

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Entfernen von Introns aus der prä-mRNA ist ein essentieller Schritt der Genexpression. Dieses "Spleißen" wird von einem großen RNA-Protein-Komplex katalysiert, dem Spleißosom. Der Spleißprozess ist konserviert von Hefe und bis zu Säugern. Wir haben die Bierhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, als Modellsystem gewählt, um das Spleißen von prä-mRNA zu untersuchen.

Introns werden während der frühen Schritte des Zusammenbaus des Spleißosoms erkannt, in den sogenannten "commitment"-Komplexen. Dabei interagieren RNA- und Proteinfaktoren mit konservierten Sequenzen in der prä-mRNA. Der Spleißfaktor BBP/SF1, welcher den Verzweigungspunkt im Intron erkennt, ist an dieser Erkennung beteiligt. Dieses Protein, das essentiell für Hefe ist, interagiert außerdem mit dem U2AF<sup>65</sup>/Mud2p Spleißfaktor.

Wir haben die Anwesenheit von BBP und Mud2p in Spleißkomplexen der Hefe mit Gelmobilitätssays und Immunpräzipitationen untersucht. BBP und Mud2p sind Bestandteil des "commitment"-Komplexes 2 (CC2), aber konnten weder im "commitment"-Komplex 1 (CC1) noch im prä-Spleißosom detektiert werden. Dies sind die ersten Proteine der "commitment"-Komplexe, deren Abspaltung während oder kurz nach der Bildung des prä-Spleißosoms gezeigt wurde. Genetische und biochemische Entfernung von BBP aus Zellextrakten zeigte, daß BBP für die Bildung von CC2 benötigt wird. Interessanterweise hatte die Entfernung von BBP oder die genomische Auslöschung von *MUD2* keine signifikanten Auswirkungen auf die Bildung von (prä)-Spleißosomen oder auf das Spleißen *in vitro*, aber führte zu einer vorübergehenden Anhäufung von CC1. Diese Beobachtungen ließen uns ein "Recycling"-Modell entwickeln, in dem BBP und Mud2p während des Übergangs von CC2 zum prä-Spleißosom entlassen werden und für eine neue Runde der Bildung von CC2 zur Verfügung stehen.

Um näheren Aufschluß über die *in vivo* Funktion von BBP/ScSF1 zu erhalten, haben wir 11 hitzeempfindliche (ts) und eine kälteempfindliche (cs) Mutante des *MSL5* Gens, das diesen Faktor kodiert, erzeugt und ihre Phänotypen analysiert. Alle Mutanten blockierten die Bildung von CC2 bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur. Die Bildung von vollständigen Spleißosomen und das Spleißen *in vitro* war in den ts-Mutanten nicht beeinträchtigt. Die cs-Mutante zeigte dagegen einen partiellen Defekt bei der Bildung von (prä)-Spleißosomen, allerdings war auch hier die Spleißaktivität *in vitro* nicht behindert. In allen Mutanten war das *in vivo* Spleißen von Reportern, die in der 5' Spleißstelle und/oder in der Verzweigungsregion des Introns Mutationen enthielten, reduziert. Demgegenüber wurden Introns mit Konsensus-Spleißstellen mit nahezu Wildtyp-Aktivität gespleißt.

Interessanterweise entwich in allen Mutanten prä-mRNA vom Zellkern in das Zellplasma (bis zu 40-fach im Vergleich zum Wildtyp). Eine Kombination von *msl5* ts-Mutanten mit einer Auslöschung des *UPF1* Gens, das im nonsense-codon-vermittelten Abbau (nonsense-mediated decay, NMD) eine Rolle spielt, zeigte einen spezifischen synthetischen Wachstumsphänotyp. Dies weist darauf hin, daß die essentielle Funktion von SF1 mit dem Zurückhalten von prä-mRNA im Zellkern zusammenhängen könnte.