

**Identifizierung und Charakterisierung
spleiß-relevanter Sequenzmotive in Introns von
Entamoeba histolytica (SCHAUDINN)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sassia Touzni

aus Hamburg

Hamburg 2003

Für Dirk Burmester

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. E. TANNICH
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. SCHÄFER

Tag der Disputation: 18. Juli 2003

Hamburg, den 07. Juni 2003



Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Genexpression in höheren Eukaryoten	3
1.2.1	Der Aufbau von Introns	3
1.2.2	Molekulare Grundlagen des <i>cis</i> -Spleißens	4
1.2.3	Alternatives Spleißen	7
1.2.4	Autokatalytisches Spleißen	7
1.3	Genexpression in Protozoen	8
1.3.1	RNA-Prozessierungsmechanismen in Kinetoplastiden	10
1.3.1.1	<i>Trans</i> -Spleißen	10
1.3.1.2	RNA-Edition	11
1.4	Charakteristika des <i>E. histolytica</i> -Genoms	12
1.5	Introns in Protozoen	13
1.6	Zielsetzung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Reagenzien und Chemikalien	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Weitere Materialien	16
2.1.3	Spezielle Geräte	17
2.1.4	Enzyme	17
2.1.5	Marker	17
2.1.6	Oligonukleotide	18
2.2	Puffer und Lösungen	23
2.3	Organismen und Expressionsvektoren	24
2.3.1	Bakterien	24

2.3.2	Amöben	24
2.3.3	Expressionsvektoren	24
2.4	Nährmedien und Kulturbedingungen	31
2.4.1	Nährmedien	31
2.4.2	Kultivierung und Ernte von <i>E. histolytica</i>	32
2.4.3	Kultivierung von Bakterien	32
2.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	32
2.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	32
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.6	Isolierung von Nukleinsäuren	33
2.6.1	Plasmid-Mini-Präparation	33
2.6.2	Plasmid-Maxi-Präparation	33
2.6.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>E. histolytica</i>	34
2.6.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. histolytica</i>	34
2.7	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	34
2.7.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	34
2.7.2	Fällung von Nukleinsäuren	35
2.7.3	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren	35
2.8	Auftrennung und Isolierung von DNA	35
2.8.1	Agarosegelelektrophorese	35
2.8.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.8.3	Elution von DNA aus <i>Low-Melting-Point</i> -Agarose	35
2.8.4	Elution von DNA aus Agarose	35
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA	37
2.9.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	37
2.9.2	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.9.3	Hybridisierung und Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotiden	37
2.9.4	Auffüllen von 5'-Überhängen	38
2.9.5	Dephosphorylierung freier 5'-Enden von DNA	38
2.9.6	DNA-Sequenzanalyse	39
2.10.	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion	40
2.10.1	PCR-Mutagenese (PCR)	40
2.10.2	Reverse Transkription von RNA	41
2.10.3	Amplifikation von cDNA	41

2.11	Transiente Transfektion von <i>E. histolytica</i>	42
2.12	Dualer-Luciferase-Assay	43
2.12.1	Erstellung des Amöbenlysats für den Dualen-Luciferase-Assay	44
2.12.2	Bestimmung von Luciferase-Aktivitäten	44

3. Ergebnisse **45**

3.1	Untersuchungen zum Aufbau und zur Regulation der <i>ehrp127a</i>-Gene	45
3.1.1	Organisation der <i>ehrp127a</i> -Gene	45
3.1.2	Vergleich von <i>ehrp127a</i> -kodierenden Sequenzen	46
3.1.3	Untersuchungen zur Expression der <i>ehrp127a</i> -Gene	47
3.1.3.1	Einfluss homologer <i>ehrp127a</i> -flankierender Regionen auf die Luciferase-Expression	47
3.1.3.2	Einfluss homologer <i>rpl27a</i> -5'-Sequenzen sowie einer heterologen <i>aktin</i> -3'-nicht-kodierenden Region auf die Luciferase-Expression	49
3.1.4	Deletionsanalyse der <i>ehrp127a-1</i> -Promotorregion	50
3.1.5	Identifikation eines konservierten Promotorelements in ribosomalen <i>E. histolytica</i> -Genen	51
3.1.6	Mutation des konservierten AGGGTT-Promotorelements	54
3.2	Charakterisierung von Introns in <i>E. histolytica</i>-Genen	54
3.2.1	Einfluss der <i>ehrp127a</i> -Introns auf die Genexpression	54
3.2.2	Konservierte Sequenz-Motive in korrespondierenden Introns von <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	56
3.2.3	Identifikation von Intron-Sequenzen mit funktioneller Bedeutung für das Spleißen	57
3.2.3.1	<i>Linker-Scanning</i> -Mutagenese des <i>ehrp127a-1</i> -Introns und transiente Transfektion	57
3.2.3.2	Nachweis des Spleißens der <i>rpl27a-1</i> -RNA in <i>Linker-Scanning</i> -Transfektanten durch RT-PCR-Analyse	60
3.2.4	Identifikation eines putativen amöbenspezifischen <i>Branch Point</i> -Motivs in <i>E. histolytica</i> - und <i>E. dispar</i> -Introns	62
3.2.5	Konservierte Motive in anderen <i>E. histolytica</i> -Introns	63
3.2.6	Untersuchungen zur Relevanz des invarianten Adenosin-Nukleotids in der putativen <i>Branch Point</i> -Region verschiedener <i>E. histolytica</i> -Introns	65
3.2.6.1	Einfluss von Punktmutationen auf das Spleißen in <i>E. histolytica</i>	65

3.2.6.2	RT-PCR-Analysen zum Nachweis des Spleißens in WYTWAY-Mutanten	67
3.2.7	Identifikation des relevanten <i>Branch Point</i> -Adenosins im <i>ehorf0.6</i> -Intron	69
3.2.8	Das Vorhandensein amöbenspezifischer Konsensusmotive in einem artifiziiellen Intron ermöglicht das Spleißen in <i>E. histolytica</i>	71
4. Diskussion		74
4.1 Charakterisierung des <i>ehrp127a</i>-Promotors		74
4.1.1	Die <i>ehrp127a</i> -Gene sind stark konserviert	74
4.1.2	Die Expression der <i>rpl27a</i> -Gene wird durch die nicht-kodierenden 5'-Regionen reguliert	75
4.1.3	Der Promotor des <i>ehrp127a-1</i> -Gens besitzt typische Merkmale eukaryotischer Promotoren	76
4.1.4	Das AGGGTT-Motiv ist ein Promotor-Element ribosomaler <i>E. histolytica</i> -Gene	79
4.2 Charakterisierung der <i>E. histolytica</i>-Introns		82
4.2.1	Das Spleißen verstärkt die Expression der <i>ehrp127a</i> -Gene	82
4.2.2	Die Introns von <i>E. histolytica</i> enthalten stark konservierte Konsensussequenzen	84
4.2.3	Die Funktion des WYTWAY-Motivs ist an eine definierte Position relativ zur 5'-Spleißstelle gebunden	87
4.2.4	Die konservierten Motive in <i>E. histolytica</i> -Introns haben funktionellen Einfluss auf das Spleißen	88
4.2.5	Das invariante Adenosin in der WYTWAY-Region von <i>E. histolytica</i> -Introns kennzeichnet diese Sequenz als <i>Branch Point</i> -Region	91
4.2.6	Mutationen an den Konsensussequenzen der Introns verhindern die Ausbildung der Lasso-Struktur	94
4.2.7	Introns innerhalb eines primären Transkripts werden zum großen Teil anhand der amöbenspezifischen Konsensussequenzen von der Spleißmaschinerie erkannt	95
5. Zusammenfassung		97
6. Literaturverzeichnis		99

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A. bidest	<i>Aqua bidest</i> (doppelt destilliertes Wasser)
Amp	Ampicillin
AS	<i>antisense</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cdNA	<i>complementary DNA</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethyl-propyl-carbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
F	<i>forward</i> , Farad
G	Guanosin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
LB	<i>Luria Bertani</i>
Luc ⁺	<i>Firefly</i> -Luciferase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
OD	optische Dichte
ORF	offene(r) Leserahmen
nt	Nukleotide
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
poly(A)	polyadenyliert
Pwo	<i>Pyrococcus woesi</i>
R	<i>reverse</i>
RNP	Ribonukleoprotein
Rluc	<i>Renilla</i> -Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
rp	ribosomale Proteine
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription-gekoppelte PCR

S	<i>sense</i>
sn	<i>small nuclear</i>
sp.	Spezies
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSC	<i>standard saline citrat</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
T	Thymin
TAE	Trisacetatessigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratessigsäure
TE	Tris-EDTA
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
U	Uracil, <i>Unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Einführung

Das Protozoon *E. histolytica* ist der Erreger der Amöbiasis, einer Infektion, von der jährlich schätzungsweise 50 Millionen Menschen betroffen sind. Der Krankheitsverlauf ist in bis zu 100.000 Fällen letal. Neben der Malaria und der Bilharziose gilt die Amöbiasis als bedeutendste Parasitose des Menschen in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde (WHO, 1997; WALSH, 1986;).

Der Lebenszyklus von *E. histolytica* vollzieht sich ohne Zwischenwirte und umfasst zwei morphologisch unterscheidbare Entwicklungsstadien, das infektiöse Zystenstadium und das vegetative Trophozoitenstadium. Die Infektion mit *E. histolytica* erfolgt über die orale Aufnahme der überwiegend vierkernigen, säureresistenten Zysten durch kontaminiertes Wasser bzw. Nahrungsmittel. Im Dünndarm kommt es zur Exzystierung und zur Umwandlung in die einkernigen, beweglichen Trophozoiten. Diese vegetativen Formen besiedeln vor allem den oberen Dickdarm und vermehren sich dort. Durch vermutlich besondere Bedingungen im unteren Dickdarm kommt es zur Enzystierung und zu zwei Kernteilungen. Die Zysten werden über den Stuhl ausgeschieden. *E. histolytica* kann einerseits asymptomatisch im Darm persistieren, andererseits kann es durch bislang ungeklärte Einflüsse zu einer invasiven Amöbiasis kommen. Hierbei erfolgt ein Übertritt der Trophozoiten vom Darmlumen in die Kolon-Schleimhaut, in deren Folge es zu Kolitis und Diarrhoen kommen kann. Neben diesen intestinalen Formen treten auch extraintestinale Krankheitsverläufe auf. So kann *E. histolytica* durch die Gewebsinvasion hämatogen in andere Organe transportiert werden und dort lebensbedrohliche Abszesse bilden. Diese gewebsinvasiven Trophozoiten bilden keine Zysten und entziehen sich damit der natürlichen Verbreitung. Die Gewebsinvasion stellt folglich für den Parasiten eine „Sackgasse“ dar (JOYCE et al., 1988; VAN LUNZEN et al., 1996; LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997).

Entamoeba dispar ist eine weitere Spezies der Gattung *Entamoeba*, die morphologisch nicht von *E. histolytica* zu unterscheiden ist. Mit Hilfe von Isoenzymmustern (SARGEAUNT et al., 1978) und molekularbiologischen Methoden

(TANNICH et al., 1998; CLARK und DIAMOND, 1991; TACHIBANA et al., 1991) gelang es erst vor einigen Jahren, *E. dispar* als eigene Spezies auszuweisen (DIAMOND und CLARK, 1993). Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen beiden Protozoen ist sehr eng. *E. dispar* lebt jedoch als Kommensale ohne pathogenes Potential im menschlichen Darm. Es wird vermutet, dass ca. 10 % der Weltbevölkerung mit *E. histolytica* oder *E. dispar* infiziert ist, wobei der überwiegende Teil dieser Infektionen auf *E. dispar* zurückzuführen ist (WHO, 1997).

Das vermutete Fehlen Eukaryoten-spezifischer Organellen, wie z. B. Mitochondrien, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum (ER) (MARTINEZ-PALOMO, 1986), galt lange Zeit als Indikator für die primitive Natur dieses Organismus und wies *E. histolytica* als eine Art „lebendes Fossil“ aus. Ribosomale RNA-Analysen (SOGIN, 1991), Nachweise für den sekundären Verlust von Mitochondrien (CLARK und ROGER, 1995) sowie Hinweise auf das Vorhandensein eines Golgi-Apparates und eines ERs (GHOSH et al., 1999) führen jedoch dazu, dass die Einteilung von *E. histolytica* als ursprünglicher Eukaryot (Archezoa) neu überdacht werden muss.

Entamoeba histolytica ist durch die außergewöhnliche Fähigkeit, Zellen zu zerstören und Zellverbände aufzulösen, gekennzeichnet. Die pathogenen Eigenschaften sind vermutlich auf einen multifaktoriellen Prozess zurückzuführen. Es wurden zwar bislang einige wichtige daran beteiligte Moleküle identifiziert, jedoch ist ihre Funktion nur *in vitro* nachgewiesen. Demnach bindet der Trophozoit mit einem Adhärenz-vermittelnden Lektin an die Zielzelle (MCCOY et al., 1994) und die Membran der Zelle wird durch Poren formende Peptide (sog. *Amoebapores*) lysiert (LEIPPE, 1997). Für das Eindringen in das Gewebe sind Proteasen verantwortlich, die extrazelluläre Matrixproteine abbauen können (SCHOLZE und TANNICH, 1994). Die an der Gewebsinvasion beteiligten Moleküle sind sowohl in *E. histolytica* als auch in *E. dispar* vorhanden, wenn auch in unterschiedlichen Mengen (TANNICH, 1998). Die Schlüsselfrage nach den Auslösern der Pathogenität von *E. histolytica* bleibt bislang unbeantwortet. Sowohl die Regulation dieser Gene, als auch die grundsätzlichen Mechanismen der Genexpression in *E. histolytica* wurden bislang nicht ausreichend geklärt.

1.2 Genexpression in höheren Eukaryoten

Die Transkription verläuft in den meisten Eukaryoten monocistronisch, d. h. jedes Gen stellt eine separate Transkriptionseinheit dar. Die Proteinkodierenden Gene liegen als diskontinuierliche Sequenzen vor. Dabei werden die kodierenden Bereiche (Exons) von nicht-kodierenden bzw. intervenierenden Bereichen (Introns) getrennt. Während der mRNA-Reifung werden die Introns entfernt und die Exons durch den Prozess des *cis*-Spleißens miteinander verknüpft (GILBERT, 1978; ABELSON, 1979; CRICK, 1979). Die Synthese von mRNA erfolgt durch die RNA-Polymerase II (SAWADOGO und SENTENAC, 1990) und wird durch die Bindung des Enzyms an *cis*-aktive Promotorelemente eingeleitet. Bereits kurz nach der Transkriptionsinitiation beginnt die Prozessierung des primären Transkriptes. Das wachsende 5'-Ende wird durch die Anheftung einer 7-Methylguanosin-Kappe (BANERJEE, 1980) modifiziert, während parallel dazu das Spleißen eingeleitet wird (MANIATIS und REED, 2002 a). An das 3'-Ende der RNA werden Adenylat-Reste polymerisiert (PROUDFOOT, 1989). Erst nach Vollendung des Spleißens wird die reife mRNA durch eine der zahlreichen nuklearen Poren in das Cytoplasma transportiert (SHARP, 1994).

1.2.1 Der Aufbau von Introns

Die intervenierenden Sequenzen verschiedener Eukaryoten zeigen enorme Größenvarianzen. So weisen Hefe-Introns durchschnittlich eine Länge von 500 Bp auf (PADGETT et al., 1986), wohingegen Vertebraten-Introns zwischen 50 und 10 000 Bp (NAORA und DEACON, 1982) und humane Introns sogar eine Länge von bis zu 500 000 Bp umfassen können (ROWEN et al., 2002). Alle Introns sind durch gemeinsame charakteristische Merkmale gekennzeichnet. An den 5'- und 3'-Spleißstellen finden sich die Dinukleotide GT bzw. AG und stromaufwärts der 3'-gelegenen Intron-Grenze ist eine Verzweigungsstelle (*Branch Point-Region*) lokalisiert, die durch ein invariantes Adenonsin-Nukleotid charakterisiert ist. Darüber hinaus findet sich in vielen Introns zwischen der 3'-Spleißstelle und der *Branch Point-Region* eine Folge von Pyrimidinen (BREATHNACH und CHAMBON, 1981; MOUNT, 1982; PADGETT et al., 1986, SENAPATHY et al., 1990). Diese konservierten Motive dienen der Spleißmaschinerie, dem Spleißosom, als Erkennungssequenzen. Das Spleißosom ist ein dynamischer Komplex, der während des Spleißens auf dem Primärtranskript entsteht (GRABOWSKI et al, 1985; BRODY und ABELSON, 1985). Spleißosomen setzen sich aus

Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs) zusammen, die ihrerseits aus 5 kleinen, Uracil-reichen Kern-RNAs bestehen (U1-, U2-, U4-, U5- bzw U6-snRNA) sowie einer Vielzahl von Proteinen (LERNER und STEITZ, 1979; LERNER et al., 1980; ROGERS und WALL, 1980; REDDY und BUSCH, 1983).

1.2.2 Molekulare Grundlagen des *cis*-Spleißens

Detaillierte Analysen von Spleißreaktionen ergaben sich aus Studien in *Saccharomyces cerevisiae* und in Vertebraten. Das Entfernen nuklearer Introns verläuft über einen Zwei-Schritt-Mechanismus. Zunächst wird die 5'-Exon-Intron-Grenze geöffnet. Dies erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe des Adenosin-Bausteins in der Verzweigungsstelle auf die Phosphodiester-Bindung an der 5'-Spleißstelle. Dadurch nimmt das Intron eine Lasso-ähnliche Zwischenform ein. Im zweiten Schritt reagiert die freigewordene Hydroxy-Gruppe des ersten Exons mit der Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-gelegenen Intron-Grenze und dem zweiten Exon. Die Exons werden miteinander verknüpft, das Intron fällt in seiner Lasso-Struktur heraus und wird sofort durch RNAsen degradiert (PADGETT et al., 1984; KRAINER et al., 1984; RUSKIN et al., 1984; REED und MANIATIS 1985).

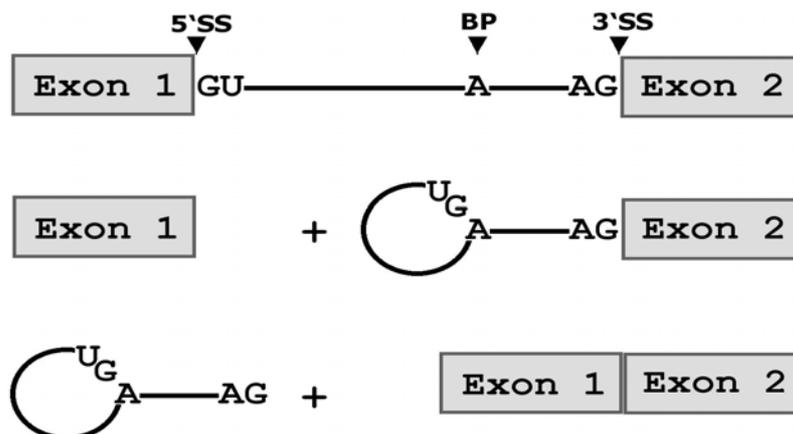


Abb. 1.1: Darstellung des *cis*-Spleißens.

Gezeigt ist eine prä-mRNA, die aus zwei Exons (graue Boxen) sowie einer intervenierenden Sequenz (durchgezogene Linie) besteht. Durch Angriff des Adenosin-Nukleotids in der *Branch Point*-Region (BP) wird die Exon-Intron-Bindung an der 5'-Spleißstelle (SS) geöffnet und das Intron nimmt eine Lasso-ähnliche Struktur ein. In einem zweiten Schritt wird die Exon-Intron-Bindung an der 3' Spleißstelle geöffnet, das Intron wird freigesetzt und die Exons werden miteinander verknüpft.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Spleißreaktion ist die räumliche Nähe zwischen den reaktiven Gruppen, d. h. den Intron-Exon-Grenzen und dem Verzweigungspunkt. Sie wird durch ein Netzwerk von prä-mRNA/snRNA-Interaktionen vermittelt, wobei der Aufbau des Spleißosoms schrittweise erfolgt. Zunächst bindet U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle (s. Abb. 1.2). Anschließend tritt ein RNA-bindendes Protein mit der Bezeichnung U2AF in den Zyklus ein, dieses besteht aus zwei Untereinheiten. Während die größere Untereinheit zwischen der Verzweigungsstelle und der pyrimidinreichen Sequenz bindet, nimmt die kleinere Untereinheit Kontakt zum TAG-Motiv der 3'-Spleißstelle auf. Anschließend wird U2AF von U2-snRNP verdrängt und letzteres bindet an die Verzweigungsstelle. Der Adenosin-Rest nimmt nicht an der Basenpaarung teil und ragt aus dem kurzen RNA-Doppelstrang heraus. Die snRNP U6 und U4 sind über ausgedehnte Wasserstoffbrücken miteinander verbundenen und trennen sich in diesem Stadium voneinander. U6-snRNP verdrängt das an der 5' Exon-Intron-Grenze gelegene U1-snRNP. U5-snRNP interagiert mit den beiden Exons, wodurch die nötige Oberfläche geschaffen wird, auf der sie während der Ligation zusammengehalten werden (SILICIANO und GUTHRIE, 1988; QUERY et al., 1994; KANDELS-LEWIS und SERAPHIN, 1993; LESSER und GUTHRIE, 1993; NEWMAN, 1994; WISE, 1993).

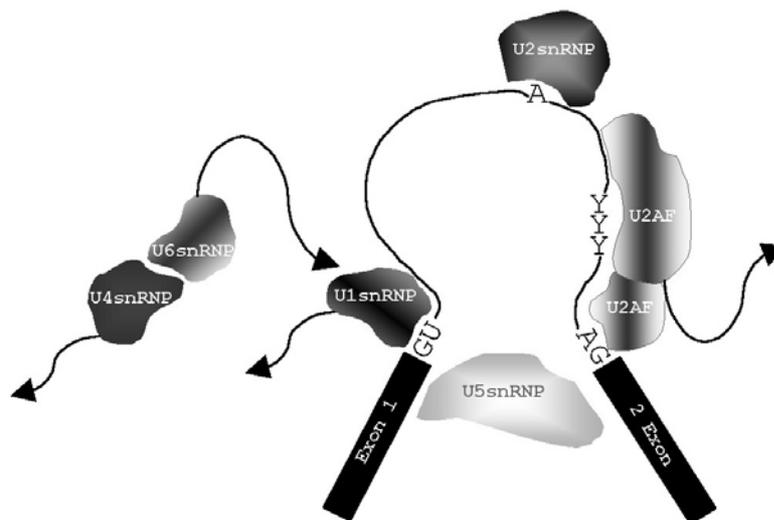


Abb. 1.2: Aufbau des Spleißosoms.

Dargestellt ist eine aus zwei Exons und einem Intron bestehende prä-mRNA. Das kleine Ribonukleoprotein-Partikel (snRNP) U1 bindet an die 5'-Spleißstelle. Nach Anlagerung des Spleißfaktors U2AF an die pyrimidinreiche Region bzw. an die 3'-Spleißstelle, bindet das U2 snRNP an die Verzweigungsstelle. Nachdem sich die miteinander verbundenen snRNP U4 und U6 voneinander getrennt haben, verdrängt U6snRNP das U1 snRNP U1-snRNA und bindet an die 5'-Spleißstelle. U5 snRNP hält die beiden Exons zusammen. Pfeile markieren die Richtung in den bzw. aus dem Kreislauf.

