



Doctoral Thesis

Functional characterization of the ternary complex VCP/p97-UBXDI-CAVL in endolysosomal sorting in cultured mammalian cells

Author(s):

Vuk, Maja

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007329154> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 20378

**Functional characterization of the ternary complex VCP/p97-
UBXD1-CAV1 in endolysosomal sorting in cultured mammalian cells**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MAJA VUK

Dipl. Ing. of Biology, University of Zagreb

born on 30th April 1983

citizen of Croatia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Dr. Hemmo Meyer, co-examiner

Prof. Dr. Ari Helenius, co-examiner

2012

Summary

p97 is an AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) ATPase that is highly conserved in eukaryotes. p97 is an abundant and functionally versatile cellular protein. It has been implicated in distinct and unrelated cellular pathways such as ER associated degradation (ERAD), membrane fusion, chromatin remodelling, DNA repair and even autophagy. These different cellular functions are achieved by formation of alternate core complexes with p97 cofactors and adaptors that define the functional specificity. p97 has emerged as a central element of the ubiquitin-proteasome system, and its function is best understood in ERAD. Missense mutations in p97 cause a multisystemic human disorder Inclusion Body Myopathy associated with Paget's disease of bone and Frontotemporal Dementia (IBMPFD). A mass spectrometry screen identified the p97-UBXD1-CAV1 complex whose interaction is specifically disrupted by IBMPFD mutations.

This work aimed at identifying the functional relevance of the interaction between p97, UBXD1 and CAV1 on the cellular level and its implications in the molecular pathogenesis of IBMPFD. We found that expression of p97 IBMPFD-associated mutant, inhibition of p97 activity or UBXD1 silencing led to defects in sorting of CAV1 to endolysosomes. CAV1 accumulated on the limiting membrane of enlarged endolysosomes and was not sorted into the lumen. This observation suggested that p97-UBXD1 regulates transport of CAV1 to lysosomes. This was further supported by colocalization of UBXD1 and CAV1 on early and late endosomes. UBXD1 binding to CAV1 and recruitment to CAV1-positive endosomes was dependent on ubiquitination of CAV1. This finding represents the first localization of a p97 cofactor to the endocytic pathway. Importantly, it was demonstrated that the p97 IBMPFD-associated mutation inhibited endosomal sorting but not ERAD. These results indicate that p97-UBXD1 constitute a novel core complex that specifically functions in ubiquitin-dependent endosomal trafficking of CAV1. Furthermore, p97 inhibition delays EGFR degradation, but this phenotype is CAV1 independent suggesting a more general function of p97 in endosomal trafficking. Taken together, these results support a previously unidentified function of p97 in endosomal trafficking, which is independent of ERAD and has implications for molecular pathogenesis of the IBMPFD disease.

Zusammenfassung

Die AAA (ATPasen assoziiert mit verschiedenen zellulären Aktivitäten) ATPase p97 ist ein, in Eukaryoten stark konserviertes, häufig vorkommendes und funktionell versatiles, zelluläres Protein. Es ist an verschiedenen, unabhängigen, zellulären Vorgängen wie ER assoziierte Degradation (ERAD), Membranfusion, Chromatin Remodellierung, DNS Reparatur und sogar Autophagie beteiligt. Diese verschiedenen Funktionen erfüllt p97 durch Bildung unterschiedlicher Kernkomplexe mit p97 Kofaktoren und Adaptern, welche die funktionale Spezifität definieren. Am besten versteht man derzeit die Funktion von p97 im ERAD. Folglich zeichnet sich p97 auch als zentrales Element des Ubiquitin-Proteasom-Systems aus. Punktmutationen bringen p97 in den Zusammenhang mit einer multisystemischen, humanen Krankheit der Einschlusskörpermyopathie, assoziiert mit dem Paget Syndrom der Knochen und frontotemporaler Demenz (IBMPFD). Eine massenspektrometrische Untersuchung hat p97 im Komplex mit UBXD1 und Caveolin-1 identifiziert, dessen Bildung durch IBMPFD Mutationen spezifisch unterbunden wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die funktionelle Relevanz der Interaktion von p97, UBXD1 und Caveolin-1 auf zellulärer Ebene untersucht werden und auf diese Weise Einblicke in die molekularen Grundlagen der Pathogenese von IBMPFD gewonnen werden. Wir haben herausgefunden, dass sowohl die Expression von IBMPFD-assoziierten Mutanten von p97, als auch die Inhibierung von p97-Aktivität oder das Entfernen von UBXD1, ein fehlerhaftes Sortieren von Caveolin-1 innerhalb der Endolysosomen zur Folge hat. Caveolin-1 akkumuliert in diesen Fällen an der limitierenden Membran von vergrößerten Endolysosomen und wird nicht in deren Inneres sortiert. Diese Beobachtung legt nahe, dass p97-UBXD1 den Transport von Caveolin-1 zu Lysosomen reguliert. Eine Kollokalisierung von UBXD1 und Caveolin-1 auf frühen und späten Endosomen unterstützt diese Hypothese. Sowohl die Interaktion zwischen Caveolin-1 und UBXD1, als auch die Rekrutierung von UBXD1 zu Caveolin-1 positiven Endosomen setzen eine Ubiquitinierung von Caveolin voraus. Darüber hinaus stellt diese Beobachtung auch die erste Lokalisierung eines p97 Kofaktors im endosomalen System dar. Es konnte wichtigerweise gezeigt werden, dass IBMPFD-assoziierte Mutationen von p97 die endosomale Sortierung inhibieren, während ERAD nicht beeinträchtigt wird. Wir möchten damit

vorschlagen, p97-UBXD1 als einen neuen Kernkomplex von p97 zu definieren, der speziell Funktionen im Ubiquitin-abhängigen endosomalen Transport von Caveolin-1 erfüllt. Des Weiteren verzögert die Inhibierung von p97 den Abbau von EGFR, jedoch unabhängig von Caveolin-1, womit wir eine generellere Funktion von p97 im endosomalen Transport vermuten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Daten eine zuvor nicht beschriebene Funktion von p97, unabhängig des ERAD, im endosomalen Transport beschreiben und Hinweise auf die molekularen Grundlagen der Pathogenese von IBMPFD liefern.