wir ein UBX-Domäne enthaltendes *D. discoideum* Protein als neuen Interaktionspartner für p97. Wir haben alle elf UBX-Domänen enthaltenden *D. discoideum* Proteine kategorisiert und den Interaktionspartner UBXD9 genannt. „Pulldown-Assays“ und Oberflächen-Plasmonresonanz-Analysen von *D. discoideum* UBXD9 und dem menschliche Ortholog TUG/ASPL/UBXD9 demonstrierten nicht nur direkte Interaktionen mit p97 sondern auch speziess-, mutations- und ATP-abhängige Unterschiede in den Bindungsaffinitäten. Sucrose-Dichtegradienten Studien zeigten, dass menschliches und *D. discoideum* UBXD9 sehr effizient Wildtyp p97 Hexamere, aber mit niedrigerer Effizienz Hexamere mit punktmutierten Monomeren, in Monomere disassemblieren konnten. Des weiteren haben wir *D. discoideum* UBXD9 „knock-out“ Stämme und GST oder GFP markierte UBXD9 Deletionskonstrukte hergestellt um die UBXD9 abhängige Funktion von p97 weiter zu untersuchen. Obwohl die p97 Aminosäuresequenz sehr stark konserviert ist, zeigt unsere Arbeit wesentliche Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften von *D. discoideum* und humanem p97. Funktionelle Daten, die mit nicht-menschlichen p97 Proteinen gewonnen wurden, spiegeln daher nicht unbedingt die menschliche Situation wider und sollten mit Vorsicht interpretiert werden. Darüber hinaus liefert unsere Arbeit Hinweise, dass die untersuchten Krankheitsverursachenden humanen p97 Punktmutationen zu einer erhöhten ATPase-Aktivität führen und das UBXD9-vermittelte p97 Hexamer-Monomer Gleichgewicht beeinträchtigen.

Weitere Studien sollten die Frage angehen, ob die spät einsetzende p97 humane krankheitspathologie im Zusammenhang mit einer erhöhten ATPase-Aktivität und/oder einer veränderten UBXD9 Protein-Interaktion steht.