Die Differenzierung zwischen Exons und Introns sowie die genaue Definition der Exon-Intron-Grenzen ist ein weiterer wichtiger Parameter des prä-mRNA-Spleißens. Die insbesondere bei Vertebraten schwach konservierten Sequenzmotive an den Spleißstellen kommen auch an anderen Stellen im Transkript vor. Daher ist es notwendig, dass der Spleißapparat die zum Teil extrem langen intervenierenden Sequenzen von den kürzeren Exon-Sequenzen unterscheiden kann. Bei der Identifizierung korrekter Spleißstellen spielt die Nähe zu den Exons eine wichtige Rolle (BREITBART et al., 1987; MOORE und SHARP 1993). Innerhalb der Exons finden sich Sequenzmotive, sog. Exon-Spleiß-*Enhancer* (ESE), die das Spleißen verstärken (MANIATIS und TASIC, 2002 b). Diese ESE werden von einer Familie essentieller Spleißfaktoren erkannt, die als Spleiß-regulative (SR)-Proteine bezeichnet werden. Vermutlich wird die Spleiß-maschinerie von den SR-Proteinen an nahe gelegene Spleißstellen rekrutiert (GRAVELEY et al., 1999). Auch die Kopplung von Transkription und Spleißen trägt zur Spezifität der Spleißreaktion bei. Dabei gelangen SR-Proteine an die größte

Untereinheit der RNA-Polymerase II und leiten durch Interaktion mit dem naszierenden Transkript den Aufbau des Spleißosoms ein (FONG und ZHOU, 2001).

1.2.3 Alternatives Spleißen

Beim konstitutiven Spleißen werden die prä-mRNAs in festgelegter 5'-3'-Reihenfolge gespleißt. Beim alternativen Spleißen hingegen kann eine prä-mRNA auf verschiedene Weise gespleißt werden. Ein Primärtranskript enthält zahlreiche Regionen, an denen es alternativ gespleißt werden kann, wodurch sich die Anzahl möglicher mRNA-Isoformen potenziert. Die Vielfalt des alternativen Spleißens reicht vom Überspringen eines Exons, Auswahl unterschiedlicher 5'- und 3'-Spleißstellen, Einfügen oder Überspringen mehrerer Exons bis zur Beibehaltung des Introns (CARTEGNI et al., 2002). Die Organisation regulatoriver Sequenzmotive innerhalb der Exons und Introns sowie das Verhältnis von positiv- zu negativ-regulierenden Proteinen bestimmen, welche Spleißstelle während der Reaktion genutzt wird (MANIATIS und TASIC, 2002 b). Insbesondere in differenzierten oder in solchen Zellen, die relativ schnell auf äußere Stimuli reagieren müssen, wie z. B. Muskel- oder Nervenzellen, findet das alternative Spleißen statt (BREITBART et al., 1987). Es ist ein weit verbreiteter Mechanismus in höheren Eukaryoten, der auch in Plasmodien nachgewiesen wurde (KNAPP et al., 1991). In Vertebraten wird jedes zwanzigste Gen alternativ gespleißt (SHARP, 1994). Besonders in *Mammalia* bietet dieser Mechanismus eine Erklärung für die Komplexität des Proteoms (CARTEGNI et al., 2002). Auch die Protein-Diversität zwischen verschiedenen Metazoa wird in Zusammenhang mit dem alternativen Spleißen gebracht, so weist das Human-Genom ca. 35.000 Gene auf (VENTER et al., 2001) und ist damit nur um ca. ein Drittel größer als das Genom von Würmern (MANIATIS und TASIC, 2002 b).

1.2.4 Autokatalytisches Spleißen

Ein besonderer Spleiß-Mechanismus vollzieht sich in den Organellen verschiedenster Organismen. Hier werden einige RNA-Moleküle ohne Beteiligung von Proteinen gespleißt, ein Vorgang, der als autokatalytisches Spleißen bzw. Selbstspleißen bezeichnet wird. Man unterscheidet zwei Typen von Introns, die autokatalytisch entfernt werden. Die Gruppe I-Introns kommen in den Zellkernen von Ciliaten und Schleimpilzen vor, in den Mitochondrien einzelner Pilze bzw. in Chloroplasten einiger Pflanzen, in manchen Genen des Bakteriophagen T4 sowie

in tRNA-Primärtranskripten einiger Eubakterien (CECH, 1986). Gruppe II-Introns finden sich in den Genen der Mitochondrien und Chloroplasten von Pflanzen, Pilzen, der Hefe und Eubakterien. Das autokatalytische Spleißen beider Introns ist eine Folge von zwei Reaktionen. Für den ersten Schritt der Entfernung eines Gruppe I-Introns wird Guanosin benötigt, das zwar an eine bestimmte Stelle im Intron gebunden wird, aber kein Bestandteil der RNA-Kette ist und bei der Spleißreaktion als Co-Faktor wirkt. Durch interne Basenpaarungen kann sich dieser Intron-Typ so falten, dass die beiden zu verbindenden Exons eng nebeneinander liegen. Der Angriff der freien 3'-Hydroxylgruppe des Guanosin-Restes führt zur Öffnung der Phosphodiesterbindung an der 5'-gelegenen Spleißstelle. Dadurch entsteht am Ende des 5'-Exons eine freie 3'-Hydroxylgruppe, die zur Öffnung der 3'-Spleißstelle beiträgt. Anschließend werden die Exons über eine 5'-3'-Phosphodiesterbrücke verbunden (BASS und CECH, 1984; LODISH et al., 1996). Das Entfernen der Gruppe II-Introns weist mechanistische Ähnlichkeiten zu den Reaktionen der nuklearen Introns auf (s. 1.2.2). Die Gruppe II-Introns enthalten ebenfalls ein Adenosin-Nukleotid, das als Verzweigungspunkt fungiert. In dem ersten Schritt der Reaktion übernimmt dieser Adenosin-Baustein den nukleophilen Angriff auf die 5'-Spleißstelle und es kommt auch hier zur Ausbildung der Lasso-Struktur (PEEBLES et al., 1986; CHU et al., 2001; ZHANG und DOUDNA, 2002). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten geht man davon aus, dass insbesondere die Reaktionen der Gruppe II eine evolutionäre Vorstufe des nuklearen Spleißens darstellen (MOORE und SHARP, 1993).

1.3 Genexpression in Protozoen

Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass die an der Genexpression beteiligten Mechanismen in Protozoen denen höherer Eukaryoten-Zellen grundsätzlich ähneln, dennoch treten einige Besonderheiten auf.

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit aus der Klasse *Coccidea* innerhalb des Unterstammes *Apicomplexa*. Als Erreger der Toxoplasmose des Menschen und von Haustieren hat dieser Einzeller eine wichtige Bedeutung. Die schnell replizierenden Stadien können unter relativ geringem Aufwand in Vertebraten-Zell-Linien gehalten werden, weshalb *Toxoplasma* als Modellorganismus für die Biologie der *Apicomplexa* dient. Die Tatsache, dass die replikativen Stadien haploid sind, trug nach der Entwicklung sehr erfolgreicher

Transfektionsmethoden dazu bei, dass genetische Studien in *Toxoplasma* im Vergleich zu denen anderer Protozoen relativ weit fortgeschritten sind (CORNELISSEN et al., 1984; SOLDATI und BOOTHROYD, 1993; DONALD und ROOS, 1993). Der G/C-Gehalt kodierender Regionen beträgt in den Genen von *Toxoplasma* ca. 50-55 % (JOHNSON, 1990). Die Mehrheit der Gene liegt in Einzelkopien vor, die Transkription von mRNA-Genen wird vermutlich von einer DNA-Polymerase II vermittelt und es liegen keine Evidenzen für eine polycistronische Transkription oder *trans*-Spleißen vor (NAGEL und BOOTHROYD, 1988). Viele der Protein-kodierenden Gene enthalten maximal ein Intron. Das Dihydrofolat-Reduktase-Gen bildet eine Ausnahme, seine kodierende Region ist von zahlreichen Introns unterbrochen (ROOS, 1993). Die 5'-untranslatierten Regionen (UTR) der polyadenylierten mRNA umfassen zwischen 100 und 500 Bp. Terminationssignale wurden bislang nicht charakterisiert (SIBLEY und HOWE, 1996) und in den meisten *Toxoplasma*-Genen fehlen die typischen Promotorelemente höherer Eukaryoten (NAKAAR et al., 1998).

In *Plasmodium falciparum* sind molekulare und genetische Studien wenig fortgeschritten, da nur die intraerythrocytären Stadien kontinuierlich kultiviert werden können, was die Entwicklung von Transfektionsmethoden erschwert. Es können mittlerweile DNA-Sequenzen in die Ring-Stadien von *Plasmodium* eingebracht und eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination erzielt werden. Dennoch ist die Anzahl der Untersuchungen zum strukturellen Aufbau von Promotorregionen begrenzt (CRABB und COWMAN, 1996; WU et al., 1995; PORTER, 2002). Insbesondere die Produkte dreier Multigen-Familien sind für die Antigenvariation verantwortlich, mit der sich die intrazellulären Stadien von *Plasmodium* der Immunantwort des Wirtes entziehen. Anhand des wichtigen Membran-Proteins PfEMP1 wurden die meisten Studien zur Genexpression durchgeführt (DEITSCH et al., 2001; VASQUEZ-MACIAS et al., 2002; DUFFY et al., 2003). Die Sequenzierung des nuklearen *P. falciparum*-Genoms ist abgeschlossen. Einige Gene weisen ungewöhnlich lange 5'-Regionen auf, wobei die 5'-UTR in manchen Fällen 900 Bp oder 1760 Bp umfassen kann (LANZER et al., 1992 a; PORTER, 2002). Dieses bislang A/T-reichste sequenzierte Genom (81 %), besteht aus ca. 5.300 Genen, die auf 14 Chromosomen verteilt sind (GARDNER et al., 2002).

Afrikanische Trypanosomen werden innerhalb des Säugetierblutes mit zahlreichen Angriffen des Wirt-Immunsystems konfrontiert. Durch Antigenvariation sind die Trypanosomen in der Lage, der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Jede Population exprimiert ein individuelles, variables Oberflächenantigen, das sog. VSG (*variant surface glycoprotein*). Dieses bildet auf der Zelloberfläche der Parasiten ein einheitliches Muster von Epitopen, welche Antikörperantworten hervorrufen können. Jedes VSG kann spontan durch ein anderes ersetzt werden. Auf diese Weise sind die Trypanosomen der Antikörperantwort stets einen Schritt voraus und sichern ihr langfristiges Überleben im Wirt. Der genetische Mechanismus des VSG-Wechsels ist noch nicht vollständig bekannt. Man geht davon aus, dass die meisten Antigenvariationen durch Genkonversionen entstehen. Ein aktives VSG-Gen enthält stets eine transponierte, duplizierte Genkopie, die in die Nähe der Telomere wandert. Nur an diesen Telomer-nahen Orten ist eine Genexpression möglich. Nach einer von 10^6 Zellteilungen wird ein neues VSG-Gen aktiv (BORST und GREAVES, 1987; LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997; DONELSON et al., 1998).

1.3.1 RNA-Prozessierungsmechanismen in Kinetoplastiden

In Kinetoplastiden erfolgt die Transkription Protein-kodierender Gene polycistronisch, d.h. das Primärtranskript ist ko-linear zur genomischen Sequenz. Im Verlauf der mRNA-Reifung bzw. Bildung monocistronischer mRNAs kommt es zur Entfernung der intergenischen Regionen und Prozessierung der 5'- und 3'-Enden. Die intergenischen Regionen umfassen höchstens einige hundert Basenpaare. Innerhalb dieser Sequenzen befinden sich die Signale, welche für das korrekte Prozessieren der primären mRNA notwendig sind. Bislang wurden in den Genen der Kinetoplastiden keine Introns identifiziert.

1.3.1.1 Trans-Spleißen

Reife mRNA-Moleküle der Kinetoplastiden sind an ihrem 5'-Ende durch die identische Sequenz einer 35 Nukleotide umfassenden Spleiß-Leitsequenz (SL) gekennzeichnet. Diese wird von Transkriptionsabschnitten kodiert, die in zahlreichen Kopien im Genom vorkommen („Mini-Exons“). Sie liegen auf Chromosomen, die sich abseits der Protein-kodierenden Gene befinden. Die primären Transkripte dieser Mini-Exons tragen eine typische 5'-Spleißstelle. Die

Protein-kodierenden mRNAs enthalten als Gegenstück stromaufwärts des offenen Leserahmens eine 3'-Spleißstelle. Die Verbindung der SL mit der prä-mRNA wird als *trans*-Spleißen bezeichnet (MURPHY et al., 1986; SUTTON und BOOTHROYD, 1986; LAIRD et al., 1987). Das *trans*-Spleißen erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die unterhalb der SL gelegene 5'-Spleißstelle geöffnet. Das neu generierte 5'-Ende des Introns wird über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung an den Adenosin-Rest der Verzweigungsstelle ligiert, wodurch ein gabelförmiges Intermediat entsteht. Im zweiten Schritt wird das SL-Exon kovalent an das 5'-Ende der kodierenden mRNA gebunden und das Intron wird freigesetzt. Das *trans*-Spleißen weist mechanistische Ähnlichkeiten zum *cis*-Spleißen auf (s. 1.2.2), und die daran beteiligten snRNAs zeigen Homologien zu den Vertebraten-snRNAs (TSCHUDI und ULLU, 1990). Auch in Nematoden (KRAUSE und HIRSH, 1987), Trematoden (RAJKOVIC et al., 1990) und Euglenoiden (TESSIER et al., 1991) wurde das *trans*-Spleißen beobachtet. Analog zu den 3'-Spleißstellen der Vertebraten-Introns enthält die intergenische Region des primären Transkriptes eine Verzweigungsstelle, eine Pyrimidin-Sequenz variabler Länge sowie ein invariantes AG-Dinukleotid (PATZELT et al., 1989; MATTHEWS et al., 1994; LEBOWITZ et al., 1993). Die letzteren beiden Motive sind an der Kontrolle des *trans*-Spleißen beteiligt (SCHÜRCH et al., 1994). Nach Modifikation des 5'-Endes durch das *trans*-Spleißen werden an das 3'-Ende der mRNA Adenylatreste polymerisiert. In den Transkriptionseinheiten der Kinetoplastiden fehlen bekannte *cis*-aktive Promotor-Elemente

1.3.1.2 RNA-Edition

Die Expression zahlreicher Mitochondrien-Gene erfordert in Kinetoplastiden einen einzigartigen posttranskriptionellen Prozessierungsvorgang, der als RNA-Edition bezeichnet wird. Einige Primärtranskripte, denen die komplette kodierende Information fehlt, werden erst durch präzise Addition oder Deletion von Uridinen in translatierbare mRNAs konvertiert (BENNE et al., 1986). Die Funktion dieses Mechanismus ist noch ungeklärt. An dem Vorgang sind Strukturen der mitochondrialen DNA beteiligt. Diese DNA setzt sich aus einem Netzwerk von zirkulären, topologisch ineinander gewundenen Molekülen zusammen, das als Kinetoplast-DNA (kDNA) bezeichnet wird. Die zirkulären Moleküle lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die Maxizirkel kodieren zum großen Teil für Proteine des mitochondrialen Energiemetabolismus. Die Minizirkel

hingegen kodieren für kleine *guide*-RNAs (gRNA) (SHAPIRO und ENGLUND, 1995; STUART und FEAGIN, 1992; STURM und SIMPSON, 1990). gRNA-Moleküle sind komplementär zu den editierten Domänen der prozessierten mRNAs und haben damit eine Matrizen-ähnliche Funktion bei der Enzym-vermittelten Editions-Reaktion. Die chemischen Prozesse, bei denen es zur Hydrolyse und anschließender Religation der Phosphat-Rücken kommt, finden unter Beteiligung zahlreicher Proteine innerhalb eines Ribonukleoprotein-Komplexes statt (GÖRINGER et al., 1994; MÜLLER et al., 2001).

1.4 Charakteristika des *E. histolytica*-Genoms

Die molekulare Grundlagenforschung zur Charakterisierung des *E. histolytica*-Genoms ist im Vergleich zu anderen parasitischen Protozoen deutlich weniger fortgeschritten. Die Transkription der *E. histolytica*-Gene verläuft monocistronisch, wobei die generierten 5'- und 3'-untranslatierten Regionen sehr kurz sind und nur wenige Basenpaare umfassen. Die mRNA ist polyadenyliert (BRUCHHAUS et al., 1993) und eindeutige Terminationssequenzen wurden bislang nicht identifiziert. Das Genom weist, ähnlich wie in Plasmodien, einen hohen Gesamt-A/T-Gehalt von 78 % auf (GELDERMAN et al., 1971; POLLACK, 1982). Die intergenischen Regionen sind mit einer Länge von 100 bis 2000 Bp außergewöhnlich kurz (PETTER et al., 1992; BRUCHHAUS et al., 1993; WILLHOEFT et al., 2001). Abgesehen von einer modifizierten TATA-Box zeichnen sich die Gene durch das Fehlen bekannter und durch das Vorhandensein spezifischer Promotorelemente aus (BRUCHHAUS et al., 1993; BUß et al., 1995; PURDY et al., 1996). Die Identifizierung eines *u6-snRNA*-Gens lieferte den ersten Hinweis auf ein funktionelles Spleißosom in *E. histolytica*. Es wurden bislang jedoch nur fünf Gene identifiziert, deren kodierende Regionen durch Introns unterbrochen sind (LOHIA und SAMUELSON, 1993; PLAIMAUER et al., 1994; URBAN et al., 1996; SANCHEZ-LOPEZ et al., 1998; WILLHOEFT et al., 1999 b). Im Verlauf einer EST-Studie wurde das Intron eines *rpl27a*-Gens von *E. histolytica* identifiziert. Es zeigte sich, dass die *rpl27a*-mRNA im Trophozoiten einen Anteil von 3 % an der Gesamt-mRNA trägt (WILLHOEFT et al., 1999 a). Das ribosomale Protein L27A ist ein Bestandteil der großen Untereinheit eukaryotischer Ribosomen. Während der Proteinsynthese übt es eine Vielzahl struktureller und funktioneller Interaktionen mit der großen Untereinheit aus und spielt vermutlich eine Rolle bei der Peptid-Elongation (GARWOOD und LEPESANT, 1994; UNDERWOOD und FRIED, 1990; NYGARD et

al., 1987). Die im Tierreich beschriebenen *rpl27a*-Gene weisen ein charakteristisches Merkmal auf, das auch in den *rpl27a*-Genen von *E. histolytica* vorkommt: das Vorhandensein eines positionell konservierten Introns, welches stets unmittelbar stromabwärts des ATG-Startcodons lokalisiert ist.

1.5 Introns in Protozoen

Innerhalb des eukaryotischen Reiches stellen die Protisten eine verhältnismäßig wenig untersuchte Gruppe dar. Studien in Bezug auf die Genomorganisation bzw. die Transkriptionsregulation beschränken sich vor allem auf solche Einzeller, die human-pathogen sind. Insbesondere zur Struktur von Introns liegen in Protisten wenige Informationen vor. Eine Ursache hierfür ist die Tatsache, dass die Protisten-Genomprojekte noch weitgehend unvollständig sind und adäquate Programme zur Identifizierung von Introns in den Datenbanken fehlen.

Kenntnisse der Exon-Intron-Struktur einer genomischen Sequenz sind für das Zusammenfügen einzelner offener Leserahmen bzw. die Identifizierung neuer Gene von großer Bedeutung. Ein relevantes, praxisbezogenes Beispiel lieferte die unzulängliche Auswertung von Sequenzdaten in *P. falciparum*. Da das *Plasmodium*-Genom aus zahlreichen kleinen Exons besteht und man die Anzahl von Introns lange Zeit unterschätzte, wurden einige Gene ganz einfach übersehen. So blieb das *P. falciparum*-Gen *pfcr1*, das mit einer Chloroquin-Resistenz assoziiert wird, lange Zeit unentdeckt (FIDOCK et al., 2000). Mittlerweile ist die Sequenzierung des Plasmodien-Genoms abgeschlossen. In 54 % der Gene sind Introns enthalten, die eine durchschnittliche Länge von ca. 180 Bp sowie einen A/T-Gehalt von 86 % aufweisen (GARDNER et al., 2002). An den Intron-Grenzen finden sich die klassischen Konsensussequenzen eukaryotischer Introns, die Sequenz einer Verzweigungsstelle konnte bislang nicht identifiziert werden (VINKENOOG et al., 1995). Im Gegensatz dazu enthalten die bislang in *Toxoplasma sp.* bekannten Gene relativ wenig Introns (WAHLGREN et al., 1999). In Trypanosomatidien-Genen sind bislang keine Introns identifiziert worden. *Trichomonas vaginalis* und *Giardia lamblia* stellen Vertreter der Klassen *Parabasalae* bzw. *Diplomonadea* dar und werden, ebenso wie *E. histolytica*, aufgrund von rRNA-Sequenz-Analysen sowie dem Fehlen typischer eukaryotischer Organellen als sehr ursprüngliche Eukaryoten eingestuft (DACKS und DOOLITTLE, 2001). Die *Parabasalae* stellen darüber hinaus die einzigen

Eukaryoten dar, in denen trotz ausreichender Sequenzinformationen bislang keine Introns identifiziert wurden (LISTON und JOHNSON, 1998). Auch das fortgeschrittene Genomprojekt von *Giardia* führte bislang nur zur Entdeckung eines Introns (NIXON et al., 2002). In den Genen von *E. histolytica* wurden bislang 5 Introns identifiziert (s. 1.4). In den kodierenden Regionen von *Encephalitozoon cuniculi*, ein Vertreter der Klasse *Microspora*, wurde nur eine intervenierende Sequenz entdeckt (BIDERRE et al., 1998). In später verzweigenden Protisten wie *Paramecium aurelia* oder *Tetrahymena thermophila* hingegen enthalten ca. 1 % der Gene intervenierende Sequenzen (SOGIN und SILBERMAN, 1998; PEYRET et al., 2001).

