

Abstract

The class of BEACH (Beige and Chediak Higashi) Domain Containing Proteins (BDCPs) is highly conserved among eukaryotes. Their functional relevance in membrane trafficking events along the endo-lysosomal pathway was substantiated by characterization of lysosome malfunctions and deformations in BDCP deficient organisms. Nonetheless, as BDCP binding partners have rarely been identified and their functional interdependence was not elucidated further, details on their molecular role are still poorly understood. Therefore, the functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* BDCP SPIRRIG (SPI) presented in this study was based on an interaction partner dependent approach.

Following this strategy, the functional relevance of SPI in two different molecular pathways was revealed. In accordance with its direct binding to two multivesicular body associated proteins required for vacuolar membrane and protein trafficking, AtSKD1 (SUPPRESSOR OF K⁺-TRANSPORT GROWTH DEFECT 1) and LIP5 (LYST INTERACTING PROTEIN 5), the relevance of SPI on endosomal sorting was explored. In contrast to a proposed SKD1 downstream function of BDCPs in human cells, AtSKD1 mediated vacuolar protein sorting was shown to depend on the synergistic action of SPI and its binding-partner LIP5.

In contrast to this role in endosomal sorting, the physical association between SPI and the mRNA processing body component DECAPPING PROTEIN 1 (DCP1) revealed a membrane-independent function for a BDCP for the first time. In consideration of the morphological actin phenotype of *spi* mutants and the subcellular motility of P-bodies, an interconnection between P-bodies and SPI was elucidated focusing on P-body movement patterns. Therefore, the molecular mechanism underlying P-body transport was investigated and P-bodies were characterized as myosin class XI cargo. On this basis, it was shown that morphological alterations in *spi* mutant cells are not indicative for any defects in the subcellular, actomyosin driven transport of P-bodies. The functional association between SPI and P-bodies was studied, focusing on stress dependent reactions. The regulative function of SPI on post-transcriptional RNA processing was suggested, as salt stress dependent mRNA transitions to P-bodies, P-body formation and post-transcriptional stabilization of certain mRNAs were impaired due to the loss of SPI. As DCP1 and SPI homologues from mammals and yeast were shown to interact inter- and intraspecifically, an association between BDCPs and P-bodies seems to be

evolutionarily conserved. In this respect, an extension of the classical perspective of BDCPs as facilitators of (endo-) membrane dynamics to regulators of posttranscriptional RNA maintenance seems reasonable and might contribute to understand the molecular reasons of main clinical symptoms of BDCP deficient patients that correlate with impaired post-transcriptional RNA processing.

Zusammenfassung

BEACH (Beige und Chediak Higashi) Domänen Proteine stellen eine stark konservierte Proteinfamilie in Eukaryoten dar. Organismen, in denen BDCP nicht vorhanden sind, zeichnen sich im Allgemeinen durch Missbildungen und Fehlfunktionen von Lysosomen aus. Aufgrund dessen vermutet man eine funktionelle Relevanz der BDCP in Membrantransportprozessen entlang des endo-lysosomalen Transportweges. Da bislang nur wenige BDCP-bindende Proteine identifiziert und deren Einfluss auf die Funktion von BDCP nicht näher untersucht wurden, sind die molekularen Funktionsweisen von BDCP weitgehend unbekannt. Die funktionale Charakterisierung des BDCP SPIRRIG (SPI) in *Arabidopsis thaliana* basiert daher auf einem Interaktoren-zentrierten Forschungsansatz. Dieser Strategie folgend, konnte die funktionale Relevanz von SPIRRIG in zwei unterschiedlichen molekularen Signalwegen aufgezeigt werden. Aufgrund der direkten Interaktion von SPIRRIG und zwei an multivesikulären späten Endosomen lokalisierten Proteinen, AtSKD1 (SUPPRESSOR OF K⁺-TRANSPORT GROWTH DEFECT 1) sowie LIP5 (LYST INTERACTING PROTEIN 5), die für den vakuolären Transport von Proteinen und Membranen verantwortlich sind, wurde die molekulare Funktion von SPI in endosomalen Sortierungsprozessen untersucht. Im Unterschied zu menschlichen Zellen, in denen vermutet wird, dass die Funktion von BDCPs der von SKD1 nachgeschaltet ist, konnte hier gezeigt werden, dass die AtSKD1 vermittelte vakuoläre Proteinsortierungen durch das synergistische Zusammenspiel von SPI und seinem Interaktionspartner LIP5 reguliert wird. Unter Berücksichtigung der physikalischen Interaktion von SPI und DECAPPING PROTEIN 1 (DCP1), einer Proteinkomponente von zytoplasmatischen mRNA-Protein Akkumulationen, die als P-bodies bezeichnet werden, wurde erstmalig eine membranunabhängige Funktion eines BDCP untersucht. Aufgrund des vorhandenen morphologischen Aktinphänotyps von *spi* Mutanten, sowie dem subzellulären Bewegungsverhalten von P-bodies, wurde die molekulare Funktion von SPI zunächst im Hinblick auf den Transport von P-bodies untersucht. Dazu wurde der molekulare Mechanismus, der

der Beweglichkeit von P-bodies zugrunde liegt entschlüsselt und gezeigt, dass P-bodies durch die direkte Anbindung an Proteine der Myosinfamilie XI transportiert werden. Die Untersuchung des Bewegungsmusters von P-bodies in *spi*-Mutanten hat verdeutlicht, dass die zellmorphologischen Veränderungen der *spi* Mutante sich nicht in veränderten, Aktin- und Myosin-abhängigen Transportprozessen von P-bodies widerspiegeln. Die molekulare Beziehung von SPI und P-bodies wurde zudem unter Berücksichtigung stressbedingter Eigenschaften von P-bodies untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass in Abwesenheit von SPI die Salzstress-abhängige Verlagerung von mRNAs zu P-bodies, die Bildung von P-bodies sowie die post-transkriptionelle Stabilisierungen von bestimmten mRNAs verändert sind. Da SPI- und DCP1-ähnliche Proteine aus Säugetieren oder Hefeorganismen in Interaktionsstudien inter- und intraspezifisches Interaktionsverhalten zeigten, ist es wahrscheinlich, dass eine Verbindung zwischen BDCP und P-bodies evolutiv konserviert ist. Die Frage nach einer generellen Erweiterung des klassischen Verständnisses von BDCP als Regulatoren (endo)-membranabhängiger Prozesse, um ihre Funktion in der Aufrechterhaltung post-transkriptioneller Vorgänge erscheint daher begründet. Diese Erkenntnisse können entscheidend dazu beitragen die molekularen Ursachen verschiedener Krankheitsbilder von Patienten mit einer BDCP Fehlfunktion zu erklären, die mit post-transkriptionellen Veränderungen einhergehen.