

Zusammenfassung:

p97 (VCP oder „valosin-containing protein“ in Säugetieren oder Cdc48p in Hefe) ist ein ubiquitär exprimiertes und evolutionär hoch konserviertes Hexamer und ein Mitglied der Walker P-loop AAA-ATPasen. p97 ist erforderlich für eine Vielfalt von Zellprozessen wie Ubiquitin-Proteasom-Protein-Degradation und Autophagie. Heterozygote Mutationen des menschlichen VCP (p97)-Gens auf Chromosom 9p13-p12 führen zu einer spät auftretenden autosomal-dominanten Form einer Einschlusskörper-Myopathie assoziiert mit Paget's Erkrankung der Knochen und einer frontotemporalen Demenz (IBMPFD), amyotropher Lateralsklerose (ALS), und hereditärer spastischer Paraplegie (HSP). Bisher wurden mehr als 20 einzelne p97 Punktmutationen identifiziert mit dem Codon 155 als „Hotspot“. Wir haben die Funktion von p97 und die *in-vivo* Auswirkungen der p97-R155C Punktmutation in der Amöbe *D. discoideum* untersucht. Wir haben AX2 Wildtyp- und ATG9^{KO} (Autophagy 9 Deletionsmutante)-Stämme hergestellt, die p97-RFP oder p97^{R155C}-RFP ektopisch exprimieren. Co-Immunpräzipitationsstudien mit einem RFP-spezifischen Antikörper zeigten, dass das endogene p97 mit dem ektopisch exprimierten p97-RFP oder p97^{R155C}-RFP Heteromere bildet. Pull-down-Experimente zeigten, dass die R155C Punktmutation die Interaktion von p97 mit dem spezifischen Adapter Protein UbxA beeinträchtigt. Wir zeigten auch, dass UbxA die Dissoziation der p97 Hexamere in Monomere verursacht. Diese Aktivität von UbxA wurde durch die R155C Punktmutation beeinträchtigt. Die Mutantenstämme zeigten Veränderungen im Zellwachstum, in der Phototaxis und Entwicklung und der proteasomalen Aktivität. Diese Beobachtungen weisen auf eine Fehlregulation von mehreren essentiellen zellulären Prozessen hin. Immunfluoreszenzanalysen ergaben eine Zunahme von Proteinaggregaten in ATG9^{KO}/p97^{R155C}-RFP und ATG9^{KO} Zellen. Western-Blot-Experimente zeigten einen Anstieg der ubiquitinierten Proteine sowie des Autophagiemarkers ATG8 (LC3). Auf Lumineszenz basierende Assays zeigten, dass die proteasomale Aktivität in AX2/p97^{R155C}-RFP Zellen leicht reduziert und nahezu vollständig in der ATG9^{KO} Mutante gehemmt war. Expression von p97^{R155C}-RFP in der ATG9^{KO} Mutante führte zu einer partiellen Heilung dieses Phänotyps. Zusammengefasst verbesserte die Expression von p97^{R155C}-RFP im ATG9^{KO} Stamm teilweise oder vollständig dessen pleiotropen Phänotyp. Wir haben auch eine dosisabhängige Wirkung von p97 auf mehrere zelluläre Prozesse festgestellt. Basierend auf dem Vergleich zwischen der ATG9^{KO} Mutante und der ATG9^{KO}/p97^{R155C}-RFP Doppelmutante schlagen wir eine Wechselwirkung von p97 mit dem Autophagieprotein ATG9 vor, die auf gegenseitige Hemmung beruht.