1.6 Zielsetzung

Die molekularen Grundlagen der Genomorganisation sowie der Genexpression in *E. histolytica* sind noch nicht ausreichend geklärt. Die Festlegung offener Leserahmen und die Identifizierung neuer Gene aus Sequenzdaten des fortgeschrittenen *E. histolytica*-Genomprojektes wird durch einige Parameter erschwert. So sind intergenische Regionen sehr kurz, und der hohe Gesamt-A/T-Gehalt provoziert zahlreiche Stopcodons. Zusätzlich erschwert das Vorhandensein intervenierender Sequenzen die Erkennung offener Leserahmen, da bislang keine Informationen zum Aufbau von Introns in *E. histolytica* vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen ungeklärte Fragen in Bezug auf die Genorganisation sowie die Genregulation des archaischen Protozoons *E. histolytica* geklärt werden. Hierzu sollen die Charakterisierung von Introns sowie Analysen zur Genexpression durchgeführt werden. Es sollen Introns in den Genen von *E. histolytica* identifiziert und ermittelt werden, ob die entsprechenden primären Transkripte *in vitro* gespleißt werden. Mögliche Konsensussequenzen innerhalb der intervenierenden Sequenzen sollen bestimmt und ihre Relevanz für den Spleißvorgang soll ermittelt werden. Am Beispiel der Intron-haltigen *rpl27a*-Gene von *E. histolytica*, deren mRNA einen hohen Anteil an der Gesamt-mRNA im Trophozoiten ausmacht, soll ermittelt werden, ob das Vorhandensein der Introns, deren Position im Tierreich stark konserviert ist, einen Einfluss auf die Expressionsstärke ausübt. Weiterhin sollen Mitglieder der *rpl27a*-Genfamilie hinsichtlich ihrer Expressionsstärke untersucht und der Einfluss 5'- und 3'-*rpl27a*-flankierender Regionen auf die Genexpression ermittelt werden. Zudem soll eine Analyse der Promotorregion durchgeführt und mögliche regulative Sequenzmotive identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:	dNTP Set
Becton Dickinson, Cockeysville, USA:	Trypton, Hefeextrakt, Trypticase Pepton
Biomol, Hamburg:	Tris-gesättigtes Phenol, Glycerin, HEPES
GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe:	Agarose, TRIzol [®] -Reagenz, <i>Low-Melting-Point</i> -Agarose
JRH Biosciences, Lenexa, USA:	„Diamond Vitamin Tween 80 Solution“ (40 x)
Roche Diagnostics, Mannheim:	Reduziertes Glutathion, ATP, Ampicillin, Glykogen
Sanaiva, Werne:	Streptomycin
Stratagene, La Jolla, Californien:	IPTG

2.1.2 Weitere Materialien

Ambion, Huntingdon, UK:	Spin Columns
Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA:	Kulturflaschen (50 ml, 250 ml)
BRL Gaithersburg, MD, USA:	Horizont [™] 58- Agarosegelelektrophorese- Kammern
Eurogentec, Seraing, Belgien:	Elektroporationsküvetten (Durchmesser: 0,4 cm)
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe:	TOPO TA Cloning [™] Kit, TOP10 One Shot [™] Kit, Easy-DNA [™] Kit
MBI Fermentas, St. Leon-Rot:	6 x Loading Dye Solution

Millipore, Bedford, USA:

Promega, Mannheim:

Roche Diagnostics, Mannheim:

QIAGEN, Hilden:

Sterilfilter Sterivac™

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

High Pure PCR Purification Kit

QIAprep® Spin Miniprep Kit,

QIAGEN-tip 2500-Säulen

2.1.3 Spezielle Geräte

BIORAD, München:

EG&G Berthold, Bad Wildbad:

Hybaid, Ulm:

PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim:

UV-Transilluminator,

Gene Pulser™

Junior Luminometer

PCR Sprint, Temperature Cycling System

GeneAmp PCR System 2400

2.1.4 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe:

New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.:

Promega, Mannheim:

Roche Diagnostics, Mannheim:

Stratagene, La Jolla, Californien:

Restriktionsenzyme (3-20 U/μl),
CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 20 U/μl),
Taq-Polymerase (5 U/μl)

Super Script™ II, RNase H⁻,
Reverse Transkriptase

Restriktionsenzyme (3-20 U/μl),
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/μl),
T4-DNA-Ligase (3 U/μl),
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 1 U/μl)

DpnI (10 U/μl),

Pwo DNA-Polymerase (5 U/μl)

Pfu Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/μl)

2.1.5 Marker

MBI Fermentas, St. Leon-Rot:

DNA-Längenstandard

„Gene Ruler™ 1kb Ladder“,

„Gene Ruler™ 100bp Ladder“

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies synthetisiert, auf eine Konzentration von 10 μ M eingestellt und bei -20 °C gelagert. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet. Unterstrichene Bereiche heben die Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen hervor, die zu Klonierungszwecken eingefügt wurden. Die Sequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben.

1 Amplifizierung der Reportergene (*luc+* und *rluc*)

Luc ⁺ 5'-S 32 (Kpn I)	<u>TTGGTACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG</u>
Luc ⁺ 3'-AS 32 (Bam H I)	TTAGGATCCTTTACAATTTGGACTTTCCGCC
Rluc 5'-S 32 (Kpn I)	<u>GAGGTACCATGACTTCGAAAGTTTATGATCCA</u>
Rluc 3'-AS 33 (Bam H I)	AATGGATCCTTATTGTTTCATTTTTGAGAACTCG
Rluc/StyI-S 26	<u>CCTAGGCTTCGAAAGTTTATGATCC</u>
Rluc/XbaI-AS 27	<u>CTCTAGATTGTTTCATTTTTGAGAACTC</u>
Rluc/Pst I-AS 27	<u>CCCTGCAGAAAGTTTATGATCCAGAAC</u>

2 Amplifizierung der 5'- und 3'-flankierenden Regionen unterschiedlicher *rpl27a*-Gene

ehrp127a-1-5'-S 29	<u>ATAAGCTTAAAAAGAACTAAATCGTGGAG</u>
ehrp127a-1-5'-AS 32	ATCTGCAGCCTAGGGAATTAAGTAATTGAAAC
gehrp127a-1-5'(Pst I)-AS 32	<u>GGCTGCAGCATTGATTCCCTTTGTTTTTAAAAG</u>
ehrp127a-2-5'-S 28	<u>ATAAGCTTAAACACAAATCGGACACCATC</u>
ehrp127a-2-5'-AS 32	ATCTGCAGCCTAGGTAATTAGTATTTCTTTTG
gehrp127a-2-5'(Pst I)-AS 29	<u>CCCTGCAGCATTAAAGATTCCCTTTGCAAC</u>
ehrp127a-3-5'-S 29	<u>ATAAGCTTCTGATGAAATTAACTTCACC</u>
ehrp127a-3-5'-AS 29	ATCTGCAGCCTAGGTATGTTAATTTCTTT
gehrp127a-3-5'(Pst I)-AS 27	<u>GGCTGCAGCATGACTGCTTTGCAAAG</u>
ehrpL27a-1-3'-S 27	<u>ATTCTAGATAATTGATTTCTTGTTTTT</u>
ehrpL27a-1-3'-AS 23	ATGGATCCCTACAGAGTAAAAAC
ehrpL27a-2-3'-S 25	<u>ATTCTAGATAATTGGGGATTTTTGG</u>
ehrpL27a-2-3'-AS 23	ATGGATCCCAACAACAATATAC
ehrpL27a-3-3'-S 25	<u>CTCTAGATAATTGGATCTTATTATC</u>
ehrpL27a-3-3'-AS 30	<u>CGGATCCTTTTGCCATTTTA</u>

gehrpl27a-4-3'-S 31	<u>ATCTAGATAA</u> TTGAGATAAATTTGAAAAGAAG
gehrpl27a-4-3'-AS 24	AT <u>GGATCC</u> CCAACAACAATAATC
gehrpl27a-1-5'(Pst I)-AS 32	GGCTGCAGCATTGATTCCTTTGTTTTAAAAG
gehrpl27a-2-5'(Pst I)-AS 29	CCCTGCAGCATTTAAGATTCCTTTGCAAC
gehrpl27a-3-5'(Pst I)-AS 27	GGCTGCAGCATGACTGCTTTGCAAAG

3 Amplifizierung der 3'-flankierenden Regionen eines Aktin-Gens

ehAc3'-Xba S 25	GTCTAGATAA <u>TACTTT</u> CTCATTG
ehAc3'-Bam AS 25	<u>CGGATCC</u> GTCTCTCTTCATCTC

4 Amplifizierung unterschiedlich langer 5'-Regionen des *rpl27a-1*-Gens

ehrpL27a-1-5'/-464 S 26	CTAAGCTTAAATTATTGGAAAAGATC
ehrpL27a-1-5'/-372 S 27	CTAAGCTTATAATGATTCTATTAAGCC
ehrpL27a-1-5'/-278 S 28	ATAAGCTTCACATATAAAAGATAAATGG
ehrpL27a-1-5'/-189 S 30	CAAAGCTTCTATAATAATTAATACTATTAC
ehrpL27a-1-5'/-157 S 29	CCAAGCTTTCAATTTAACTATTAGTTATC
ehrpL27a-1-5'-Del 66 S 31	GGAAGCTTGTTAATTTATAATAAAATAGTTG
ehrpL27a-1-5'-Del 44 S 29	GGAAGCTTGTAGGGTTATAAAGAAAAAAG
ehrpL27a-1-5'/13 S 27	GGAAGCTTCAAAGGAATCAATGGTTTG

5 Sequenzierungen

M13F	CGACGTTGTAACGACGGCCAGT
M13R	ACACAGGAAACAGCTATGACCATG
Rluc pos.32 AS 20	CTGCGGACCAGTTATCATCC

6 Mutation des AGGGTT-Motifs im Promotor des *rpl27a-1*-Gens

rpL27a-1-5'mut AGGGTT-S50
GTTAATTTATAATAAAATAGTTGTGGATCCATAAAGAAAAAGAACTTTT

rpL27a-1-5'mut AGGGTT-AS50
AAAAGTTCTTTTTCTTTATGGATCCACAACATTTTTATTATAAATTAAC

7 RT-PCR

ehrpL27a-5'UTR S-18	GGGCAAAGGAATCAATGG
ehrpL27a-5'UTR artif. S-20	GGGCAAAGGAATCAATGCTG

Rluc pos 99 AS-20 GAATCAAGAACATTCATTTG
 Rluc pos 212 AS-19 CTGGCTCAATATGTGGCAC

8 Linker-Scanning-Mutagenese

rpL27a-1-5'-Sty I mut S 42 TTGTTTCAATTACTTAATTCTTTAGGCTTCGAAAGTTTATA
 rpL27a-1-5'- Sty I mut AS 42 TCATAAACTTTTGAAGCCTAAAGAATTAAGTAATTGAAACAA
 rpL27a-1 intron mut GTTT cons S50 TTAAAAACAAAGGAATCAATGGTACCTTTATTACCTCTTTATTCAAATT
 rpL27a-1 intron mut GTTT cons AS50 AATTTGAAATAAAGAGGTAATAAAGGTACCATTGATTCCTTTGTTTTTAA
 rpL27a-1 intron mut2-6 S50 TTAAAAACAAAGGAATCAATGGGATCCTTATTACCTCTTTATTCAAATT
 rpL27a-1 intron mut2-6 AS50 AATTTGAAATAAAGAGGTAATAAAGGATCCATTGATTCCTTTGTTTTTAA
 rpL27a-1 intron mut7-12 S50 CAAAGGAATCAATGGTTTGTGGATCCCCTCTTTATTCAAATTTGTTTCA
 rpL27a-1 intron mut7-12 AS50 TGAAACAAATTTGAAATAAAGAGGGATCCACAAACCATTGATTCCTTTG
 rpL27a-1 intron mut13-18 S50 GGAATCAATGGTTTGTTTATTAGGATCCTATTTCAAATTTGTTTCAATGA
 rpL27a-1 intron mut13-18 AS50 TCATTGAAACAAATTTGAAATAGGATCCTAATAACAAACCATTGATTC
 rpL27a-1 intron mut19-23 S51 CAATGGTTTGTTTATTACCTCTTTGGATCCAAATTTGTTTCAATGAAATAAT
 rpL27a-1 intron mut19-23 AS51 ATTATTTTCATTGAAACAAATTTGGATCCAAGAGGTAATAAACAAACCATTG
 rpL27a-1 intron mut25-30 S50 TTGTTTATTACCTCTTTATTTCGGATCCGTTTCAATGAAATAATTGTTTC
 rpL27a-1 intron mut25-30 AS50 GAAACAATTATTTTCATTGAAACGGATCCGAAATAAAGAGGTAATAACAA
 rpL27a-1 intron mut32-36 S51 ATTACCTCTTTATTTCAAATTTGGATCCATGAAATAATTGTTTCAATGAA
 rpL27a-1 intron mut32-36 AS51 TTCATTGAAACAATTATTTTCATGGATCCAAATTTGAAATAAAGAGGTAAT
 rpL27a-1 intron mut37-42 S50 TCTTTATTTCAAATTTGTTTCAGGATCCTAATGTTTCAATTACTTAATT
 rpL27a-1 intron mut37-42 AS50 AATTAAGTAATTGAAACAATTAGGATCCTGAAACAAATTTGAAATAAAGA
 rpL27a-1 intron mut43-48 S50 TTTCAAATTTGTTTCAATGAAAGGATCCTTTCAATTACTTAATTCTTTAG
 rpL27a-1 intron mut43-48 AS50 CTAAAGAATTAAGTAATTGAAAGGATCCTTTTCATTGAAACAAATTTGAAA
 rpL27a-1 intron mut49-54 S50 ATTTGTTTCAATGAAATAATTGGGATCCTTACTTAATTCTTTAGGCTTCG
 rpL27a-1 intron mut49-54 AS50 CGAAGCCTAAAGAATTAAGTAAGGATCCCAATTATTTTCATTGAAACAAAT
 rpL27a-1 intron mut55-60 S50 TTCAATGAAATAATTGTTTCAAGGATCCAATTCCTTTAGGCTTCGAAAGTT
 rpL27a-1 intron mut55-60 AS50 AACTTTGAAGCCTAAAGAATTGGATCCTTGAACAAATTTATTTTCATTGAA
 rpL27a-1 intron mut61-66 S50 GAAATAATTGTTTCAATTACTTTGGATCCTTAGGCTTCGAAAGTTTATGAT
 rpL27a-1 intron mut61-66 AS50 ATCATAAACTTTTGAAGCCTAAGGATCCAAGTAATTGAAACAAATTTATTC
 rpL27a-1 intron mut67-70 S50 ATGTTTCAATTACTTAATTCTGGATGCTTCGAAAGTTTATGATCCAG
 rpL27a-1 intron mut67-70 AS50 CTGGATCATAAACTTTTGAAGCATCCAGAATTAAGTAATTGAAACAAAT
 rpL27a-1 intron mut TAG S50 ATGTTTCAATTACTTAATTCTTGAGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAG
 rpL27a-1 intron mut TAG AS50 CTGGATCATAAACTTTTGAAGCCTCAAGAATTAAGTAATTGAAACAAAT

9 Klonierung verschiedener Introns aus *E. histolytica*

rpL27a-5'w/o NdeI/PstI S 13 TATGATATCTGCA

rpL27a-5'w/o NdeI/PstI AS 13 GATATCATATGCA

vsp intron NdeI/PstI S 65
 TATGGTTTGTTAGATGTATAATTGAGAAAGAAAGATGATACAAATATTTATTGTTGTTAGCTGCA

vsp intron NdeI/PstI AS 59
 GCTAACACAATAAAATATTTGTATCATCTTTCTTTCTCAATTATACATCTAACAAACCA

artif. intron brp 33 S 55TATGTTTGTTCGTCTCTTGCTTCCTTCTGGTCTATTTATGCTTTTAGCTGCA**artif. intron brp 33 AS 49**GCTAAAAGCATAAAATAGACCAGAAGGAAGCAAGAGAACAGAACAAACCA**eh39 intron NdeI/PstI S 67**TATGTTTGTAAATCTTAATGTCTATCTATTTTTCTGAAATTA AAAACTTACAAAAATAGCTGCA**eh39 intron NdeI/PstI AS 61**GCTATTTTTGTAAGTTTTTAATTTCAAGAAAAATAGAATAGACATTAAGAATTACAAACCA**ehstk1 intron NdeI/PstI S 55**TATGTTTGTTTTTGTAAATAACTTATAATATTCTTAATCTTATGTTTAGCTGCA**ehstk1 intron NdeI/PstI AS 49**GCTAAACATAAGATTAAGAATATTATAAGTTATTTAACAAAACAAACCA**ehorf0.6 intron NdeI/PstI S 80**TATGTTTGTAAATTTTTAAATTACTTTAATAACAAAAAAAAGAAATTTTTAAACTTATTATTAATTTATTTAGCTGCA**ehorf0.6 intron NdeI/PstI AS 74**GCTAAATAAATTAATAATAAGTTTTAAAAATCTTTTTTTTTGTTATTAAAGTAATTTAAAAATTAACAAACCA**eherd2 intron NdeI/PstI S 73**TATGTTTGTTTTTAATTTTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTTTAAAAATAACAATAACAACCTTAGCTGCA**eherd2 intron NdeI/PstI AS 67**GCTAAGAGTTGTTATTGTTTATTTTTAAAAAATGTTATTTCTATTTAAAAATATTAAACAAACCA**10 Mutagenese verschiedener Introns aus *E. histolytica*****rpL27a-1-brp mut 61 S50**

GAAATAATTGTTTCAATTACTTGATTCTTTAGGCTTCGAAAGTTTATGAT

rpL27a-1-brp mut 61 AS50

ATCATAAACTTTTGAAGCCTAAAGAATCAAGTAATTGAAACAATTATTTTC

rpL27a-1-brp mut 4 S48

GAAATAATTGTTTCAATTACTTAGTTCTTTAGGCTTCGAAAGTTTATG

rpL27a-1-brp mut 4 AS48

CATAAACTTTTGAAGCCTAAAGAACTAAGTAATTGAAACAATTATTTTC

eh39 intron mut 49 S 52

TCTATTTTTCTTGAAATTA AAAACTTGCAAAAAATAGCTGCAGAAAGTTTATG

eh39 intron mut 49 AS 52

CATAAACTTTCTGCAGCTATTTTTGCAAGTTTTTAATTTCAAGAAAAATAGA

ehstk1 intron mut 39 S 52

AATAACTTATAATATTCTTAATCTTGTGTTTAGCTGCAGAAAGTTTATGATC

ehstk1 intron mut 39 AS 52

GATCATAAACTTTCTGCAGCTAAACACAAGATTAAGAATATTATAAGTTATT

ehorf0.6 intron mut 55 S 53

GAATTTTTAACTTATTATTAATTTGTTTAGCTGCAGAAAGTTTATGATCCAG

ehorf0.6 intron mut 55 AS 53

CTGGATCATAAACTTTCTGCAGCTAAACAAATTAATAATAAGTTTAAAAATTC

ehorf0.6 intron mut 61 S 49

AAGAATTTTTAACTTATTATTGATTTATTTAGCTGCAGAAAGTTTATG

ehorf0.6 intron mut 61 AS 49

CATAAACTTTCTGCAGCTAAATAAATCAATAATAAGTTTAAAAATTCTT

ehorf0.6 intron mut 62 S 49

AAGAATTTTTAACTTATTATTAGTTTATTTAGCTGCAGAAAGTTTATG

ehorf0.6 intron mut 62 AS 49

CATAAACTTTCTGCAGCTAAATAAACTAATAATAAGTTTAAAAATTCTT

ehorf0.6 intron mut 66 S 47

AAAAAAAAGAATTTTTAACTTGTATTATAATTTATTTAGCTGCAGAA

ehorf0.6 intron mut 66 AS 47

TTCTGCAGCTAAATAAATTAATAACAAGTTTAAAAATTCTTTTTTTT

eherd2 intron mut 53 S 57

GAAATAACATTTTTTTTTAAATAAACAATGACAACCTTAGCTGCAGAAAGTTTATG

eherd2 intron mut 53 AS 57

CATAAACTTTCTGCAGCTAAGAGTTGTCATTGTTTATTTTTAAAAAAAATGTTATTTT

eherd2 intron mut 54 S 57

GAAATAACATTTTTTTTTAAATAAACAATAGCAACCTTAGCTGCAGAAAGTTTATG

eherd2 intron mut 54 AS 57

CATAAACTTTCTGCAGCTAAGAGTTGCTATTGTTTATTTTTAAAAAAAATGTTATTTT

artif. intron brp 10 S 55

TATGGTTTGTTCTATTTATTTGCTTCCTTCTGGTCTGTTTGTGCTTTTAGCTGCA

artif. intron brp 10 AS 49

GCTAAAAGCACAAACAGACCAGAAGGAAGCAAATAAATAGAACAAACCA

artif. intron mut 37 S 55

TATGGTTTGTTCTGTTCTCTTGCTTCCTTCTGGTCTATTTGTGCTTTTAGCTGCA

artif. intron mut 37 AS 49

GCTAAAAGCACAAATAGACCAGAAGGAAGCAAGAGAACAGAACAAACCA

2.2 Puffer und Lösungen

Die Einstellung niedriger Pufferkonzentrationen erfolgte mit A. bidest.

NaPBS (10 x)	Na ₂ HPO ₄	6,7	mM
	NaH ₂ PO ₄	3,3	mM
	NaCl	140	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt.

SSC (20 x)	NaCl	3	M
	Natriumcitrat	0,3	M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt.

TBE-Puffer (10 x)	Tris	0,89	M
	Borsäure	0,89	M
	EDTA	25	mM

TAE-Puffer (10 x)	Tris	0,4	M
	Natriumacetat	50	mM
	EDTA	20	mM

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 7,9 eingestellt.

„Cyto-Mix“	KCl	120	mM
	CaCl ₂	0,15	mM
	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	10	mM
	HEPES	25	mM
	EGTA	2	mM
	MgCl ₂	5	mM

Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch mit 2,5 mg/ml ATP und 3 mg/ml reduziertem Glutathion komplettiert.

2.3 Organismen und Expressionsvektoren

2.3.1 Bakterien

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169 (ϕ80 <i>lacZ</i>ΔM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i></i>	HANAHAN, 1983
Top10 One Shot TM	F- <i>mcr A (mrr-hsd RMS-mcr BC)80, lacZM15, lacX74, deoR, rec A1, ara D139 (araleu)7697, gal K, gal U, rps L(StrR), end A1, nup G</i>	Life Technologies, Karlsruhe

2.3.2 Amöben

Es wurde das *Entamoeba histolytica*-Isolat HM-1:IMSS verwendet. Hierbei handelt es sich um ein in Mexiko gewonnenes Patienten-Isolat, das sich seit 1967 in Kultur befindet (ATTC Nr. 30459).

2.3.3 Expressionsvektoren

Der pBS(+/-)-Vektor (Stratagene, La Jolla, Californien) bildete die Grundlage aller erstellten Luciferase-Expressions-Vektoren.

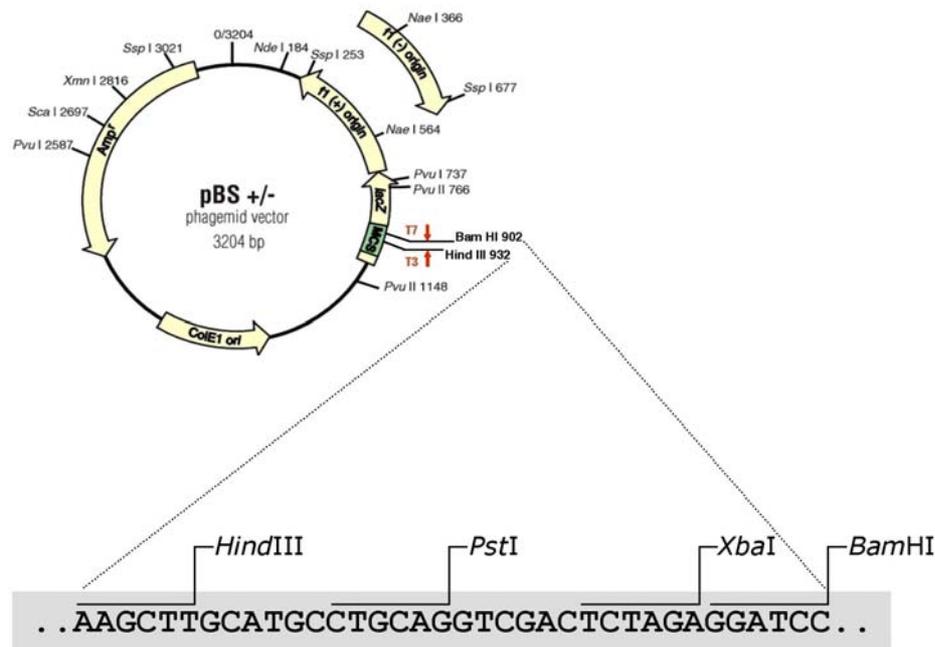


Abb. 1.3 Darstellung des Vektors pBS(+/-) (Stratagene).

