

Summary

p97 (VCP) is an abundant homohexameric AAA+ ATPase, which is conserved from *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) to man. The functions of p97 extend into almost every angle of cell physiology, making p97 a pivotal factor in cellular protein homeostasis. The basic function of p97 can be described as the extraction of target proteins from protein complexes or membranes and the subsequent unfolding of these proteins. However, the exact mechanism of how p97 works and how it is regulated in order to fulfil the spatial, temporal and mechanical different tasks is not yet understood. It is known that over 30 cofactors, that form higher-order complexes with p97 are involved in its regulation. The largest family of cofactors is the UBXD protein family, whose members all carry a UBX domain that enables binding to p97. In addition, UBXD proteins have other domains that differentiate them from each other, making them a very diverse family.

In the present work, the focus was on the functional analysis of *D. discoideum* UBXD9, a member of the UBXD protein family that is still poorly characterised. Pull-down assays of different UBXD9 truncation constructs with p97 were performed to investigate the interaction of different UBXD9 domains with p97. This revealed that the UBX domain is necessary and sufficient for a strong interaction with p97. In addition, the ability of UBXD9 to mediate the dissociation of p97 hexamers was investigated. The results of this study showed that an extended UBX domain encompassing amino acid 261–573 of UBXD9 is required to mediate the dissociation of the p97 hexamers. Thus, *in vivo* UBXD9 appears to influence the equilibrium between p97 hexamers and monomers. The addition of full length UBXD9 and UBXD9^{261–573} to p97 hexamers resulted in a strongly reduced ATPase activity of p97. In which cellular context UBXD9 functions is still unknown, as our cell biological studies of *D. discoideum* UBXD9 knock-out cells and UBXD9 overexpressing cells did not show any effect in comparison to AX2 wild-type cells.

Based on three different approaches we identified new interaction partners of UBXD9 in *D. discoideum*. We found that the UBXD9-interactome comprises a number of actin-binding proteins. Therefore, we hypothesise that UBXD9 may perform functions in the organisation of the actin cytoskeleton. Furthermore, we identified the glutamine synthetase type III in all three approaches as interaction partner of UBXD9. The cellular function of this interaction and whether UBXD9 and glutamine synthetase type III interact directly or indirectly needs to be determined in future studies.

Zusammenfassung

p97 (VCP) ist eine abundant vorkommende AAA+ ATPase, welche ein Homohexamer bildet und von *D. discoideum* bis zum Menschen konserviert ist. Die Funktionen von p97 erstrecken sich in fast jeden Winkel der Zellphysiologie, was p97 zu einem zentralen Faktor der zellulären Proteinhomöostase macht. Die grundlegende Aufgabe von p97 ist das Extrahieren von Zielproteinen aus Proteinkomplexen oder Membranen sowie die anschließende Entfaltung dieser Proteine. Der genaue Mechanismus, wie p97 wirkt und welcher Regulierung es unterliegt, um den räumlich, zeitlich und mechanisch unterschiedlichen Aufgaben nachzukommen, ist noch nicht verstanden. Es ist bekannt, dass über 30 Kofaktoren, die mit p97 Komplexe höherer Ordnung bilden, an seiner Regulierung beteiligt sind. Die größte Familie der Kofaktoren bildet die UBXD Proteinfamilie, deren Mitglieder alle eine UBX Domäne tragen. Diese Domäne kann mit p97 interagieren. Darüber hinaus besitzen die sehr diversen Mitglieder der UBXD Proteinfamilie zusätzliche Domänen, die für die maßgebliche Unterscheidung der Proteine verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der funktionellen Untersuchung von UBXD9 aus *D. discoideum*. Durch Interaktionsstudien zwischen den unterschiedlichen UBXD9 Domänen mit p97 konnte gezeigt werden, dass die UBX Domäne notwendig und ausreichend für eine Interaktion mit p97 ist. Des Weiteren wurde die Fähigkeit von UBXD9, die Dissoziation des p97 Hexamers zu vermitteln, untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass eine erweiterte UBX Domäne von UBXD9 (Aminosäuren 261–573) erforderlich ist, um die Dissoziation der p97 Hexamere zu vermitteln. Somit scheint UBXD9 *in vivo* das Gleichgewicht zwischen p97 Hexameren und Monomeren zu beeinflussen. Außerdem führte die Zugabe von UBXD9 und UBXD9^{261–573} zu p97 Hexameren zu einer stark verminderten ATPase-Aktivität von p97. In welchem zellulären Kontext UBXD9 wirkt, ist noch unbekannt, da unsere zellbiologischen Studien von UBXD9 *knock-out* Zellen und UBXD9 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu AX2 Wildtyp-Zellen keinen Effekt zeigten.

Basierend auf drei verschiedenen Ansätzen identifizierten wir neue Interaktionspartner von UBXD9 in *D. discoideum*. Diese zeigten, dass das UBXD9-Interaktom eine Reihe von Aktin-bindenden Proteinen umfasst. Daher vermuten wir, dass UBXD9 eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts erfüllen könnte. Darüber hinaus identifizierten wir die Glutaminsynthetase Typ III als neuen Interaktionspartner von UBXD9. Die zelluläre Funktion dieser Interaktion, und ob UBXD9 und die Glutaminsynthetase Typ III direkt oder indirekt interagieren, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.