

1. SUMMARY

1.1. Abstract

The genes of eukaryotic organisms are organized in a discontinuous fashion. Protein coding segments called exons are interspersed with non-coding intronic sequences that are removed in the process of pre-mRNA splicing. Splicing is a critical and necessary step in expression of intron-containing genes, but it also greatly expands on the repertoire of possible gene products from a limited set of genes. Unsurprisingly, given the ubiquitous requirement of splicing in the maintenance of cell and tissue homeostasis, mutations in components of the splicing machinery, or their loss, leads to various diseases in humans. The diseases vary greatly in nature and tissues/organs they impact, and range from neurodegenerative diseases to different types of cancers. Alterations in splicing have also been implicated in aging. Despite the ever-growing knowledge on biochemical characteristics of the splicing machinery and the defects that emerge as a consequence of spliceosome ablation, the molecular pathogenetic mechanisms behind many splicing-associated diseases *in vivo* are still unexplored.

In this thesis, I present the establishment of the *Drosophila* model of autosomal-dominant retinitis pigmentosa (adRP), a rare genetic disorder characterized by a progressive loss of photoreceptors in the retina and in certain cases complete loss of vision. We show that mutations in *Prp8*, a core component of the U5 snRNP of the spliceosome, causative of adRP, lead to a developmental delay in *Drosophila*, accompanied by activation of cell stress signaling pathways, cell death and alterations in cellular transcriptional profiles. Consistent with the data from patients, the severity of the phenotypes depends on the particular mutation present.

Furthermore, we demonstrate that the evolutionarily conserved ecdysoneless protein (Ecd), previously implicated in pre-mRNA splicing as a part of the U5 snRNP, functions as a critical U5 snRNP assembly factor, and governs the stability of *Prp8*. In addition, we show that loss of Ecd induces cellular responses consistent with mutations or loss of other factors involved in pre-mRNA splicing. Furthermore, we provide a detailed description of the signaling cascades participating in the DNA damage response following Ecd depletion, and identify the major potential sources of the insults to genome integrity, specifically R-loop accumulation and activation of

transposable element, but also the key regulators of cytoprotective responses of cells upon spliceosome ablation. Finally, I provide novel insights into the functions and interacting partners of a critical protective factor against R-loops, RNase H1, through a combination of -omics approaches and functional genetics. The data presented here highlights the complexities of crosstalk between the pre-mRNA splicing and factors involved in maintenance of genome integrity, but also the value of the *Drosophila* model for elucidation of molecular pathogenetic mechanisms *in vivo*.

1.2. Zusammenfassung

Die Gene eukaryotischer Organismen sind diskontinuierlich organisiert. Proteinkodierende Segmente, die als Exons bezeichnet werden, sind mit nichtkodierenden Intronsequenzen durchsetzt, die beim Prozess des Prä-mRNA-Spleißens entfernt werden. Das Spleißen ist ein kritischer und notwendiger Schritt bei der Expression von Genen, welche Introns enthalten, aber es erweitert auch das Repertoire möglicher Genprodukte aus einem begrenzten Satz von Genen erheblich. Angesichts der allgegenwärtigen Notwendigkeit des Spleißens zur Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebekomöostase überrascht es nicht, dass Mutationen in Komponenten der Spleißmaschinerie oder deren Verlust zu verschiedenen Krankheiten beim Menschen führen. Die Krankheiten unterscheiden sich stark in ihrer Art und den Geweben/Organen, welche sie betreffen und reichen von neurodegenerativen Erkrankungen bis hin zu verschiedenen Krebsarten. Veränderungen beim Spleißen wurden auch mit dem Altern in Verbindung gebracht. Trotz des ständig wachsenden Wissens über die biochemischen Eigenschaften der Spleißmaschinerie und die Defekte, welche als Folge von Abtragung des Spleißosoms entstehen, sind die molekularen pathogenetischen Mechanismen hinter vielen Spleiß-assoziierten Erkrankungen *in vivo* noch unerforscht.

In dieser Dissertation stelle ich die Etablierung des Drosophila-Modells der autosomal-dominanten Retinitis pigmentosa (adRP) vor. Bei Retinitis pigmentosa handelt es sich um eine seltene genetischen Störung, die durch einen fortschreitenden Verlust von Photorezeptoren in der Netzhaut und in bestimmten Fällen durch einen vollständigen Verlust des Sehvermögens gekennzeichnet ist. Wir zeigen, dass Mutationen in Prp8, welche eine Kernkomponente des U5 snRNP des Spleißosoms ist, adRP verursachen und zu einer Entwicklungsverzögerung in Drosophila führen, begleitet von der Aktivierung von Signalwegen für Zellstress, Zelltod und Veränderungen in zellulären Transkriptionsprofilen. In Übereinstimmung mit den Daten von Patienten hängt die Schwere der Phänotypen von der jeweils vorliegenden Mutation ab.

Darüber hinaus zeigen wir, dass das evolutionär konservierte Ecdysoneless-Protein (Ecd), welches zuvor als Teil des U5-snRNP am Prä-mRNA-Spleißen beteiligt war, als kritischer Zusammensetzungsfaktor für U5-snRNP fungiert und die Stabilität

von Prp8 steuert. Zusätzlich zeigen wir, dass der Verlust von Ecd zelluläre Reaktionen induziert, die mit Mutationen oder dem Verlust anderer Faktoren übereinstimmen, die am Prä-mRNA-Spleißen beteiligt sind. Außerdem bieten wir eine detaillierte Beschreibung der Signalkaskaden, die an der DNA-Schadensreaktion nach Ecd-Reduzierung beteiligt sind, und identifizieren die wichtigsten potenziellen Quellen der Angriffe auf die Genomintegrität, insbesondere die R-Loop-Akkumulation und Aktivierung von Transposons, aber auch die Schlüsselregulatoren von zytoprotektiven Reaktionen von Zellen nach Abtragung des Spleißosoms. Abschließend liefere ich neue Erkenntnisse in die Funktionen und Interaktionspartner eines kritischen Schutzfaktors gegen R-Loops, RNase H1 genannt, durch eine Kombination aus -omiks-Ansätzen und funktioneller Genetik. Die hier präsentierten Daten unterstreichen die Komplexität des Informationsaustauschs zwischen dem Prä-mRNA-Spleißen und Faktoren, die an der Aufrechterhaltung der Genomintegrität beteiligt sind, aber auch den Wert des Drosophila-Modells für die Aufklärung molekularer pathogenetischer Mechanismen *in vivo*.