Gezeigt ist der pBS(+/-)-Vektor, welcher die Grundlage der in dieser Arbeit erstellten Expressionsvektoren bildete. Weiterhin ist ein vergrößerter Ausschnitt aus dem genutzten Klonierungsbereich des Vektors dargestellt. DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *HindIII/PstI* bzw. *XbaI/BamHI* in den Vektor ligiert.

In jeder Transfektion wurde durch Co-Transfektion eines Kontrollvektors ein interner Standard mitgeführt. Das Kontrollplasmid mit dem *luc*⁺-Gen (1640 Bp) codiert für eine *Firefly*-Luciferase. Die experimentellen Plasmide hingegen enthalten ein ATG-defizientes *rluc*-Gen (930 Bp), welches für die *Renilla*-Luciferase codiert. Die Luciferase-Gene wurden aus den Vektoren pGL3 und pRL (Promega) amplifiziert. Dabei wurden an das *luc*⁺-Gen die Restriktionsschnittstellen *KpnI/BamHI* angefügt. Das *rluc*-Gen wurde mit den Restriktionsschnittstellen *StyI/XbaI* bzw. *PstI/XbaI* versehen. Das *luc*⁺-Gen des Kontrollvektors pEhLuc⁺ wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* anstelle der kodierenden Region für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) des Vektors p550L5'A3'CAT (BUSS et al., 1995) platziert.

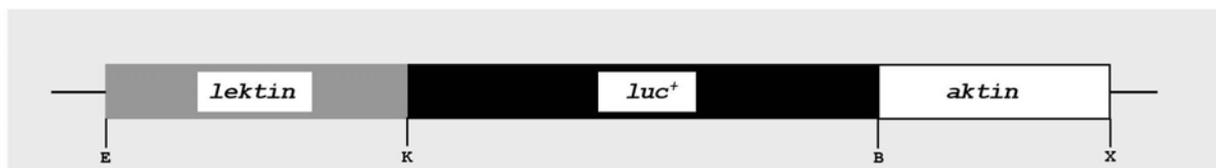
Die intergenischen Regionen der jeweiligen Gene wurden für die experimentellen Vektoren aus genomischer *E. histolytica*-DNA amplifiziert. Dabei wurden die 5'-Fragmente mit den Restriktionsschnittstellen *HindIII/StyI* und *HindIII/PstI* und die 3'-Fragmente mit den Restriktionsschnittstellen *XbaI/BamHI* versehen. Introns aus verschiedenen *E. histolytica*-Genen wurden über die angefügten

Schnittstellen *NdeI* und *PstI* in die entsprechenden Vektoren kloniert, wobei die interne *NdeI*-Schnittstelle des Vektors zuvor durch das Auffüllen des 5'-Endes (s. 2.9.4) entfernt wurde. Die Introns wurden von der Firma Life Technologies als Oligonukleotide synthetisiert. Die genomischen Sequenzen aller klonierten Bereiche aus *E. histolytica* sind unter folgenden Zugangsnummern in der GenBank™ (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) zugänglich:

<i>ehrp127a-1</i>	AJ409107
<i>ehrp127a-2</i>	AJ409108
<i>ehrp127a-3</i>	AJ3111621
<i>ehrp127a-4</i>	AJ311622
<i>ehorf0.6</i>	AJ312066
<i>eherd2</i>	AJ311623
<i>ehvsp</i>	AJ409106
<i>eh39</i>	X79133
<i>ehstk1</i>	U48386

Die Ligationen in den mit den entsprechenden Enzymen linearisierten pBS (+/-)-Vektor erfolgte wie beschrieben (s.2.9.2). Die erstellten Expressionsvektoren sind im Folgenden schematisch (exemplarisch für jede Gruppe) dargestellt und ihre Merkmale tabellarisch aufgelistet.

I) Kontrollvektor



VEKTOR	MERKMALE
pEhLuc ⁺	Das <i>luc</i> ⁺ -Gen aus <i>Photinus pyralis</i> ist am 5'-Ende von 550 Bp intergenischer Region (oberhalb des ATG's) des <i>170-kDa-lectin</i> -Gens und am 3'-Ende von 530 Bp intergenischer Region (unterhalb des Stopcodons) eines <i>aktin</i> -Gens aus <i>E. histolytica</i> flankiert.

II) Vektoren zur Ermittlung der Expressionstärke der *rpl27a*-Gene



VEKTOR	MERKMALE	5'-REGION (Bp)	INTRON (Bp)	3'-REGION (Bp)
pST1	Das ATG-defiziente <i>rluc</i> -Gen ist von der 5'-Region (bestehend aus einem 497 Bp nicht-transkribierten Bereich), dem angrenzenden Intron und von der 3'-Region des <i>rpl27a-1</i> -Gens aus <i>E. histolytica</i> flankiert.	508	70	372
pST2	wie pST1, enthält jedoch die flankierenden 5'- und 3'-Regionen des <i>rpl27a-2</i> -Gens	499	114	308
pST3	wie pST1, enthält jedoch die flankierenden 5'- und 3'-Regionen des <i>rpl27a-3</i> -Gens	400	50	427
pST4	wie pST1, enthält jedoch die flankierenden 5'- und 3'-Regionen des <i>rpl27a-4</i> -Gens	499	114	250

IIa) Expressionsvektoren zur Untersuchung der Promotorregion

VEKTOR	MERKMALE
pST1	s.o.
pST1-380	wie pST1, enthält jedoch nur 380 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-287	wie pST1, enthält jedoch nur 287 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-194	wie pST1, enthält jedoch nur 194 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-143	wie pST1, enthält jedoch nur 143 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-105	wie pST1, enthält jedoch nur 105 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-55	wie pST1, enthält jedoch nur 55 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1-33	wie pST1, enthält jedoch nur 33 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts
pST1+1	wie pST1, enthält jedoch nur 11 Bp oberhalb des Translationsstarts (ATG)

IIb) Expressionsvektor zur Untersuchung des AGGGTT-Promotorelements

EKTOR	MERKMALE
pST1P	wie pST1, jedoch wurde das AGGGTT-Promotor-Element an Pos. -26 durch die <i>Bam</i> HI-Sequenz GGATCC ersetzt

IIc) Expressionsvektoren zur *Linker-Scanning*-Mutagenese

VEKTOR	<i>rpl27a-1</i> -INTRON
	Alle Vektoren entsprechen pST1, tragen jedoch eine Mutation im Intron, die in den meisten Fällen in Form einer <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle (GGATCC) eingeführt wurde.
PST1	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₂₋₆	GGATCCTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₃₋₅	GTACCTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₇₋₁₂	GTTTGTGGATCCCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₁₃₋₁₈	GTTTGGTTTATTAGGATCCCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₁₉₋₂₃	GTTTGGTTTATTACCTCTTTGGATCCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₂₅₋₃₀	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTGGATCCGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₃₂₋₃₆	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGGATCCATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₃₇₋₄₂	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAAGGATCCTAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₄₃₋₄₈	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAAGGATCCTTTCAATTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₄₉₋₅₄	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGGATCCTTACTTAATTCCTTTAG
pST1M ₅₅₋₆₀	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAAGGATCCAATTCCTTTAG
pST1M ₆₁₋₆₆	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTGGATCCCTTAG
pST1M ₆₇₋₇₀	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTGGAT
pST1M ₆₈	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTGAG
pST1M _{32-36/49-54}	GTTTGGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGGATCCATGAAATAATTGTGGATCCACTTAATTCCTTTAG

III) Vektoren zur Untersuchung des Einflusses der nicht-kodierenden 3'-Region auf die Expressionsstärke



VEKTOR	MERKMALE	5'-FRAGMENT (Bp)	INTRON (Bp)	3'-FRAGMENT (Bp)
pST1A	wie pST1, trägt jedoch die 3'-Region eines Aktin-Gens aus <i>E. histolytica</i>	508	70	530
pST2A	wie pST2, trägt jedoch die 3'-Region eines Aktin-Gens aus <i>E. histolytica</i>	499	114	530
pST3A	wie pST3, trägt jedoch die 3'-Region eines Aktin-Gens aus <i>E. histolytica</i>	400	50	530

IV) Vektoren zur Untersuchung des Einflusses der Introns auf die Expressionsstärke



VEKTOR	MERKMAL
pST1ΔIntron	wie pST1, jedoch Deletion des 70-Bp-Introns
pST2ΔIntron	wie pST2, jedoch Deletion des 114-Bp-Introns
pST3ΔIntron	wie pST3, jedoch Deletion des 50-Bp-Introns

V) Expressionsvektoren zur Bestimmung des invarianten Adenosins in der putativen *Branch Point*-Region unterschiedlicher Introns aus *E. histolytica*



VEKTOR	MERKMALE
pST1	<i>ehrp127a-1</i> -Intron (70 Bp) GTTTGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTAATTCCTTAG
pST1A ₆₁ G	GTTTGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTT G ATTCCTTAG
pST1A ₆₂ G	GTTTGTTTATTACCTCTTTATTTCAAATTTGTTTCAATGAAATAATTGTTTCAATTACTTA G TTCTTAG
pST1.1	<i>ehorf0.6</i> -Intron (71 Bp) GTTTGTTAATTTTTAAATTAACCTTTAATAACAAAAAAAAAAGAATTTTTAACTTATTATTAATTTATTTAG
pST1.1A ₅₅ G	GTTTGTTAATTTTTAAATTAACCTTTAATAACAAAAAAAAAAGAATTTTTAACTT G TATTAATTTATTTAG
pST1.1A ₆₁ G	GTTTGTTAATTTTTAAATTAACCTTTAATAACAAAAAAAAAAGAATTTTTAACTTATTATT G ATTTATTTAG
pST1.1A ₆₂ G	GTTTGTTAATTTTTAAATTAACCTTTAATAACAAAAAAAAAAGAATTTTTAACTTATTATTA G TTTATTTAG
pST1.1A ₆₆ G	GTTTGTTAATTTTTAAATTAACCTTTAATAACAAAAAAAAAAGAATTTTTAACTTATTATTAATTT G TTTAG
pST1.2	<i>eherd2</i> -Intron (64 Bp) GTTTGTTTTAATATTTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTTAAATAAACAATAACAACCTCTAG
pST1.2A ₅₃ G	GTTTGTTTTAATATTTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTTAAATAAACAAT G CAACTCTAG
pST1.2A ₅₄ G	GTTTGTTTTAATATTTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTTAAATAAACAATA G CAACTCTAG
pST1.3	<i>vsp</i> -Intron (56 Bp) GTTTGTTAGATGTATAATTGAGAAAGAAAGATGATACAAATATTTATTGTTGTTAG
pST1.3A ₄₆ G	GTTTGTTAGATGTATAATTGAGAAAGAAAGATGATACAAATATTT G TTGTTGTTAG
pST1.4	<i>eh39</i> -Intron (58 Bp) GTTTGTAATTCCTTAATGCTATTCTATTTTCTGAAATTA AAAACTTACAAAAATAG
pST1.4A ₄₉ G	GTTTGTAATTCCTTAATGCTATTCTATTTTCTGAAATTA AAAACTT G CAAAAAATAG
pST1.5	<i>ehstk1</i> -Intron (46 Bp) GTTTGTTTTGTTAAATAACTTATAATATTCCTTAATCTTATGTTTAG
pST1.5A ₃₉ G	GTTTGTTTTGTTAAATAACTTATAATATTCCTTAATCTT G TGTTTAG
pST1.6	artifizielles-Intron (46 Bp) GTTTGTTCTGTTCTCTTGCTTCCTTCTGGTCTATTTATGCTTTTAG
pST1.6a	GTTTGTTCT ATTTAT TTGCTTCCTTCTGGTCT G TTTGCTTTTAG
pST1.6b	GTTTGTTCTGTTCTCTTGCTTCCTTCTGGTCTATTT G TGCTTTTAG

2.4 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.4.1 Nährmedien

TYI-S-33 Medium (DIAMOND et al., 1978):

Trypticase	20	g
Hefeextrakt	10	g
Glukose	10	g
NaCl	2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	0,6	g
L-Cystein	1	g
Ascorbinsäure	0,2	g
Fe-Ammoniumcitrat	22,8	mg

Die Komponenten wurden in 870 ml A. bidest gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 6,8 eingestellt und das Medium autoklaviert. Vor Benutzung wurden 800 ml des inkompletten Mediums mit 150 ml inaktiviertem Rinderserum (zweimal 30 min., 56°C), 30 ml „Diamond Vitamin Tween 80 Solution“ (40 x), 0,2 g Streptomycin und 2×10^5 U Penicillin komplettiert. Das Medium wurde autoklaviert, anschließend steril filtriert und bis zu 10 Tage nach Herstellung verwendet.

LB-Medium

Lennox L Broth Base 20 g
ad 1 l A. bidest, autoklavieren

LB-Agarplatten

Lennox L Broth Agar 3 g
ad 1 l A. bidest, autoklavieren

Bei Bedarf wurde nach dem Abkühlen der Medien 100 µg Ampicillin/ml zugesetzt.

2.4.2 Kultivierung und Ernte von *E. histolytica*

Die Kultivierung der *E. histolytica*-Trophozoiten verlief axenisch unter sterilen Bedingungen. Als Kulturmedium wurde mit 15 % Rinderserum, Vitamin-Mix und Antibiotika komplettiertes TYI-S-33-Medium verwendet. Die Zellen wurden unter mikroaerophilen Bedingungen (<5 % O₂) bei 37°C in 50- bzw. 250 ml-Kulturflaschen gehalten. Das Ernten der Trophozoiten erfolgte in der späten logarithmischen Wachstumsphase. Die Kulturflaschen wurden zu diesem Zweck für 5-10 min. auf Eis inkubiert, die abgelösten Zellen für 3 min. bei 4°C und 400 x *g* sedimentiert und einmal in kaltem NaPBS gewaschen. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer.

2.4.3 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verschiedenen *Escherichia coli*-Stämme erfolgte aerob in LB-Medium bei 37°C in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (150-200 Upm). Zur Lagerung der Stämme wurden die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 1/10 Vol. sterilem Glycerol versetzt und bei -70°C gehalten.

2.5 Transformation von *Escherichia coli*

2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen erfolgte mit einer 200 ml-Kultur in LB-Medium, welche mit 1 % Inokulum beimpft wurde. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden für 5 min. bei 3000 x *g* und 4°C sedimentiert, in 65 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurden die Zellen in 8 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und mit 15 % (v/v) Glycerol versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Zellen bei -70°C gelagert.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation von *E. coli* kommt es zur Aufnahme freier, löslicher Plasmid-DNA (COHEN et al., 1972). Dabei wurde die Hälfte eines Ligationsansatzes, 2-4 μ l einer Mutagenese-Reaktion bzw. 100 pg Plasmid-DNA zu Vermehrungszwecken eingesetzt. Die jeweilige Probe wurde zu 100 μ l kompetenten Zellen gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde

einem Hitzeschock für 60 s bei 42°C unterzogen, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation wurde der gesamte Ansatz auf LB-Amp-Platten überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Sofern das verwendete Klonierungssystem eine „Blau-Weiss-Selektion“ zuließ, wurden 40 µl 2 % (w/v) X-Gal und 40 µl 0,1 M IPTG vor dem Ausstreichen der Bakterien-suspension auf LB-Amp-Platten gegeben. Es wurden außerdem OneShot™ TOP10-Zellen für die Transformation verwendet, die nach Angaben des Herstellers erfolgte.

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1 Plasmid-Mini-Präparation

Die Präparation geringer Mengen an hochreiner Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit von SDS lysiert und die DNA durch Natriumhydroxid denaturiert. Nach Neutralisation durch Kaliumacetat präzipitieren denaturierte Proteine und chromosomale DNA mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann so isoliert werden.

2.6.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Für die Transfektion von *E. histolytica* wurden größere Mengen hochsaubere, überspiralisierte Plasmid-DNA benötigt. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule (QIAGEN-tip 2500) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Methode beruht ebenfalls auf der oben beschriebenen alkalischen Lyse. Die DNA wurde nach der Isolierung mit Isopropanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und das getrocknete Sediment in 400-600 µl A. bidest resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA. Vor der Transfektion wurde die DNA durch Restriktionsverdau und daran anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die DNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Isolierung genomischer DNA aus *E. histolytica*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem Easy-DNA™ Kit (Life Technologies). Nach der Ernte von $1-3 \times 10^6$ Trophozoiten wurden die Zellen einmal in NaPBS gewaschen, in 100-200 μ l des gleichen Puffers aufgenommen, mit 350 μ l Lösung A versetzt und für 10 min. bei 65°C inkubiert. Es wurden 150 μ l Lösung B zugegeben und der stark visköse Reaktionsansatz bis zum vollständigen Lösen kräftig geschüttelt. Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l Chloroform und eine Zentrifugation des Ansatzes für 10-20 min. bei 15.000 x g und 4°C. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 1 ml 96 % (v/v) Ethanol versetzt, für 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert (10 min. 15.000 x g, 4°C). Nach einem Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die DNA in 50-100 μ l TE-Puffer aufgenommen und für 30 min. bei 37°C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -70°C.

2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. histolytica*

Mit Hilfe von TRIzol® (Gibco BRL, Life Technologies), einer monophasischen Lösung aus Phenol und chaotropen Salzen, welche Nukleinsäurebindende Eigenschaften besitzen, wurde Gesamt-RNA aus Zellen isoliert. Dabei wurden mit NaPBS gewaschene Trophozoiten ($1-3 \times 10^6$) in 1 ml TRIzol®-Reagenz resuspendiert und 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ l Chloroform erfolgte eine erneute Inkubation für 3 min. bei RT, bevor der Ansatz 15 min. bei 11.500 x g zentrifugiert wurde. Die RNA wurde aus dem Überstand mit Isopropanol gefällt, anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 100 μ l DEPC-H₂O bei 55°C gelöst. Für die Lagerung der resuspendierten RNA bei -70°C wurde diese mit 1/10 Vol. NaAcetat und 2,5 Vol 99 % (v/v) Ethanol gefällt.

2.7 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde der Ansatz mit 1 Vol. Chloroform, einem Reagenz aus 1 Vol. Tris-gesättigtem Phenol und 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde intensiv gemischt

und zur vollständigen Phasentrennung für 10 min. bei 15.000 x *g* zentrifugiert. In der entstandenen Interphase sammeln sich die durch das Phenol denaturierten Proteine an, wohingegen sich die DNA in der oberen wässrigen Phase befindet. Diese wurde anschließend mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und die DNA wie unten beschrieben gefällt.

2.7.2 Fällung von Nukleinsäuren

Die Entsalzung oder Konzentrierung von Nukleinsäuren erfolgte in Anwesenheit monovalenter Kationen in Alkohol. Es bildet sich dabei ein unlöslicher Niederschlag, der durch Zentrifugation sedimentiert und durch Waschen von Salz- und Alkoholresten gereinigt werden kann. Hierzu wurde eine DNA- oder RNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat, pH5.2, sowie 2,5 Vol. 99 % (v/v) Ethanol, oder 0,7-0,8 Vol. Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min. bei 15.000 x *g* und RT sedimentiert und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA bzw. RNA wurde in A. bidest oder DEPC-H₂O resuspendiert.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass eine OD von 1 bei doppelsträngiger DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA und RNA von 40 µg/ml aufweist. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses von OD_{260nm} zu OD_{280nm} überprüft. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260nm}/OD_{280nm}-Quotienten von 1,8; reine RNA-Lösung weist einen von 2,0 auf.

2.8 Auftrennung und Isolierung von DNA

2.8.1 Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von negativ geladenen DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese. In Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,7-2 % (w/v) für analytische (in TBE-Puffer) und präparative Zwecke (TAE-Puffer) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden

mit einem entsprechenden Volumen an DNA-Probenpuffer versetzt und die Auftrennung erfolgte bei 7 Volt/cm. Die DNA-Banden wurden durch das den Gelen zugefügte Ethidiumbromid (0,1 µg/ml Gel) mit einem UV-Transilluminator detektiert und anschließend fotografiert. Der Fragment-Längen-Bestimmung dienten die o. a. DNA-Längenstandards (MBI Fermentas).

2.8.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten war es erforderlich, die jeweilige DNA nach entsprechender Modifikation aus Agarosegelen zu isolieren.

2.8.3 Elution von DNA aus Low-Melting-Point-Agarose

Der Einsatz von *Low-Melting-Point-Agarose* erlaubte auch die Gewinnung geringer Mengen an DNA. Diese Agarose weist einen niedrigen Schmelzpunkt auf. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in TAE-Puffer bei 5 V/cm wurden die Banden bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgeschnitten und der Agaroseblock bei 65°C geschmolzen. Es erfolgte die Zugabe des 2 x Vol. an A. bidest und eine Inkubation des Ansatzes unter ständigem Durchmischen bis zur kompletten Homogenisierung. Das DNA-Agarosegemisch wurde direkt in die Ligation eingesetzt.

2.8.4 Elution von DNA aus Agarose

Zur Gewinnung von DNA aus Agarose wurden *Spin Columns* der Firma Ambion verwendet. Nach Ausschneiden der gewünschten Bande bei 366 nm wurde das Agarosestück in das oben genannte Reaktionsgefäß platziert und sofort für mindestens 1 h bei -70°C inkubiert, um die Ausbeute zu erhöhen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 30 min. bei 15.000 x g und RT. Dabei verbleiben die unlöslichen Rückstände der Agarose in der Säule, wohingegen sich die DNA im Durchfluss befindet. Dieser Ansatz wurde einer Fällung (s. 2.7.2) unterzogen und die DNA wurde je nach Ausgangsmenge in 10-30 µl A. bidest resuspendiert.

2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.9.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung von DNA wurde anhand von Restriktionsverdau vollzogen. Dabei kamen Restriktionsendonukleasen des Typ II, die innerhalb ihrer jeweiligen Erkennungssequenz schneiden, zum Einsatz. Die enzymatische Spaltung wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Enzyme wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen bei 37°C eingesetzt. Für analytische Zwecke wurden 1 µg DNA und 2,5-5 U Enzym für 1 h inkubiert (20 µl-Ansatz). Bei präparativen Verfahren wurden 10-50 µg DNA und 5-10 U Enzym für 2-4 h inkubiert (20-60 µl-Ansatz).

2.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit zu klonierenden DNA-Fragmenten erfolgte mit dem T4-DNA-Ligase-System der Firma Promega. Es wurden ca. 100 ng Vektor-DNA mit einem dreifach molaren Überschuss an Fragment-DNA eingesetzt. In einem 5-15 µl-Ansatz wurden die entsprechende Menge DNA-Fragment, 1 x Ligationspuffer, 1 mM ATP (pH 7,0) und 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) über Nacht, mindestens aber für 3 h bei 14°C inkubiert. Die Hälfte eines Ligations-Ansatzes wurde in *E. coli* transformiert.

PCR-Produkte mit Adenosinüberhängen konnten bei Bedarf direkt in den Vektor pCR[®]2.1 subkloniert werden. Die Ligation mit Hilfe des TOPO[®]TA Cloning Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers (Life Technologies).

2.9.3 Hybridisierung und Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Aufgrund der geringen Größe einiger zu ligierender DNA-Fragmente, die eine Anzahl von 46 Nukleotiden nicht überschritten, wurden sie als doppelsträngige (ds) Oligonukleotide eingesetzt. Diese wiesen terminal Überhänge mit *Nde*I- und *Pst*I-Restriktionsschnittstellen auf. Die Synthese der zunächst als Einzelstrang (ss) vorliegenden Oligonukleotide wurde von der Firma Life Technologies durchgeführt.

Die Hybridisierung der komplementären ss-Oligonukleotide wurde stets wenige Stunden vor der Ligation durchgeführt. Dabei wurden in einem 50 µl-Ansatz je 1 µg des Oligos und 1 x Ligationspuffer für 15 min. bei 70°C

inkubiert. Anschließend wurde der Heizblock auf RT gekühlt (ca. 3-4 h). Es wurden 6 µl des erhaltenen ds-Oligonukleotids in die Ligation mit dem entsprechenden linearisierten Vektor eingesetzt, die wie unter 2.9.2 beschrieben durchgeführt wurde. Im Gegensatz zur Ligation von DNA-Fragmenten war es erforderlich, die Reaktion nach Beendigung durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion zu reinigen. Der Ansatz wurde in 10 µl A. bidest resuspendiert und die gesamte Probe in *E. coli* transformiert.

5 x Ligationspuffer

Tris-HCL, pH 7,5	250	mM
MgCl ₂	5	mM
PEG 8000	25	% (w/v)
DTT	5	mM

2.9.4 Auffüllen von 5'-Überhängen

Um die *NdeI*-Restriktionsschnittstelle des verwendeten pBS-Vektors (s. Abb. 1.3) zu entfernen, wurde dieser mit dem Restriktionsenzym linearisiert, wodurch ein 5'-Überhang in dem DNA-Doppelstrang entsteht. Durch das anschließende Auffüllen mit dNTPs wurde dieser Überhang, bzw. die Sequenz der Restriktionsschnittstelle, zerstört. Zu diesem Zweck wurde 1 µg mit *NdeI* verdaute und gereinigte Vektor-DNA in einem Volumen von 16 µl mit 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in dem mitgelieferten Puffer (Promega) für 15 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl dNTPs (je 25 µM) hinzugegeben und erneut für 15 min. bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf 100 µl mit A. bidest aufgefüllt und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Die Rezirkulation des Vektors erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben.

2.9.5 Dephosphorylierung freier 5'-Enden von DNA

Durch den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA entstehen kompatible 5'-Enden, deren Phosphatreste religieren können. Um in einer Ligation das Rezirkulieren linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern und den Einbau von Fremd-DNA zu fördern, wurde diese mit dem Enzym Alkalische Phosphatase behandelt. Das Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-

resten. Im Anschluss an einen Restriktionsverdau wurden in einem 100 µl-Ansatz 20 U Alkalische Phosphatase (Pharmacia) im entsprechenden 1 x Dephosphorylierungspuffer für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der Reaktion erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

2.9.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte anhand einer Variante der klassischen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach SANGER und Mitarbeitern (1980). Hierbei erfolgt der Kettenabbruch durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Reaktionen wurden mit Hilfe des „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurden für die jeweilige Sequenzreaktion M13F, M13R oder spezifische Oligonukleotide eingesetzt (s. 2.1-5). Der 20 µl-Ansatz enthielt 1 µg DNA, 10 pmol Oligonukleotid und 4 µl „Terminator Ready Reaction Mix“. Die Sequenzreaktion verlief im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer) über 25 Zyklen mit folgenden Schritten: 10 s 96°C, 5 s 50°C, 4 min. 60°C. Zur Reinigung wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl HPLC-H₂O versetzt und einer Ethanol-Fällung mit 3 M NaAc, pH 4,6 unterzogen.

2.10. Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten (SAIKI et al., 1988). In dieser Reaktion kommt es zu einer enzymatischen Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Startern. Diese binden gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge und in drei zyklischen Reaktionsschritten wird die gewünschte DNA-Sequenz mit exponentiell ansteigender Rate amplifiziert. Die zyklischen Reaktions-schritte einer PCR bestehen aus der Abfolge von Denaturierung der DNA-Moleküle, Hybridisieren des Oligonukleotid-Starters und der DNA-Synthese (Elongation).

Die Reaktionen wurden in 50 oder 100 µl-Ansätzen durchgeführt. Dabei wurden 1-100 ng DNA, je 1 µM Oligonukleotid, 200 µM dNTP, 2,5-5 U einer DNA-Polymerase sowie vom Hersteller an das jeweilige System adaptierter 1 x PCR-Puffer eingesetzt (s. 2.1, Enzyme). Für die Synthese des DNA-Stranges

von zu klonierenden PCR-Produkten wurden die Polymerasen *Pwo* (aus *Pyrococcus woeisi*) und *Pfu* (aus *Pyrococcus furiosus*) aufgrund ihrer korrekturlesenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt. Für analytische PCRs wurde die Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) verwendet.

Die Denaturierung erfolgte stets für 1 min. bei 94°C. Hingegen änderte sich die Hybridisierungs-Temperatur in Abhängigkeit von der Länge und Spezifität der Oligonukleotide und richtete sich nach der Schmelztemperatur T_m , die anhand folgender Formel errechnet wurde:

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

Die Dauer der Hybridisierung betrug in den meisten Fällen 1 min. Die Elongation erfolgte bei 72°C und einer Dauer von 1 min. pro Kb zu amplifizierender DNA. Jeder Zyklus wurde 25-30 mal wiederholt.

Zur Klonierung eines PCR-Produktes in den Vektor pCR[®]2.1 wurden Adenosin-Überhänge durch einen abschließenden 15-minütigen Inkubationsschritt bei 72°C synthetisiert.

2.10.1 PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese ist ein Verfahren, bei dem mit Hilfe einer PCR gezielt Mutationen in DNA-Moleküle eingeführt werden (HUTCHINSON et al., 1978). Hierfür wurden zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, welche die gewünschte Transition von 1 bis max. 6 Nukleotiden enthielten, die von der zu mutierenden Sequenz abgeleitet wurden. In den verwendeten Oligonukleotiden war die gewünschte Mutation jeweils von mindestens 20 Basen flankiert. Die Reaktion erfolgte in einem 50 µl-Ansatz, der 40 ng Plasmid-DNA, 1 x PCR-Puffer, 0,1 µM der beiden Oligonukleotide, 200 µM dNTP's und 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase enthielt. Der PCR-Zyklus wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C	2	min.	
94°C	1	min.	
60°C	4	min.	14 Zyklen
68°C	10	min.	
70°C	15	min.	

Um die methylierte Ausgangs-DNA zu entfernen, wurde 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* zum Ansatz gegeben und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Amplifikat liegt nach der Reaktion linearisiert vor und wurde auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend wurden 2-4 µl der Reaktion in OneShot™ TOP10-Zellen nach Angaben des Herstellers transformiert. Durch Sequenzierung des Plasmids wurde die gerichtete Mutagenese verifiziert.

2.10.2 Reverse Transkription von RNA

Zur Analyse spezifischer RNA-Spezies aus Gesamt-RNA transfizierter *E. histolytica*-Trophozoiten wurde diese mit Hilfe der Reversen Transkriptase und einem spezifischem Gegenstrang-Oligonukleotid in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion erfolgte mit dem Enzym-System der Firma Life Technologies. Um das Vorhandensein von DNA-Molekülen in dem Reaktionsansatz auszuschließen, wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde in einem 1 ml-Ansatz 100 µg RNA mit 100 U DNase (Promega) im entsprechenden Puffer für 30 min. bei 37°C inkubiert, einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und die RNA in 24 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

In einem 24 µl-Ansatz wurden 35 µg RNA mit 1 mM dNTP's und 1 µM spezifischem Gegenstrang-Oligonukleotid für 5 min. bei 65°C und danach sofort auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 9 µl 5 x Erst-Strang-Puffer, 6 µl 0,1 M DTT, 3 µl BSA (200µg/µl), 3 µl MnCl₂ (20 mM), 3 µl RNase-Inhibitor und 2 µl Super Script™ II-Reverse Transkriptase gegeben. Die Reaktion erfolgte für 50 min. bei 42°C, sowie in einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz mit Hilfe des „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche) gereinigt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4°C.

2.10.3 Amplifikation von cDNA

Die Amplifikation von cDNA erfolgte in einem 50 µl-Ansatz. Dabei wurden 5-15 µl der unter 2.10.2 synthetisierten cDNA eingesetzt und stets 1 µM des Strang-Oligonukleotids „ehrpL27a-5'UTR-S-18“ bzw. „ehrpL27a1-5'UTR-artif.-S-20“ sowie des Gegenstrang-Oligonukleotids „Rluc pos 99AS-20“ (s. 2.1.7). Der Ansatz wurde wie unter 2.10 beschrieben mit folgendem PCR-Zyklus durchgeführt:

<u>94°C</u>	<u>2</u>	<u>min.</u>	
94°C	1	min.	
44°C	1	min.	35 Zyklen
<u>72°C</u>	<u>1</u>	<u>min.</u>	
72°C	15	min.	

2.11 Transiente Transfektion von *E. histolytica*

Die Transiente Transfektion wurde mit Hilfe der Elektroporation durchgeführt, bei der Zellen zur Aufnahme freier DNA befähigt werden. Durch das kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Plasmamembran reversibel permeabilisiert und ein DNA-Transfer ermöglicht.

Die Transfektion von *E. histolytica* basiert auf einer von NICKEL und TANNICH (1994) beschriebenen Methode. Um die Effekte unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszuschließen wurde bei jedem Experiment ein interner Standard in Form eines co-transfizierten Kontroll-Plasmids eingeführt. Die Darstellung der transienten Expressionsverläufe erfolgte mit zwei evolutionär unterschiedlichen Luciferasen, die verschiedene Substratanforderungen aufweisen. Das Reporter-gen der experimentellen Vektoren kodiert für eine *Renilla*-Luciferase aus der Koralle *Renilla reniformis*. Der Kontrollvektor kodiert für die *Firefly*-Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*.

Für das Verfahren wurden Trophozoiten der späten logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt, die stets 18-24 h vor Beginn des Experiments in eine 250 ml-Kulturflasche eingesät werden mussten. Nach der Ernte von ca. 2×10^7 Trophozoiten wurden die Zellen einmal in eiskaltem NaPBS, anschließend in inkomplettem „Cyto-Mix“ gewaschen und das Sediment in 3,2 ml komplettem „Cyto-Mix“ resuspendiert. Die durchgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten für 3 min. bei 400 x g und 4°C. Anschließend wurden zügig 800 µl der Amöbensuspension (ca. 5×10^6 Zellen) in eine Küvette (0,4 cm Durchmesser) überführt, mit 100 µl DNA-Lösung (100 µg Kontroll- und 50 µg Reporter-Plasmid-DNA) vermischt und sofort bei 1,2 kV und 25 µF zweimal hintereinander elektroporiert. Die resultierenden Zeitkonstanten betragen 0,3-0,4 ms. Die transfizierten Zellen wurden unverzüglich in eine 50 ml-Kulturflasche mit vorgewärmtem, komplettem TY-I-S33-Medium überführt. Dieser Vorgang wurde

für jeden dargestellten Expressionsvektor dreimal an mindestens drei unterschiedlichen Tagen wiederholt.

„Cyto-Mix“

KCl	120	mM
CaCl ₂	0,15	mM
K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	10	mM
HEPES	25	mM
EGTA	2	mM
MgCl ₂	5	mM

Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch mit 2,5 mg/ml ATP und 3 mg/ml reduziertem Glutathion komplettiert.

2.12 Dualer-Luciferase-Assay

Die Luciferase-Aktivitäten wurden aus dem wässrigen Überstand lysierter, sedimentierter Trophozoiten bestimmt. Die Durchführung erfolgte mit dem „Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System“ (Promega), das sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

1. „Passiver Lyse-Puffer“
2. „Luciferase-Assay-Reagenz (LAR)II“ (Luc⁺-Reagenz)
3. „Stop and Glo[®]“-Reagenz (Rluc-Reagenz)

Die Zusammensetzung der Lösungen war nicht bekannt. Das Einstellen der Arbeitskonzentrationen und die Lagerung der Reagenzien erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.12.1 Erstellung des Amöbenlysats für den Dualen-Luciferase-Assay

Die Erstellung des Amöbenlysats erfolgte 26-29 h nach der Transfektion, wobei alle Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Die Kultur wurde nach der Ernte in vorgekühlte 50 ml-Gefäße überführt, einmal in NaPBS gewaschen, und verbliebene Pufferreste wurden mit Zellstoff entfernt. Die Zellen wurden im 1 x Lysepuffer resuspendiert und zügig in ein auf -70°C temperiertes

1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, was in einem sofortigen Gefrieren der Probe resultierte. Anschließend wurde dieser Ansatz für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dem Auftauen durch kräftiges Mischen wurde die Probe für 15 min. bei 4°C und $15.000 \times g$ sedimentiert. Der klare, die Luciferase-Enzyme enthaltende Überstand wurde von den Zelltrümmern getrennt und direkt in die Luciferase-Messung eingesetzt.

2.12.2 Bestimmung von Luciferase-Aktivitäten

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte in einem „Junior Luminometer“ (EG&G Berthold, Bad Wildbad). Dazu wurden $50\ \mu\text{l}$ des unter 2.12.1 erstellten Amöbenlysats in ein Messröhrchen überführt und mit $100\ \mu\text{l}$ LAR II versetzt. Über einen Zeitraum von 10 s erfolgte die Messung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität. Durch Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ „Stop and Glo[®]“-Reagenz wird die Aktivität der *Firefly*-Luciferase inhibiert und gleichzeitig werden die Bedingungen für die Messung der *Renilla*-Luciferase eingestellt. Ihre Aktivität wurde in einer zweiten, ebenfalls 10 s andauernden Messung ermittelt. Der Messwert wurde gegen den der Kontroll-Luciferase normalisiert und als dimensionslose relative Aktivität dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Aufbau und zur Regulation der *ehrpl27a*-Gene

3.1.1 Organisation der *ehrpl27a*-Gene

Sequenzanalysen größerer DNA-Abschnitte haben ergeben, dass die vier *rpl27a*-Gene von *E. histolytica* in enger Nachbarschaft zu funktionell sehr unterschiedlichen Genen in zum Teil gegenläufiger Orientierung angeordnet sind (s. Abb. 2). Die offenen Leserahmen (ORF) innerhalb der untersuchten Contigs umfassen eine Länge von 450 bis 1214 Bp. Die Länge der intergenischen Regionen beträgt zwischen 105 und 278 Bp und intervenierende Sequenzen weisen eine Länge von 43 bis 155 Bp auf. Während die *ehrpl27a*-kodierenden Regionen stark konserviert sind und nur vereinzelt Nukleotidaustausche enthalten, divergieren die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen sehr stark. Eine Ausnahme bilden die Gene *ehrpl27a-2* und *ehrpl27a-4* deren Nukleotidsequenz, abgesehen von den nicht-kodierenden 3'-Bereichen, identisch ist. Die stromabwärts beider Gene befindlichen ORF kodieren jeweils für eine GTPase, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen zu 66 % identisch sind. Die GTPase-kodierenden Regionen sind durch zwei Introns unterbrochen, wobei diese intervenierenden Sequenzen wenig konserviert sind. Auch die vier *ehrpl27a*-kodierenden Sequenzen sind von jeweils einem Intron unterbrochen, das in seiner Länge und Sequenz variiert (*ehrpl27a-1*: 70 Bp, *ehrpl27a-2*: 114 Bp, *ehrpl27a-3*: 50 Bp, *ehrpl27a-4*: 114 Bp). Die *rpl27a*-Introns sind, ebenso wie die (ersten) Introns der benachbarten Gene, stets unmittelbar stromabwärts des jeweiligen ATG-Startcodons lokalisiert.

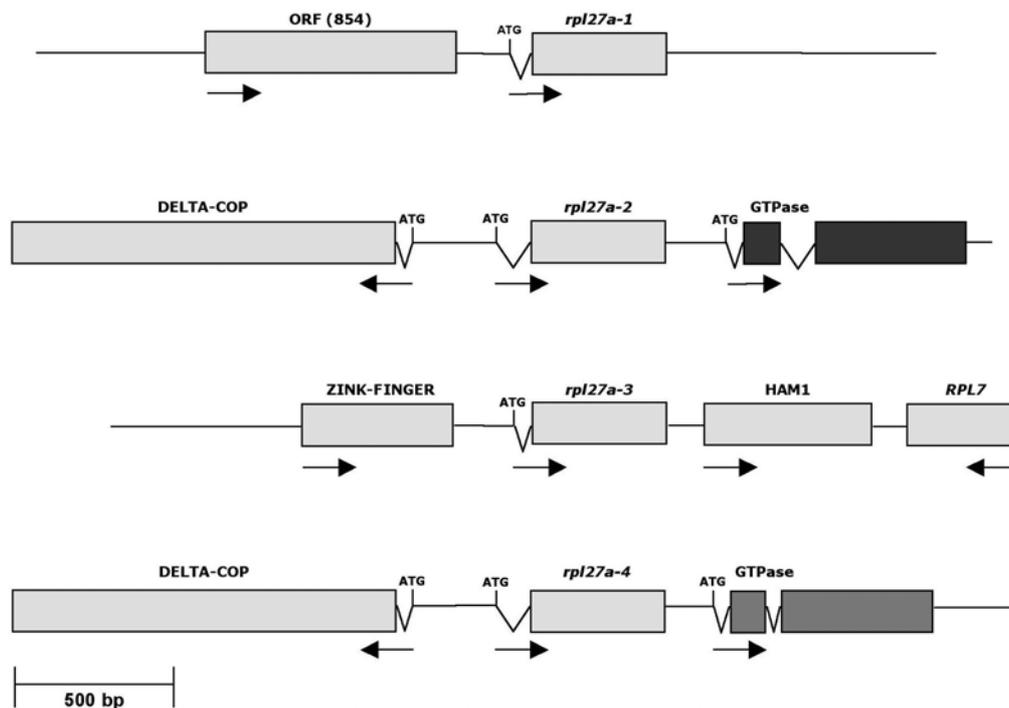


Abb. 2: Organisation der *ehrp127a*-Gene im genomischen Kontext.

Dargestellt ist die genomische Struktur der verschiedenen *ehrp127a*-Gene mit den jeweiligen flankierenden Regionen. Offene Leserahmen bzw. deren putative Translationsprodukte sind als graue Boxen dargestellt. Ihre Orientierung ist durch Pfeile angegeben. Translationsstartpunkte sind mit ATG gekennzeichnet. Introns sind als v-förmige Verbindungen dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass die Gene *rpl27a-2* und *rpl27a-4* verschiedene 3'-flankierenden Regionen aufweisen.

3.1.2 Vergleich von *ehrp127a*-kodierenden Sequenzen

In den 450 Bp umfassenden *ehrp127a*-kodierenden Sequenzen liegen lediglich an 28 Positionen Nucleotidaustausche vor. Somit beträgt der Anteil konservierter Nucleotide 96 % zwischen den vier *ehrp127a*-kodierenden Regionen. Nur an drei Positionen führen die Nucleotidsubstitutionen zu einer Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz (s. Abb. 3). Mit Ausnahme der identischen *ehrp127a-2*- und *ehrp127a-4*-Introns unterscheiden sich die intervenierenden Sequenzen sehr stark sowohl in ihrer Länge als auch in der Nucleotidfolge, die keine Gemeinsamkeiten erkennen lässt.

<i>ehrp127a-1</i>	ATGGCAACAA	GATTCAGACA	AACTCGTAGA	AGAAGAGGAC	ATGTTTCAAT	50
<i>ehrp127a-3</i>	ATGGCCACTA	GATTCAGACA	AACTCGTAGA	AGAAGAGGAC	ATGTTTCAAT	50
<i>ehrp127a-3</i>	ATGGCCACTA	GATTCAGACA	AACACGAAGA	AGAAGAGGAC	ATGTTTCAAT	50
<i>ehrp127a-4</i>	ATGGCCACTA	GATTCAGACA	AACTCGTAGA	AGAAGAGGAC	ATGTTTCAAT	50
<i>ehrp127a-1</i>	GGGTTATGGT	CGTATTGGAA	AACATAGAAA	ACAAAGAGGA	GGAAGAGGAA	100
<i>ehrp127a-2</i>	GGGTTATGGT	CGTATTGGAA	AACATAGAAA	GCAAAGAGGA	GGAAGAGGAA	100
<i>ehrp127a-3</i>	GGGTTATGGT	CGTATTGGAA	AACATAGAAA	GCAAAGAGGA	GGAAGAGGAA	100
<i>ehrp127a-4</i>	GGGTTATGGT	CGTATTGGAA	AACATAGAAA	GCAAAGAGGA	GGAAGAGGAA	100
<i>ehrp127a-1</i>	ATGCTGGTGG	ACAACACCAC	AGAAAAGACAT	GGTTCACTAC	ATTCCATCCA	150
<i>ehrp127a-2</i>	ATGCTGGTGG	ACAACACCAT	AGAAAAGACTT	GGTTCACTAC	ATTCCATCCA	150
<i>ehrp127a-3</i>	ATGCTGGTGG	ACAACACCAC	AGAAAACAT	GGTTCACTAC	ATTCCATCCA	150
<i>ehrp127a-4</i>	ATGCTGGTGG	ACAACACCAT	AGAAAAGACTT	GGTTCACTAC	ATTCCATCCA	150
<i>ehrp127a-1</i>	GACTACTTTG	GAAAACATGG	AATGAGAGTA	TCCATCTTA	AAGCTAATAA	200
<i>ehrp127a-2</i>	GACTATTTG	GAAAACATGG	AATGAGAGTA	TCCATCTTA	AAGCTAATAA	200
<i>ehrp127a-3</i>	GACTACTTTG	GCAAACATGG	AATGAGAGTA	TCCATCTTA	AAGCTAATAA	200
<i>ehrp127a-4</i>	GACTATTTG	GAAAACATGG	AATGAGAGTA	TCCATCTTA	AAGCTAATAA	200
<i>ehrp127a-1</i>	ATACTATTGT	CCAAGTATCA	ATGTAGATTC	ATTATGGAGC	CTTGTGGTAA	250
<i>ehrp127a-2</i>	ATATTATTGC	CCAAGCATTA	ATGTAGATTC	ATTATGGAGT	CTTGTGGTAA	250
<i>ehrp127a-3</i>	ATACTATTGT	CCAAGTATCA	ATGTAGATTC	ATTATGGAGC	CTTGTGGTAA	250
<i>ehrp127a-4</i>	ATATTATTGC	CCAAGCATTA	ATGTAGATTC	ATTATGGAGT	CTTGTGGTAA	250
<i>ehrp127a-1</i>	AAGATATTCA	AGCACAATAC	AAAAATGCTA	AAGTAGGAGA	AGAAGTTCCA	300
<i>ehrp127a-2</i>	AAGACGTTCA	AGCACAATAC	AAAAATGCTA	AAGTAGGGGA	AGAAGTTCCA	300
<i>ehrp127a-3</i>	AAGATGTTCA	AGACAAATAT	AAGAATGCTA	AACTGGAGA	AGAAGTTCCA	300
<i>ehrp127a-4</i>	AAGACGTTCA	AGCACAATAC	AAAAATGCTA	AAGTAGGGGA	AGAAGTTCCA	300
<i>ehrp127a-1</i>	GTTATTGACT	GTGTAACA	TGGTTATTTT	AAGGTTCTTG	GTAAGGGATT	350
<i>ehrp127a-2</i>	GTTATTGACT	GTGTAACA	TGGCTATTTT	AAGGTTCTTG	GTAAGGGATT	350
<i>ehrp127a-3</i>	GTTATTGACT	GTGTAACA	TGGTTATTTT	AAGGTCCTTG	GTAAGGGATT	350
<i>ehrp127a-4</i>	GTTATTGACT	GTGTAACA	TGGCTATTTT	AAGGTTCTTG	GTAAGGGATT	350
<i>ehrp127a-1</i>	CCTTCCAAAA	CAACCAGTTA	TTGTCAGAGC	TAGATATTTT	AGTGAAAAAG	400
<i>ehrp127a-2</i>	CCTTCCAAAA	CAACCAGTTA	TTGTCAGAGC	TAGATATTTT	AGTGAAAAAG	400
<i>ehrp127a-3</i>	CCTTCCAAAA	CAACCAGTTA	TTGTCAGAGC	TAGATATTTT	AGTGAAAAAG	400
<i>ehrp127a-4</i>	CCTTCCAAAA	CAACCAGTTA	TTGTCAGAGC	TAGATATTTT	AGTGAAAAAG	400
<i>ehrp127a-1</i>	CTCAACAAAA	GATTAAGGCT	GTTGGAGGTG	CTTGCGAAC	TACTGCTTAA	450
<i>ehrp127a-2</i>	CTCAACAAAA	GATTAAAGCC	GTTGGAGGAG	CATGCGAAC	TACTGCTTAA	450
<i>ehrp127a-3</i>	CTCAACAAAA	GATTAAGGCT	GTTGGAGGAG	CATGTGAAC	TACTGCTTAA	450
<i>ehrp127a-4</i>	CTCAACAAAA	GATTAAAGCC	GTTGGAGGAG	CATGCGAAC	TACTGCTTAA	450

Abb. 3: Vergleich der kodierenden Sequenzen verschiedener *ehrp127a*-Gene.

Dargestellt ist ein Sequenzvergleich der 4 *ehrp127a*-Gene. Obwohl sich die einzelnen Sequenzen relativ zu dem als Referenz dienenden *rp127a-1*-Gen an 28 Positionen unterscheiden (weiß unterlegt), kommt es nur an drei Positionen (gelb unterlegt) zu Veränderungen der entsprechenden Translationsprodukte.

3.1.3 Untersuchungen zur Expression der *ehrp127a*-Gene

3.1.3.1 Einfluss homologer *ehrp127a*-flankierender Regionen auf die Luciferase-Expression

Um die Expression der *ehrp127a*-Gene zu untersuchen, wurden entsprechende Expressionsvektoren erstellt. Diese enthielten das *Renilla*-Luciferase-Gen (*rluc*) unter Kontrolle der verschiedenen *ehrp127a*-flankierenden Regionen. Die Vektoren (pST1 bis pST4, s. 2.3.3 II) wurden transient in *E. histolytica*-Trophozoiten transfiziert und nach 24 h wurde die Luciferase-Aktivität in Zellextrakten der Amöben bestimmt. Ein *Firefly*-Luciferase-

kodierender Kontrollvektor wurde als interner Standard bei jedem Experiment co-transfiziert. Nach der Ermittlung beider Enzymaktivitäten wurde die *Renilla*-Luciferase-Aktivität stets gegen die *Firefly*-Luciferase-Aktivität normalisiert. Der Quotient ist in der vorliegenden Arbeit als dimensionslose relative Luciferase-Aktivität dargestellt. Es wurde somit eine Unabhängigkeit von der Transfektionseffizienz erzielt, so dass einzelne Experimente zuverlässig miteinander verglichen werden konnten.

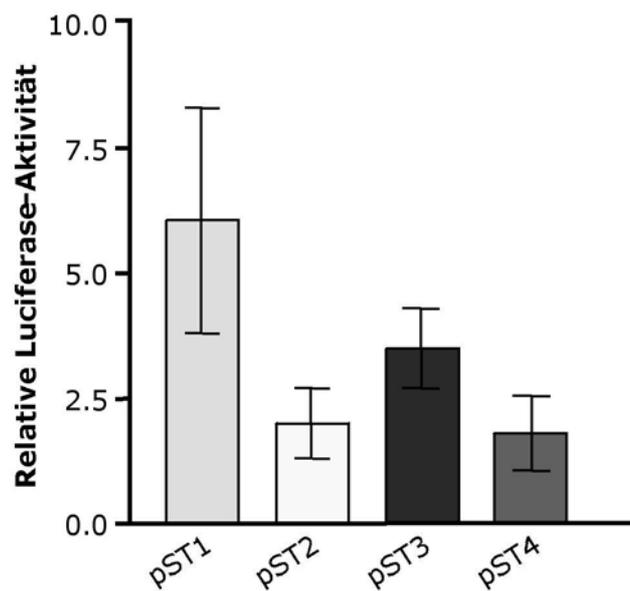


Abb. 4: Luciferase-Expression unter Kontrolle verschiedener *ehrpl27a*-5'- und 3'-flankierender Regionen.

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden mit den Expressionsvektoren pST1-4, welche jeweils die flankierenden Regionen eines *rp127a*-Gens enthalten, transfiziert. Dargestellt sind die ermittelten relativen Luciferase-Aktivitäten.

Es wurde beobachtet, dass pST1 mit einer relativen Luciferase-Aktivität von ca. 6,0 eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zu den anderen Vektoren aufwies ($P < 0,02$). pST3 verzeichnete mit einer Aktivität von ca. 3,5 eine signifikant stärkere Expression gegenüber den Vektoren pST2 und pST4 ($P < 0,01$). Die beiden letzten Konstrukte unterscheiden sich zwar in der enthaltenen 3'-Sequenz, führten jedoch zu einer nahezu gleich starken Luciferase-Aktivität um 2,0 (s. Abb. 4).

3.1.3.2 Einfluss homologer *rpl27a*-5'-Sequenzen sowie einer heterologen *aktin*-3'-nicht-kodierenden Region auf die Luciferase-Expression

Um zu ermitteln, inwieweit das nicht-kodierende *ehrpl27a*-3'-Ende die Expressionsstärke beeinflusst, wurden die Plasmide pST1-4 modifiziert. Das endogene *ehrpl27a*-3'-Ende wurde entfernt und jeweils durch die nicht-kodierende 3'-Sequenz eines *aktin*-Gens ersetzt (pST1A, pST2A, pST3A). Da pST2 und pST4 dasselbe 5'-Fragment enthielten, wurde lediglich einer der Vektoren mit der heterologen 3'-Sequenz versehen (pST2A).

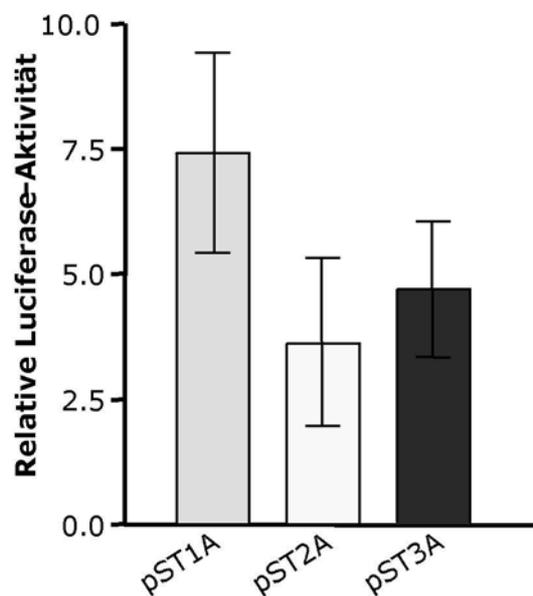


Abb. 5: Luciferase-Expression unter Kontrolle verschiedener *rpl27a*-5'-Regionen sowie einer *aktin*-3'-Sequenz.

Die Expressionsvektoren pST1A-3A, die jeweils die 5'-Region der verschiedenen *rpl27a*-Gene sowie den nicht-kodierenden 3'-Bereich eines *aktin*-Gens aus *E. histolytica* enthalten, wurden in Trophozoiten transfiziert. Dargestellt sind die ermittelten relativen Luciferase-Aktivitäten.

Nach Transfektion der Vektoren in *E. histolytica*-Trophozoiten wurden Luciferase-Aktivitäten von 7,4, 3,6 bzw. 4,7 ermittelt (s. Abb. 5). Damit zeigte sich, dass das charakteristische Expressionsmuster bestehen blieb. So verzeichnete pST1A auch in diesem Fall nach pST3A und pST2A die stärkste Aktivität. Der Unterschied zwischen einem Konstrukt mit dem endogenen *rpl27a*-3'-Ende und dem jeweiligen *aktin*-3'-Derivat ist jedoch nicht signifikant ($P= 0,3$).

Daraus wurde geschlossen, dass das endogene *rpl27a*-3'-Ende keinen Einfluss auf die absolute Stärke der Expression hat und nicht für die Aktivitätsunterschiede verantwortlich ist.

3.1.4 Deletionsanalyse der *ehrp127a-1*-Promotorregion

Um die Promotorregion der *rpl27a*-Gene genauer zu charakterisieren, wurde exemplarisch der nicht-kodierende *rpl27a-1*-5'-Bereich einer Deletionsanalyse unterzogen (aufgrund der stärksten Aktivität im Luciferase-Assay). Ausgehend von dem Expressionsvektor pST1, der 497 Bp oberhalb des *rpl27a-1*-Transkriptionsstarts enthält, wurden weitere Expressionsvektoren generiert, die jeweils kürzere 5'-Fragmente enthielten (s. 2.3.3 IIa). Nach Transfektion der Vektoren in *E. histolytica*-Trophozoiten wurde die Luciferase-Aktivität im Verhältnis zu pST1 ermittelt (s. Abb. 4). Es zeigte sich, dass die Deletion von -497 Bp (pST1) auf -380 Bp (pST1-380) eine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität auf ca. 50 % bewirkte. Die Verkürzung des 5'-Bereichs von -143 Bp auf -105 Bp reduzierte die Aktivität um weitere 50 %. Die Deletion von -105 Bp auf -55 Bp bzw. 33 Bp ergab im Vergleich zu dem Ausgangskonstrukt eine Restaktivität von 5 % bzw. ca. 8 %. In pST1+1 war das Reporter-gen stromaufwärts lediglich von der 11 Bp umfassenden 5'-nicht-translatierten-Region flankiert. Nach Transfektion dieses Vektors ließ sich praktisch keine Luciferase-Aktivität detektieren (s. Abb. 6).

Aufgrund der hier dargestellten Deletionsanalyse kann gefolgert werden, dass die *rpl27a-1*-5'-Promotorregion mindestens vier Bereiche enthält, die für die volle Promotoraktivität nötig sind.

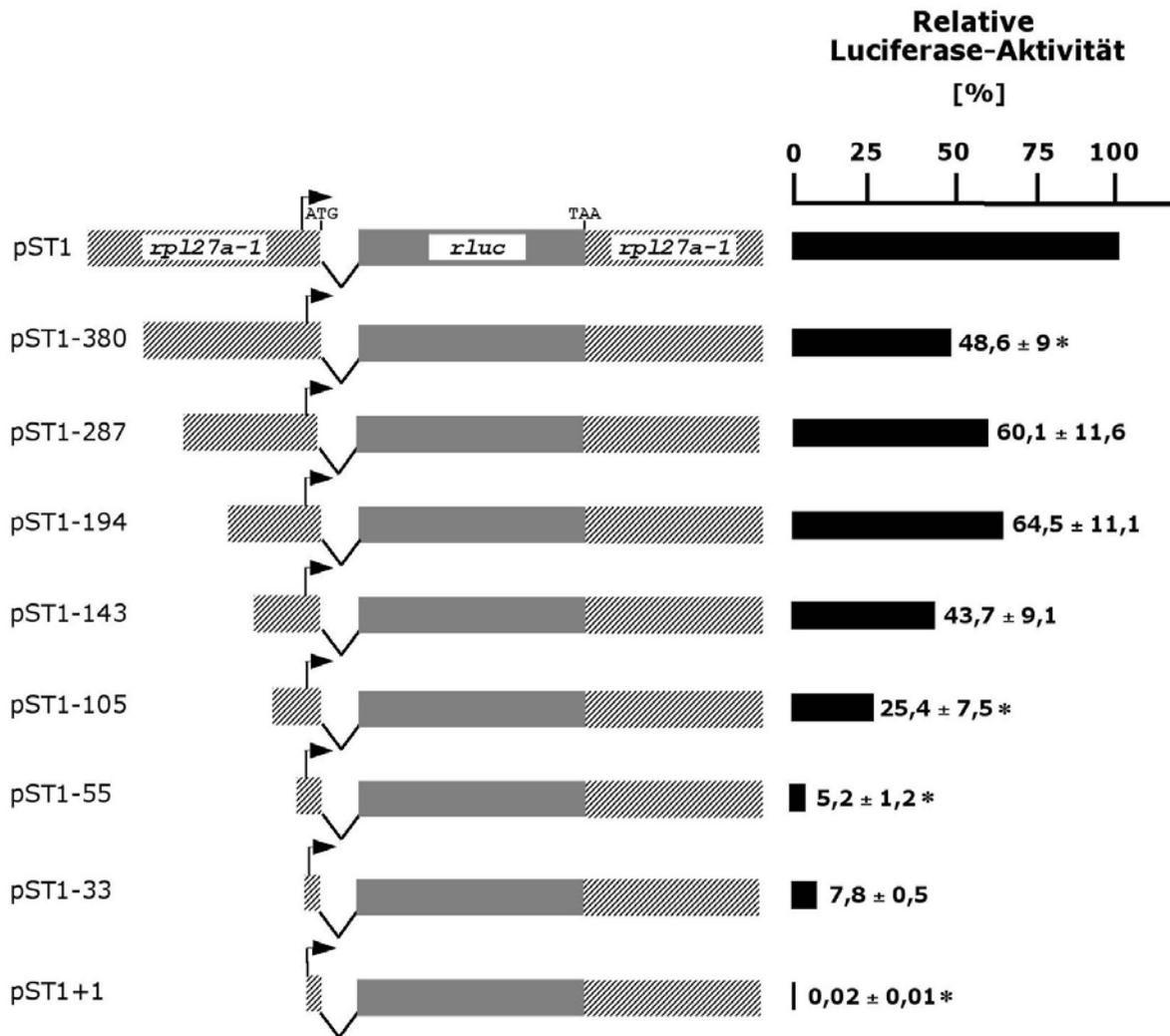


Abb. 6: Analyse des *ehrpl27a-1*-Genpromotors.

E. histolytica-Trophozoiten wurden mit pST1 oder vergleichbaren Expressionsvektoren transfiziert, die unterschiedlich lange 5'-Regionen des *ehrpl27a-1*-Gens enthalten. Die resultierenden Luciferase-Aktivitäten sind für jedes Deletionskonstrukt im Verhältnis zu pST1 angegeben. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Expressionsvektor mit der jeweils längeren 5'-Sequenz sind mit * gekennzeichnet.

3.1.5 Identifizierung eines konservierten Promotorelements in ribosomalen *E. histolytica*-Genen

Es wurden bislang nur wenige Promotorelemente, wie z.B. die sog. CCAAT-, TATA-, ATTCA- und GAAC-Boxen in *E. histolytica* identifiziert, wobei diese Elemente nur in einigen der bekannten *E. histolytica*-Gene nachgewiesen wurden. WILLHOEFT und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass das GAAC-Element 9-10 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts von *ehrpl27a-1* und *ehrpl27a-3* vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der proximalen Promotorregion der *ehrpl27a*-Gene ein neues Element identifiziert, das aus der Sequenz AGGGTT besteht. Dieses Motiv ist durch die Abfolge von drei Guanosinen sehr ungewöhnlich für Amöben, da die Gene mit 78 % einen relativ hohen Gesamt-A/T-Gehalt aufweisen (GELDERMAN et al., 1971) und somit 3 konsekutive Guanosinreste sehr selten vorkommen. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die ersten 100 Bp oberhalb des ATG-Startcodons von 15 weiteren Genen analysiert, die für große (*rpl*) bzw. kleine (*rps*) ribosomale Proteine kodieren. Das AGGGTT-Element (bzw. AACCT in *antisense*-Orientierung) kommt in allen untersuchten *rp*-Promotoren vor und befindet sich zwischen Position -9 bis -60 oberhalb des Startcodons (s. Abb 7). Es wurden außerdem die 5'-Bereiche von 18 Genen untersucht, die für andere Haushalts-Gene der Amöben kodieren. In keinem dieser Promotoren war das AGGGTT-Motiv nachzuweisen (nicht dargestellt).

3.1.6 Mutation des konservierten AGGGTT-Promotorelements

Um den Einfluss des AGGGTT-Elements auf die Genexpression zu untersuchen, wurde die Sequenz mutiert. Durch das Einfügen einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle wurde das AGGGTT-Motiv des pST1-Vektors zu GGATCC verändert und nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mit dem Wildtyp-Vektor verglichen. Die Mutation führte zur Reduktion der Aktivität um 77 % (s. Abb. 8).

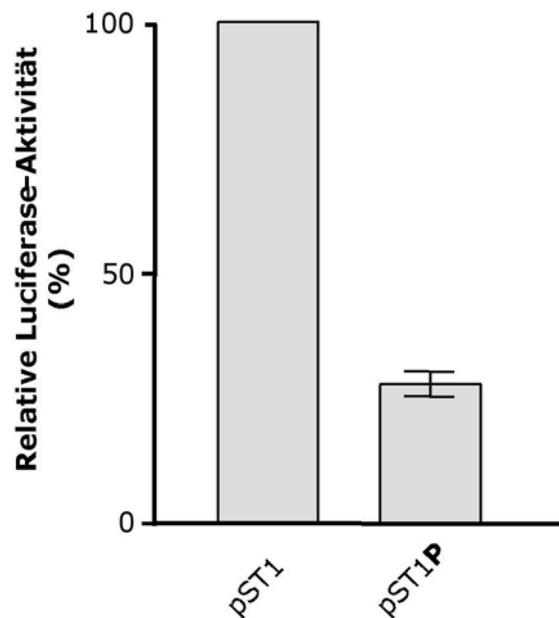


Abb. 8: Veränderung der Expression nach Mutation des AGGGTT-Promotorelements im *ehrpl27a-1*- Gen.

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden mit dem Expressionsvektor pST1P, der Mutationen im AGGGTT-Motiv aufweist, oder dem entsprechenden Wildtyp-Vektor pST1 transfiziert. Dargestellt sind die ermittelten, relativen Luciferase-Aktivitäten.

3.2 Charakterisierung von Introns in *E. histolytica*-Genen

3.2.1 Einfluss der *ehrpl27a*-Introns auf die Genexpression

Regulierende Einflüsse von Introns auf die Genexpression sind in der Literatur häufig beschrieben. Um einen möglichen Effekt der *ehrpl27a*-Introns auf die Genexpression zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Gruppen von Reporter-gen-Konstrukten hergestellt, deren *Renilla*-Luciferase-Aktivität nach

Transfektion direkt miteinander verglichen werden konnte. In der einen Gruppe von Expressionsvektoren ist das jeweilige Intron an natürlicher Position unterhalb des Startcodons ATG enthalten (pST1-4), in der zweiten Gruppe wurden die Introns deletiert (pST1-4 Δ Intron).

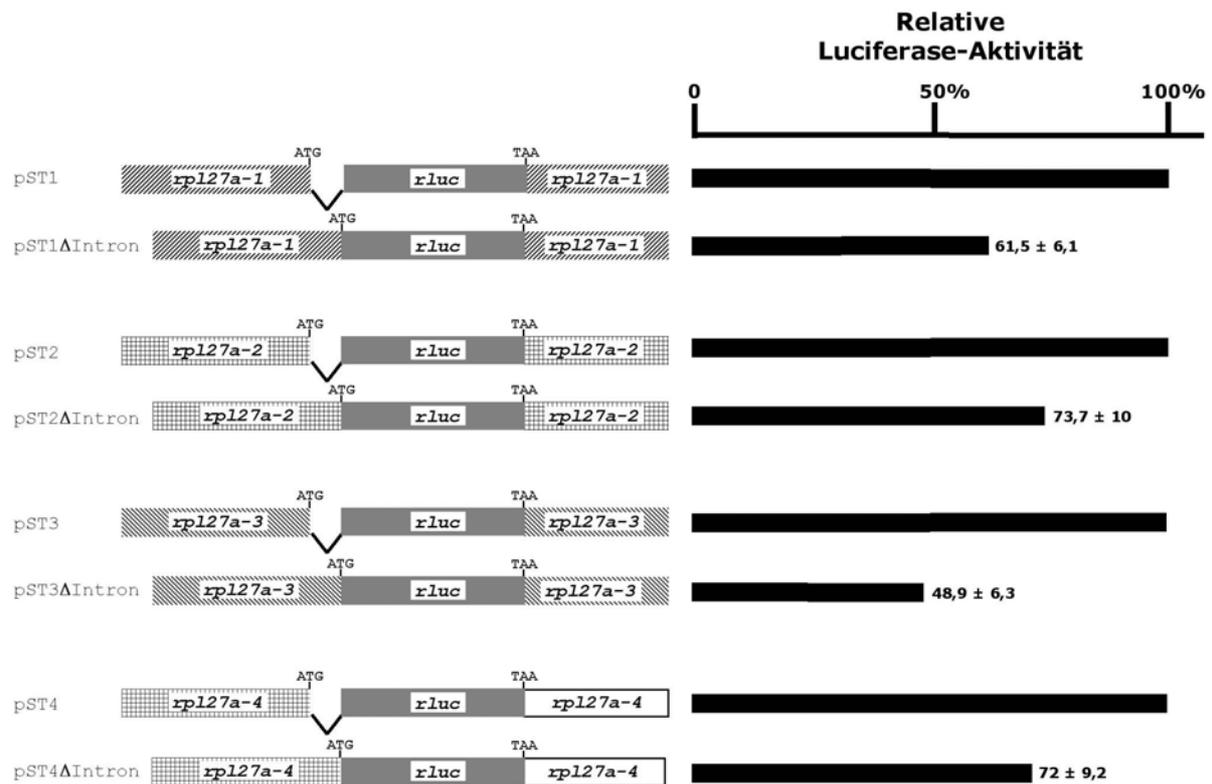


Abb. 9: Veränderung der Expression nach Deletion des jeweiligen Introns in den verschiedenen *ehrp127a*-Genen.

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden mit den Expressionsvektoren pST1-4 Δ Intron oder den entsprechenden Kontrollplasmiden pST1-4 transfiziert. Dargestellt sind die ermittelten, relativen Luciferase-Aktivitäten. Die Aktivitäten der Kontrollplasmide wurden jeweils als 100 % dargestellt.

Nach Transfektion von *E. histolytica*-Trophozoiten mit den Deletionskonstrukten zeigte sich, dass die Luciferase-Aktivität in allen Fällen gegenüber dem jeweiligen Kontrollplasmid signifikant herabgesetzt war (s. Abb. 9). Den stärksten Effekt übte das *ehrp127a-3*-Intron aus. So erreichte pST3 Δ Intron nur eine Luciferase-Aktivität von ca. 50 % gegenüber dem entsprechenden Intronhaltigen Vektor pST3 ($P < 0,0002$). Nach Deletion des *rpl27a-1* Introns (pST1 Δ Intron) verringerte sich die Luciferase-Aktivität auf 61,5 % im Vergleich

zu pST1 ($P < 0,0003$). Die Vektoren pST2 Δ Intron und pST4 Δ Intron führten zu einem Abfall der Luciferase-Aktivität um ca. 27% gegenüber den Vektoren pST2 und pST4, die identische Introns enthalten ($P < 0,004$).

3.2.2 Konservierte Sequenz-Motive in korrespondierenden Introns von *E. histolytica* und *E. dispar*

Bis zum Beginn dieser Arbeit waren in *E. histolytica* und *E. dispar* lediglich fünf Gene beschrieben, deren kodierende Regionen durch Introns unterbrochen. Auf der Suche nach weiteren Introns wurden bei der Analyse genomischer *E. histolytica*- und *E. dispar*-Klone weitere Gene mit unterbrochenen Leserahmen identifiziert, deren 5'- und 3'-Sequenzen für das gleiche Protein kodierten (WILLHOEFT et al., 2001). Diese kodierenden Bereiche wurden mit Exon-spezifischen Oligonukleotiden aus cDNA von *E. histolytica* und *E. dispar* amplifiziert. Die Produkte wurden mit den Sequenzen der entsprechenden genomischen DNA verglichen und dabei wurde bestätigt, dass es sich um intervenierende Sequenzen handelt. Ein Vergleich dieser 11 *E. histolytica* und *E. dispar*-Introns deckte übereinstimmende Bereiche auf (s. Abb. 10). Am 5'-Ende der Sequenzen findet sich ein konserviertes GTTTGTT-Motiv, das 3'-Ende weist ein konserviertes Tri-Nukleotid TAG auf und der für die Introns höherer Eukaryoten beschriebene *Branch Point*-Konsensus YNYYPuAY (PADGETT et. al., 1986) ist nur schwach konserviert. Er findet sich in nur 4 der 11 *E. histolytica*- sowie in 7 der 11 *E. dispar*-Introns. Darüber hinaus ist das eukaryotische *Branch Point*-Motiv nur zwischen 4 der 11 korrespondierenden Introns beider Amöbenspezies konserviert bzw. identisch (s. Abb. 10). Dies lässt vermuten, dass sich die *Branch Point*-Sequenz der Amöben von denen höherer Organismen unterscheidet.

<i>eh39</i> <i>ed39</i>	<u>GTTTGT</u> AATCTTAATGTCTATTCTATTTTCTTGAAATTA AAAACTTACAAAAATAG GTTTGTATCTTAATTTCTATTCTATTTT-CTTGAAATTA AAAACTTACAAAAATAG
<i>ehcbb-1</i> <i>edcbb-1</i>	GTTTGTATTTTTTT-AAAACAAAGAATTT <u>CGTTAAT</u> AAAGTAATAG GTTTGTATTTTTTTTAAAAATAAATAATAT <u>TGTTAAT</u> AAAGCAATAG
<i>ehcbb-2</i> <i>edcbb-2</i>	GTTTGTTCCTATTAATATTTTTTATTTTAATCTGTAAGTATTTACCTTGG <u>AAG</u> GTTTGTCTTAATATATTTTTTTTATTATAGTCTGTAATAATTTATTTCTGC <u>AAG</u>
<i>ehcdc2</i> <i>edcdc2</i>	GTTTGTTAATATAAAATGAAATAAAAAATAAAATAAAAGAAGATAAAAAA-GATAAAAA---GAAAGTACTGATAAAAATAG GTTTGTAAATACAAAATTAATAAAGAATAAAATAAAAGGAGAAAAAAAAGATAAAAAAGAACGAAAGTACTGATAAAAATAG
<i>ehcta</i> <i>edcta</i>	GTTTGTTTTT <u>TGTTAAT</u> TAAATTCATAATAATTGTATAAACATTTTATCATTATCTTATTTATAG GTTTGTTTTTGTTTAAATAAATACTTTATAGTT <u>TGTTAAT</u> AATTTTTTATCATTTCATCTCATTATTAG
<i>eherd2</i> <i>ederd2</i>	GTTTGT <u>TTTAAT</u> ATTTTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTT--AAAATAACAATAACAACCTCTAG GTTTGTAAAGTATTTTTTAAATAGAAATAAATATTTTTTTTTAAATAACAATAAATAACTCTAG
<i>ehorf0.6</i> <i>edorf0.6</i>	GTTTGTAAATTTTTAAATTACTTTAATAACAAAAAAAAGAATTTTTAACTTAT <u>TATTAAT</u> TTATTTAG GTTTGTAAATTTTTAAATTAC-TTAAATAACAAAAAATAA---TTAAAGATTA <u>TATTAAT</u> TTATTTAG
<i>ehstk1</i> <i>edstk1</i>	GTTTGTTTGTTAAATAACTTATAATATCTTAATCTTATGTTAG GTTTGTTTGTTAAATAGTTTATAATATCCTAGTCTTATATTTAG
<i>ehstk2</i> <i>edstk2</i>	GTTTGTATTTTCATTGTCTTTTCATTAAAAAATTGATAATTTTCGTGATTATATCAAAG GTTTGTATTTTAACTTGTCTTTTCAT--AAAAAATTGATAAGGTTATGATTTATCTGAAAG
<i>ehstk3</i> <i>edstk3</i>	GTTTGAAGAAGTATTTAACTTTAAGATTAGTTAATTTATAATTAAACATTTATAATAAG GTTTGAAGAAGTATTTAACTTTAATGTTAATTTAATTTATAATTAAAAATTTATAATAAG
<i>ehvsp</i> <i>edvsp</i>	GTTTGTAGATGTATAATTGAG-AAAGAAAGATGATACAAATATTTATTGTTGTAG GTTTGTAGTTATATAATTGAAAAAAGAAAGATGATATAAATATTTATTGTTGTAG

Abb. 10: Vergleich korrespondierender Introns aus *E. histolytica* und *E. dispar*.

Gezeigt sind Introns korrespondierender Gene aus *E. histolytica* und *E. dispar*. Alle Introns wurden experimentell bestätigt durch Vergleich von cDNA mit den entsprechenden genomischen Sequenzen. Konservierte Bereiche an den Intron-Grenzen sind blau dargestellt. Der eukaryotische Branch Point-Konsensus YNYYRAY (Y= C oder T; R= A oder G; N= beliebiges Nukleotid) ist rot hervorgehoben. Abweichungen von den Konsensussequenzen sind unterstrichen.

3.2.3 Identifizierung von Intron-Sequenzen mit funktioneller Bedeutung für das Spleißen

3.2.3.1 Linker-Scanning-Mutagenese des *ehrp127a-1*-Introns und transiente Transfektion

Um den Aufbau von Introns in *E. histolytica* genauer zu untersuchen und darüber hinaus einen besseren Einblick in den Mechanismus des Spleißens zu gewinnen, wurden verschiedene Mutationsstudien durchgeführt. Zunächst sollten Bereiche bestimmt werden, die einen Einfluss auf das Spleißen ausüben. Zu diesem Zweck wurde eine Linker-Scanning-Mutagenese des *ehrp127a-1*-Introns durchgeführt. Ausgehend vom Expressionsvektor pST1 wurden weitere Konstrukte generiert, die mindestens 3 Nukleotidaustausche pro Konstrukt aufwiesen. Dies erfolgte in den meisten Fällen durch das Einfügen einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle. Auf diese Weise wurden 55 Bp des 70 Bp umfassenden

Introns mutiert. Die Vektoren wurden in *E. histolytica*-Trophozoiten transfiziert und die Auswirkungen der Mutationen wurden über die ermittelte Luciferase-Aktivität verfolgt (s. Abb. 11).

Die meisten Mutationen führten zu keiner Veränderung der Aktivität, insbesondere auch dann nicht, wenn die Mutationen im Bereich der eukaryotischen *Branch Point*-Regionen lagen (PSTM₃₂₋₃₆ und PSTM_{32-36/49-54}). Im Gegensatz dazu wurde in den Vektoren pSTM₂₋₆ und pSTM₃₋₅, in denen das an der 5'-Spleißstelle gelegene konservierte Hepta-Nukleotid GTTTGTT zu GGATCCT bzw. GTACCTT mutiert ist, eine Rest-Aktivität von 0,03 %, bzw. 0,17 % im Vergleich zu pST1 gemessen. Die Mutation des konservierten TAG-Motivs an der 3'-Spleißstelle zu GAT (PSTM₆₇₋₇₀) führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Luciferase-Aktivität (0,2 %). Die Transition von TAG zu GAG (PSTM₆₈) verringerte die Aktivität auf 20,1 %. Zusätzlich zu den Mutationen der Endsequenzen ergab der Austausch der Nukleotide 55-66 (PSTM₅₅₋₆₀, PSTM₆₁₋₆₆) eine Verminderung der Luciferase-Aktivität um ca. 80 % bzw. 97 %.

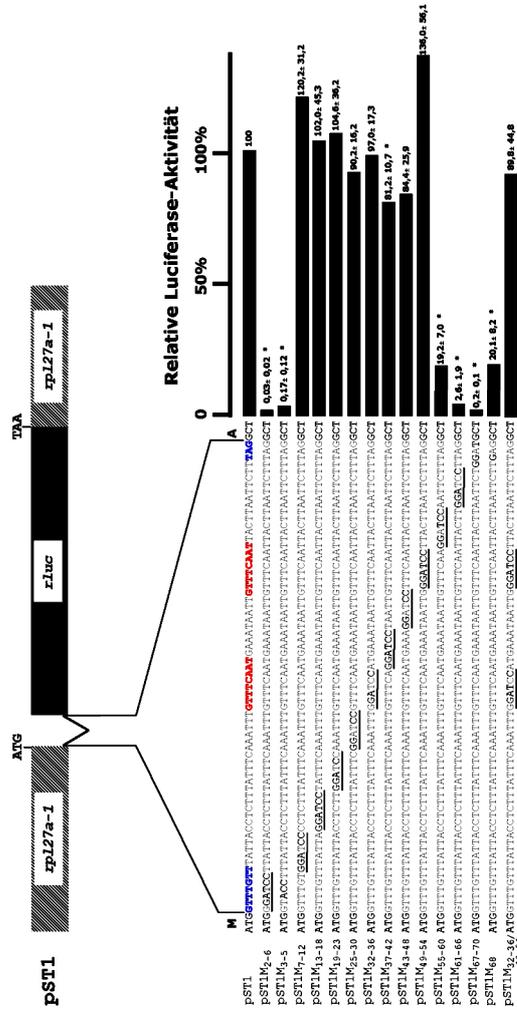


Abb. 11: Analyse des *ehpI27a-1*-Introns durch Linker-Scanning-Mutagenese und transiente Transfektion.
 Die obere Zeile des gezeigten Sequenz-Ausschnitts stellt das 70 bp umfassende *ehpI27a-1*-Intron in dem Expressionsvektor pST1 dar. Eukaryotische Branch-Point-Motive sind rot, die Konsensussequenzen an den 5'- und 3'-Enden sind blau hervorgehoben. Ausgehend von pST1 wurden weitere Vektoren erstellt, in denen zumeist durch Einfügen einer BamHI-Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) mindestens 3 Nukleotide pro Konstrukt verändert wurden (dunkelgrau markiert). Dargestellt sind die ermittelten, relativen Luciferase-Aktivitäten nach transienter Transfektion von *E. histolytica* mit den verschiedenen Plasmiden.

3.2.3.2 Nachweis des Spleißens der *rpl27a-1*-RNA in *Linker-Scanning*-Transfektanten durch RT-PCR-Analyse

Wie oben gezeigt, war nach Mutation bestimmter Bereiche des *ehrpl27a-1*-Introns die Luciferase-Aktivität stark herabgesetzt (s. Abb. 11). Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung auf eine Inhibition des Spleißens zurückzuführen war, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurde die RNA transfizierter Zellen isoliert und evtl. vorhandene DNA-Kontaminationen mit Hilfe eines DNase-Verdaus entfernt. Die gereinigte RNA wurde anschließend mit einem Luciferase-spezifischen Gegenstrang-Oligonukleotid in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für eine PCR-Amplifikation mit einem spezifischen Oligonukleotid-Paar, das unmittelbar oberhalb des Startcodons ATG bzw. an Position + 92 des *rluc*-Gens hybridisiert (s. Abb. 12 A). Sofern das Intron an vorhergesagter Position korrekt herausgeschnitten wurde, beträgt die Länge des Amplifikats 117 Bp. Bei ungespleißten Transkripten ergibt sich ein 187 Bp umfassendes Amplifikat. Die DNA wurden auf einem Agarosegel (2 %) aufgetrennt (s. Abb. 12 B). Dabei zeigte sich, dass nach Transfektion des Kontrollvektors pST1 in der Tat ein Produkt von 117 Bp generiert wurde. Die Sequenzanalyse des Amplifikats ergab, dass das *ehrpl27a-1*-Intron direkt oberhalb der 5'-GTTTGTT- und unterhalb der 3'-TAG-Spleißstelle entfernt wurde. Nach Mutation der 5'- und 3'-Spleißstellen sowie der Nukleotide 61-66 (pSTM₂₋₆, pSTM₃₋₅, pSTM₆₇₋₇₀, pSTM₆₈, sowie pSTM₆₁₋₆₆,) wies die isolierte RNA eine Größe von ca. 187 Bp auf. Es fand somit kein Spleißen statt. Nach Transfektion des Expressionsvektors pSTM₆₈ ließ sich in der mRNA neben dem 187-Bp-Amplifikat zusätzlich eine 117 Bp umfassende Bande nachweisen, was auf ein partielles Spleißen hinweist.

Zusammenfassend wurde durch die *Linker-Scanning*-Mutagenese gezeigt, dass Mutationen an den Intron-Grenzen sowie in einem 16 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle gelegenen Bereich zu einer Inhibition des Spleißens führten.

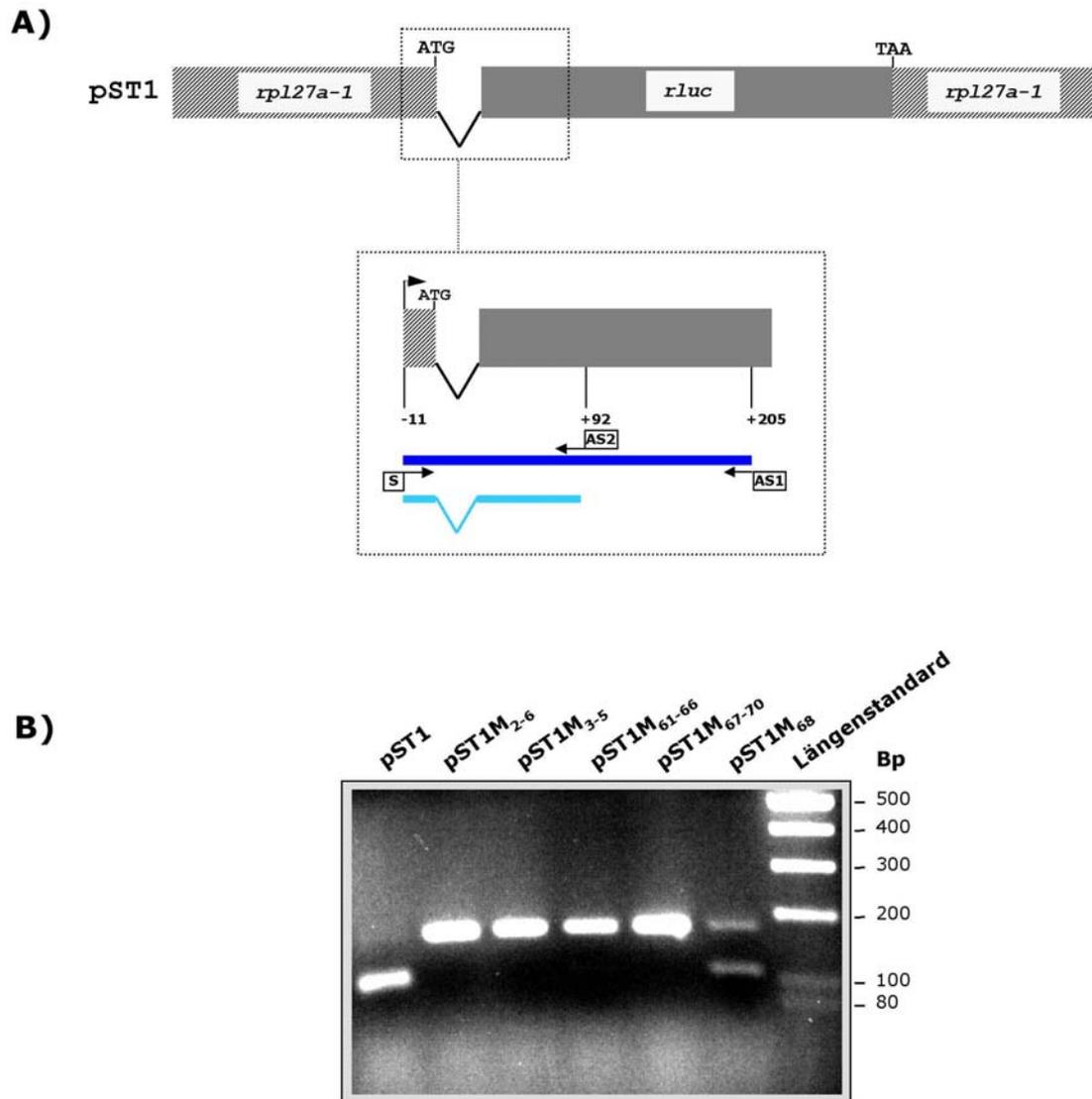


Abb. 12: Analyse der Spleißprodukte nach Transfektion verschiedener *Linker-Scanning*-Vektoren.

Gezeigt in A) ist ein vergrößerter Ausschnitt der Intron-Region des pST1-Expressionsvektors und ein Schema zur Strategie des Nachweises des Spleißens. Nach Transfektion der Amöben mit den entsprechenden Plasmiden wurde Gesamt-RNA mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid AS1 in cDNA umgeschrieben (dunkelblaue Linie). Diese diente in einem zweiten Schritt als Matrize für eine PCR, deren Amplifikat als hellblaue Linie wiedergegeben ist. Dabei wurden die Oligonukleotide S und AS2 verwendet, die unmittelbar oberhalb des Translationsinitiations-ATG, bzw. an Position + 92 des *rLuc*-Gens, binden. Dementsprechend ergibt sich bei erfolgtem Entfernen des Introns ein Amplifikat von 117 Bp. Bei ungespleißten Produkten erreicht das Amplifikat hingegen eine Länge von 187 Bp. B) *E. histolytica*-Trophozoiten wurden mit dem Wildtyp-Expressionsvektor pST1 bzw. mit den *Linker-Scanning*-Mutanten PST1M₂₋₆, PST1M₃₋₅, PST1M₆₁₋₆₆, PST1M₆₇₋₇₀, oder PST1M₆₈ transfiziert. Dargestellt ist ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose Gel (2%) der elektrophoretisch aufgetretenen PCR-Produkte.

3.2.4 Identifizierung eines putativen amöbenspezifischen *Branch Point*-Motivs in *E. histolytica*- und *E. dispar*-Introns

Die Ergebnisse der *Linker-Scanning*-Mutagenese ließen vermuten, dass ein kleiner Bereich in Nähe der 3'-Spleißstelle für den Spleißvorgang des *ehrp127a-1*-Gens von Bedeutung ist und möglicherweise die *Branch Point*-Region enthält (s. 3.2.3.2). Daraufhin wurden die bekannten *E. histolytica*- und *E. dispar*-Introns erneut und unter besonderer Berücksichtigung der hinteren 15 Bp miteinander verglichen. Neben den konservierten Bereichen an den Intron-Grenzen wurde dabei ein weiteres Motiv identifiziert das sich durch den Konsensus WYTWAY (W=A oder T; Y= C oder T) beschreiben lässt. Dieses Motiv ist zwischen korrespondierenden Introns beider Spezies konserviert und befindet sich 7-11 Nukleotide oberhalb der 3'-Spleißstelle (s. Abb. 13).

<i>eh39</i> <i>ed39</i>	GTTTGTATTCTTAATGTCTATTCTATTTTTCTTGAAATTTAAAA ACTTAC AAAAATAG GTTTGTATTCTTAATTTCTATTTCTATTTT-CTTGAAATTTAAAA ACTTAC AAAAATAG
<i>ehcbb-1</i> <i>edcbb-1</i>	GTTTGTATTTTTTT-AAAACAAAGAATTC GTTAAT AAAGTAA TAG GTTTGTATTTTTTTTAAATAAATAATAT GTTAAT AAAGCAAT TAG
<i>ehcbb-2</i> <i>edcbb-2</i>	GTTTGTTCCTATTAATATTTTTTATTTTAAATCTGTAAGT ATTAC CTGG AAG GTTTGTTCCTAATTTATTTTTTATTATAGTCTGTAAAT ATTAT TCTGC AAG
<i>ehcdc2</i> <i>edcdc2</i>	GTTTGTTAATATAAAATGAAATAAAATAAAATAAAAGAAGATAAAAAA-GATAAAAA----GAAAGT ACTGAT AAAAAT TAG GTTTGTTAATACAAAAATAAATAAGAATAAATAAAAGGAAGAAAAAAGATAAAAAAGAACGAAAGT ACTGAT AAAAAT TAG
<i>ehcta</i> <i>edcta</i>	GTTTGTTTTTGTAAATTAATTCATAATAATTGTATAAAACATTTTATCATTTTA TCTTAT TTTAT TAG GTTTGTTTTTGTAAATAAATACTTTATAGTTGTGTTAATAATTTTATCATTTCA TCTCAT TTTAT TAG
<i>eherd2</i> <i>ederd2</i>	GTTTGTTTAATATTTTAAATAGAAATAACATTTTTTTT--AAAATAAAC AATAACA ACTCT TAG GTTTGTAAAGTATTTTAAATAGAAATAATTTTTTTTTTAAATAAAC AATAA ACTCT TAG
<i>ehorf0.6</i> <i>edorf0.6</i>	GTTTGTAAATTTTAAATTAATTAATAACAAAAAAGAAATTTTAACTTAT ATTAAT TTAT TAG GTTTGTAAATTTTAAATTAATTAATAACAAAAAATAA----TTTAAAGATTAAT ATTAAT TTAT TAG
<i>ehstk1</i> <i>edstk1</i>	GTTTGTTTGTTAAATAACTTATAATATTCTTA TCTTAT GTT TAG GTTTGTTTGTTAAATAGTTTATAATATTCCTAG TCTTAT ATT TAG
<i>ehstk2</i> <i>edstk2</i>	GTTTGTTTTATTTTCATTTGTCTTTTCATTAATAAAATGATAATTTCTG GATTAT ATCAAT TAG GTTTGTTTTATTTAACTTGTCTTTTCAT--AAAAAATGATAAGGTAT GATTAT CTGA CAG
<i>ehstk3</i> <i>edstk3</i>	GTTTGAATAAGTATTTAATTTTAAAGATTAGTTAATTTATAAATTAAC ATTATA ATAT TAG GTTTGAAGAAGTATTTAACTTTAATGTTAATTAATTTATAAATTAAC ATTATA ATAT TAG
<i>ehvsp</i> <i>edvsp</i>	GTTTGTTAGATGTATAATTGAG-AAAGAAAGATGATACAAAT ATTAT TGTTG TAG GTTTGTAGTTATATAATTGAAAAAGAAAGATGATATAAAT ATTAT TGTTG TAG

Abb. 13: Identifizierung eines möglichen Entamöben-spezifischen *Branch Point*-Konsensus.

Die dargestellten korrespondierenden Introns aus *E. histolytica* und *E. dispar* entsprechen denen aus Abb. 10. Unter besonderer Beachtung der Sequenzen am 3'-Ende fand sich das rot-markierte konservierte Motiv WYTWAY (W= A oder T; Y= C oder T).

Durch den Vergleich verschiedener Introns von *E. histolytica* und *E. dispar* sowie die Durchführung einer *Linker-Scanning-Analyse* der intervenierenden *ehrpl27a-1*-Sequenz ließen sich in den Amöben-Introns drei Konsensus-Regionen identifizieren. Sie sind an der 5'-Spleißstelle (GTTTGTT), der 3'- Spleißstelle (TAG) sowie 7-11 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle (WYTWAY, wobei W=A oder T; Y= C oder T) lokalisiert.

3.2.5 Konservierte Motive in anderen *E. histolytica*-Introns

Im Zuge der Sequenzierung des *E. histolytica*-Genoms wurden 46 weitere Introns identifiziert (LOFTUS, persönliche Mitteilung). Die Analyse dieser Sequenzen ergab, dass *E. histolytica*-Introns eine durchschnittliche Länge von 65 Bp und einen A/T-Gehalt von 82 % aufweisen. Unter Einbeziehung der prozentualen Häufigkeit einzelner Nukleotide an entsprechender Position enthalten sie stets die Konsensussequenzen $G_{100}T_{100}T_{100}T_{98}G_{98}T_{92}T_{58}$ am 5'- bzw. $T_{92}A_{100}G_{100}$ am 3'-Ende sowie das Motiv $W_{92}Y_{94}T_{100}W_{92}A_{100}Y_{96}$ (W=A oder T; Y= C oder T), das sich 7 bis 11 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle befindet. Es sei hervorgehoben, dass der Thymidin-Rest an Position 3 und der Adenosin-Rest an Position 5 innerhalb des Motivs in allen bislang identifizierten Amöben-Introns vorhanden sind (s. Abb. 14).

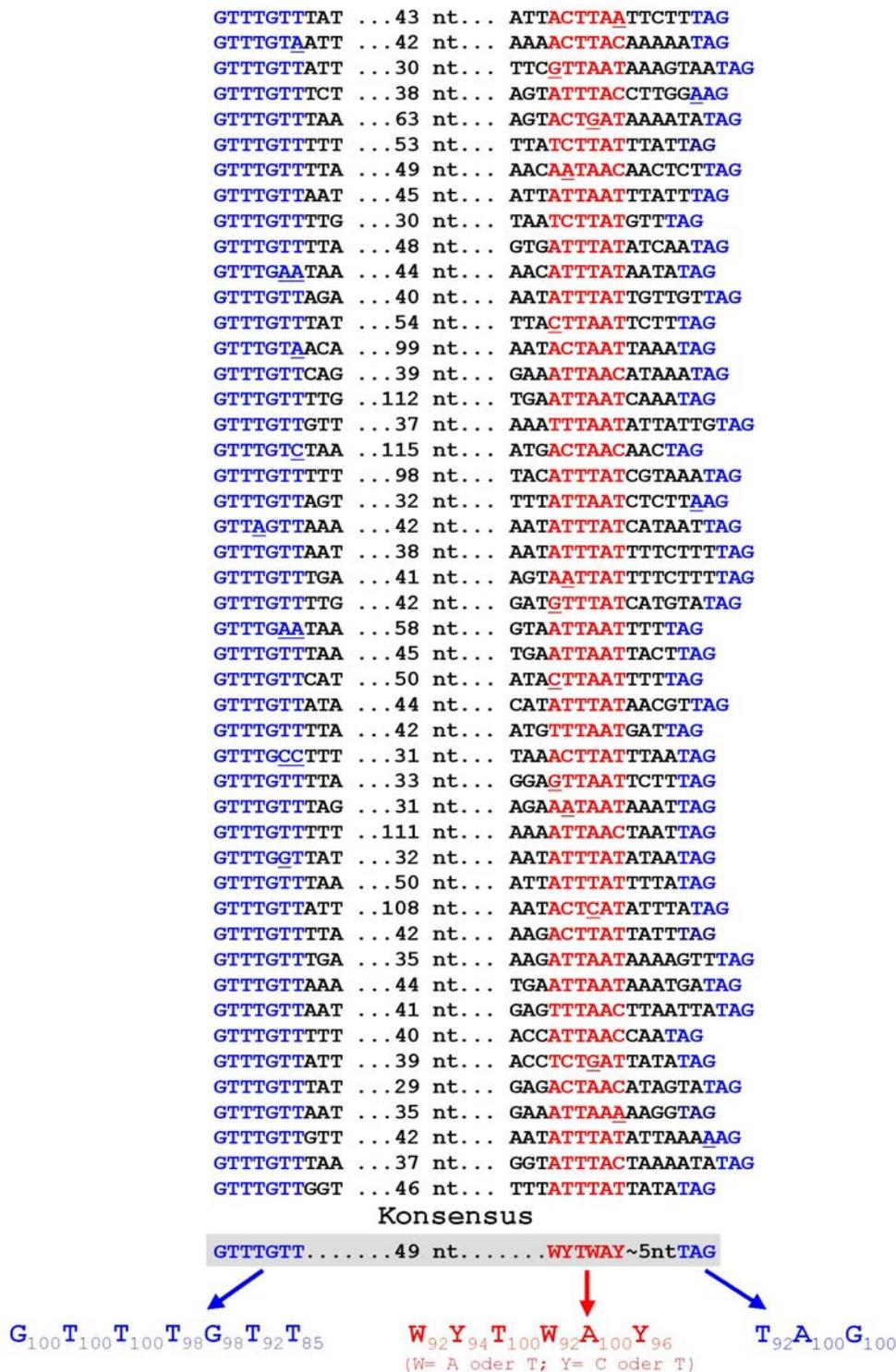


Abb. 14: Vergleich verschiedener Introns aus *E. histolytica*.

Die Abbildung zeigt die konservierten Bereiche aus 46 Introns. Die Sequenzen wurden bei der Analyse eines Teils des *E. histolytica* Genoms identifiziert (LOFTUS, persönliche Mitteilung). Die konservierten Motive an den 5'- und 3'-Spleißstellen (GTTTGT bzw. TAG) sind blau, das putative *Branch Point*-Motiv WYTWAY (W= A oder T; Y= C oder T) ist rot hervorgehoben. Davon abweichende Nukleotide sind unterstrichen. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die nicht dargestellten Nukleotide zwischen der 5'-Spleißstelle und dem putativen *Branch Point*-Motiv. Die Zahlenangaben in den Motiven beziehen sich auf die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Nukleotide an entsprechender Position.

3.2.6 Untersuchungen zur Relevanz des invarianten Adenosin-Nukleotids in der putativen *Branch Point*-Region verschiedener *E. histolytica*-Introns

3.2.6.1 Einfluss von Punktmutationen auf das Spleißen in *E. histolytica*

Für die Formation des Spleißosoms sind die konservierten Sequenz-Elemente an der 5'- und 3'-Spleißstelle sowie die *Branch Point*-Region eines Introns notwendig (s. Abb. 1.2). Die Erkennung der *Branch Point*-Region ist dabei ein initialer Schritt und ein invariantes Adenosin-Nukleotid innerhalb des *Branch Point*-Motivs bewirkt die Ausbildung der charakteristischen Lassostruktur (s. Abb. 1.1). Sollte das amöbenspezifische WYTWAY-Motiv (W=A oder T; Y= C oder T) tatsächlich die *Branch Point*-Region in *E. histolytica*-Introns darstellen, so ist zu erwarten, dass der invariante Adenosin-Baustein für das Spleißen absolut notwendig ist. Daher wurde das invariante Adenosin-Nukleotid putativer *Branch Point*-Regionen in 6 verschiedenen *E. histolytica*-Introns untersucht. In Frage kommende Adenosin-Reste wurden dabei zu Guanosin-Rest mutiert. Die intervenierenden Sequenzen wurden in An- oder Abwesenheit der entsprechenden Mutation in Expressionsvektoren kloniert. Es wurden sowohl Introns aus solchen Genen ausgewählt, die in der putativen *Branch Point*-Region nur ein Adenosin-Nukleotid enthalten (*ehvsp* in pST1.3, *eh39* in pST1.4, und *ehstk1* in pST1.5), als auch Introns, die in benachbarter Position einen weiteren Adenosin-Rest aufweisen (*ehrp127a-1* in pST1, *ehorf0.6* in pST1.1 und *eherd2* in pST1.2). Die Plasmide wurden in *E. histolytica*-Trophozoiten transfiziert und die Auswirkungen der Mutationen wurden über die ermittelte Luciferase-Aktivität verfolgt, die im Verhältnis zum jeweiligen Basisvektor dargestellt wurde (s. Abb. 15). Die Mutation des einzigen Adenosin-Restes in der putativen *Branch Point*-Region der Vektoren pST1.3_{A₄₆→G}, pST1.4_{A₄₉→G}, und pST1.5_{A₃₉→G} führte zu einer Luciferase-Aktivität von < 2% im Vergleich zum jeweiligen Basisvektor. Die Mutation invarianter Adenosin-Reste in den Introns der Vektoren pST1_{A₆₁→G}, pST1.1_{A₆₂→G} und pST1.2_{A₅₄→G} resultierte in Luciferase-Aktivitäten von 10,3 %, 0,3 %, und 9,3 %. Hingegen führte die Mutation des jeweiligen benachbarten Adenosin-Restes in den Vektoren pST1_{A₆₂→G}, pST1.1_{A₆₁→G} pST1.2_{A₅₃→G} zu einem deutlich anderen Ergebnis. Es wurden Luciferase-Aktivitäten von 70 %, 92 % und 123% erreicht. Die Untersuchungen zeigten somit, dass lediglich die Mutation des invarianten, nicht aber eines benachbarten Adenosin-Restes in der

putativen *Branch Point*-Region verschiedener *E. histolytica*-Introns einen signifikanten Abfall der Luciferase-Aktivität bewirkt.

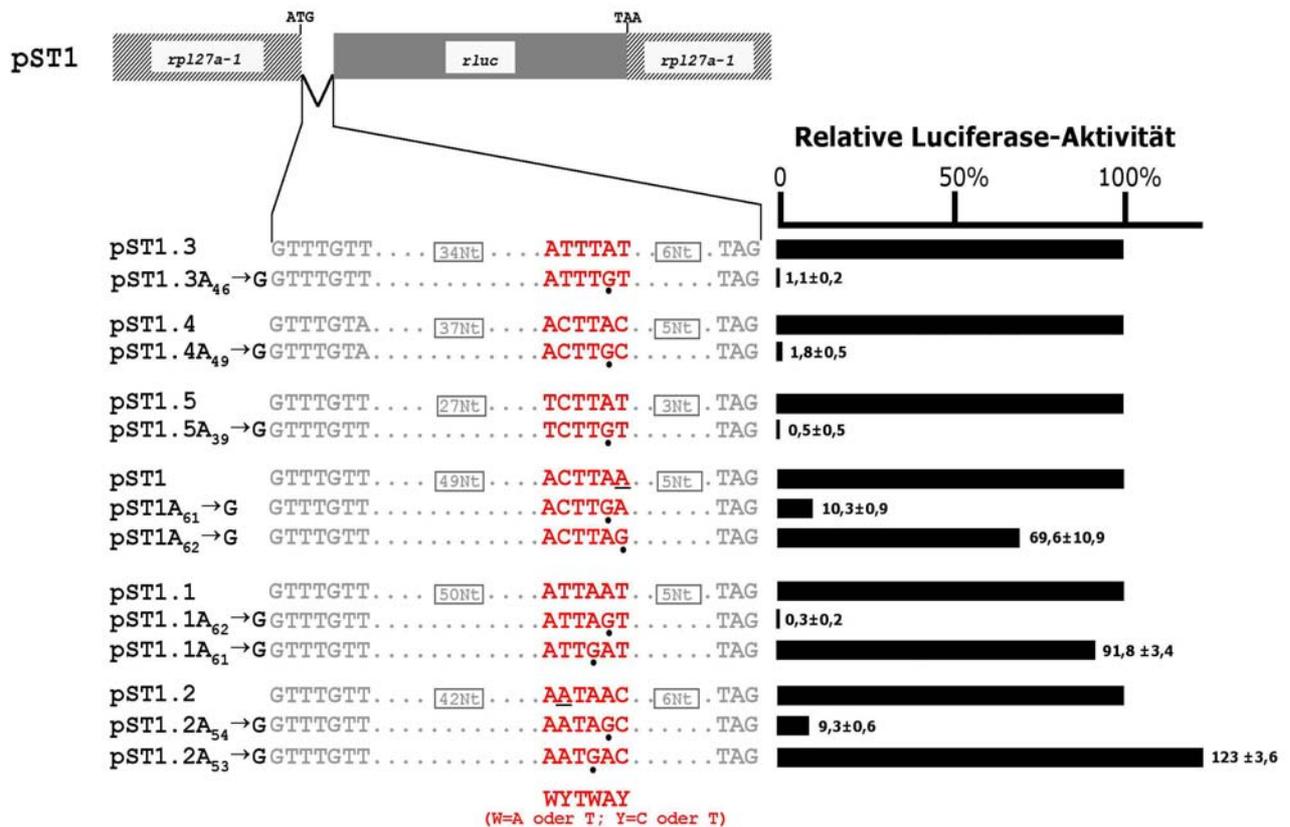


Abb. 15: Einfluss des invarianten Adenosin-Nukleotids innerhalb des putativen *Branch Point*-Motivs auf die Luciferase-Aktivität.

Um die Bedeutung des invarianten Adenosin-Nukleotids für das Spleißen in *E. histolytica* weitergehend zu analysieren, wurden ausgehend von pST1 verschiedene chimäre Basisexpressionsvektoren hergestellt. Diese enthalten die Introns folgender Gene: *ehorf0.6* (pST1.1), *eherd2* (pST1.2), *ehvsp* (pST1.3), *eh39* (pST1.4), oder *ehstk1* (pST1.5). Die Konsensussequenzen an den Grenzen der Introns sind in hellgrau, das putative *Branch Point*-Motiv WYTWAY ist rot dargestellt. Abweichungen innerhalb der *Branch Point*-Konsensus Sequenzen sind schwarz unterstrichen. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die nicht dargestellten Nukleotide zwischen der 5'- bzw. 3'-Spleißstelle und dem putativen *Branch Point*-Motiv. Darüberhinaus wurden Mutationskonstrukte generiert, in denen der invariante Adenosin-Baustein oder benachbarte Adenosin-Reste gegen einen Guanosin-Rest ausgetauscht wurden (durch einen schwarzen Punkt hervorgehoben). Die Luciferase-Aktivität nach Transfektion der verschiedenen Expressionsplasmide ist in Prozent zum jeweiligen Basisvektor angegeben.

3.2.6.2 RT-PCR-Analysen zum Nachweis des Spleißens in WYTWAY-Mutanten

Unter 3.2.6.1 wurde gezeigt, dass A→G-Transitionen in der *Branch Point*-Region verschiedener Introns zu einer Inhibition der Luciferase-Aktivität führten. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde ermittelt, ob dies auf eine Inhibition des Spleißens zurückzuführen war. Dabei wurde die Luciferase mRNA spezifisch aus transfizierten Trophozoiten amplifiziert (das Prinzip ist unter 3.2.3.2 genauer beschrieben). Nach erfolgreicher Vervielfältigung gespleißter Transkripte ergibt sich ein 117 Bp umfassendes Fragment. Ungespleißte Produkte weisen, je nach Länge des jeweiligen Introns, ein größeres Amplifikat auf. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarosegel (2 %) aufgetrennt (s. Abb. 16). Nach Amplifikation der Intron-enthaltenden Basisvektor-DNA pST1.3, pST1.4 und pST1.5 entsprachen die Produkte der erwarteten Länge von 173 Bp, 175 Bp und 163 Bp. Die Mutation des jeweils einzigen invarianten Adenosin-Nukleotids (pST1.3_{A₄₆}→G, pST1.4_{A₄₉}→G und pST1.5_{A₃₉}→G) resultierte nach Transfektion und cDNA-Synthese in Banden derselben Größe, bei pST1.5_{A₃₉}→G findet sich zusätzlich ein Produkt von ca. 100 Bp. Nach Transfektion der Basisvektoren hingegen erreichten die PCR-Produkte eine Länge von 117 Bp und diese Größendifferenz entsprach der Länge des jeweiligen Introns. In allen Fällen führte die Amplifikation gereinigter RNA (Kontrolle) zu keinem Produkt, wodurch die Kontamination der Ansätze mit Plasmid-DNA ausgeschlossen wurde.

In dem Vektor pST1_{A₆₁}→G ist das invariante Adenosin-Nukleotid mutiert und nach Transfektion dieses Mutationskonstrukts erreichte das PCR-Amplifikat eine Länge von 187 Bp. Auch diese Bande gleicht in ihrer Länge jener, die mit der Basisvektor-DNA (pST1) erzielt wurde. Nach Transfektion derselben DNA und anschließender Reamplifikation aus RNA wurde hingegen ein um 70 Bp kleineres Produkt erzielt. Dies entspricht der Länge des *ehrp127a-1*-Introns, das in diesem Vektor herausgeschnitten wurde. Nach Transfektion von pST1.1 sowie der Mutante pST1.1_{A₆₂}→G entstanden zwei Banden verschiedener Größe (ca. 117 bzw. 127 Bp). Eine Sequenzanalyse des größeren PCR-Produktes ergab, dass das mutierte *ehorf0.6*-Intron an einer anderen Stelle gespleißt wurde. Durch den eingefügten Guanodin-Rest entsteht ein zusätzliches TAG. Ein derartiges Tri-Nukleotid bildet das hochkonservierte 3'-Ende der Amöben-Introns, und es zeigte sich, dass die intervenierende Sequenz an dieser neu erzeugten 3'-Spleißstelle herausgeschnitten wurde. Die Länge der gespleißten mRNA war damit um 9 Nukleotide größer im Vergleich zur Wildtyp-RNA. Auch

bei der Mutation des *eherd2*-Introns entsteht ein zusätzliches TAG-Motiv. Es zeigte sich, dass ein Teil der pST1.2_{A54→G}-mRNA nach Transfektion ungespleißt vorliegt, wobei der andere Teil direkt unterhalb der neu entstanden TAG-Konsensussequenz gespleißt wurde.

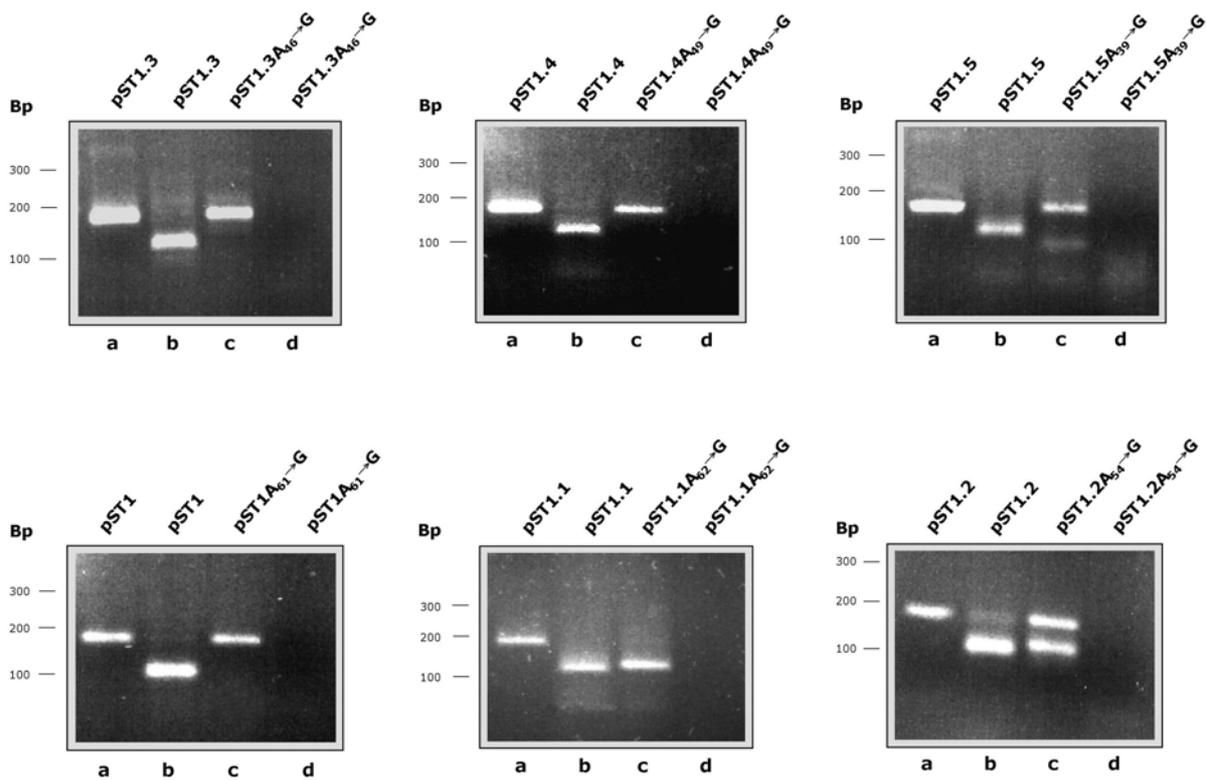


Abb. 16: Bedeutung des invarianten Adenosin-Nukleotids innerhalb des putativen *Branch Point*-Motivs für das Spleißen in *E. histolytica*.

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der Luciferase-Aktivität in den Mutationskonstrukten auf eine Inhibition des Spleißens zurückzuführen ist, wurden entsprechende RT-PCR Analysen durchgeführt (siehe Abb. 12). Dargestellt sind Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele (2%) mit den erzielten Amplifikationsprodukten. Folgende Matrizen wurden für die PCR verwendet: a) Basisvektor, b und c) cDNA transfizierter Zellen, d) gereinigte RNA transfizierter Zellen (Kontrolle).

Durch Punktmutationen in verschiedenen *E. histolytica*-Introns ließ sich eine Veränderung der Spleiß-Produkte beobachten. Die intervenierenden Sequenzen wurden entweder nur teilweise, an falscher Position, oder aber gar nicht aus der prä-mRNA entfernt. Demnach ist die Präsenz des invarianten

Adenosin-Nukleotids in der *Branch Point*-Region untersuchter Introns für ein korrektes Spleißen notwendig.

3.2.7 Identifizierung des relevanten *Branch Point*-Adenosins im *ehorf0.6*-Intron

Der Vergleich der verschiedenen *E. histolytica*-Introns hat gezeigt, dass die Position des *Branch Point*-Motivs WYTWAY (W=A oder T; Y= C oder T) stark konserviert ist und sich durchschnittlich 9 Bp oberhalb der jeweiligen 3'-Spleißstelle befindet. Daher ist zu vermuten, dass die Distanz der *Branch Point*-Region zur 3'-Spleißstelle auf der prä-mRNA von großer Bedeutung für den Spleißvorgang ist. Interessanterweise enthält das Intron des *ehorf0.6*-Gens drei Bereiche, die der Sequenz WYTWAY entsprechen. Diese sind an Position -5, -9 und -16 relativ zur 3'-Spleißstelle lokalisiert. Es sollte untersucht werden, welches der 3 Motive von *E. histolytica* während des Spleißens genutzt wird. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Mutation des invarianten Adenosin-Bausteins innerhalb des *Branch Point*-motivs von *E. histolytica*-Introns zu einem fehlerhaften Spleißen führt (s. 3.2.6). Dieses Phänomen wurde zur Identifizierung des genutzten *Branch Point*-Motivs ausgenutzt. Ausgehend vom Expressionsvektor pST1.1, der das 71 Bp umfassende *ehorf0.6*-Intron enthält, wurden 3 weitere Vektoren generiert. In diesen wurde das invariante Adenosin-Nukleotid an Position -5, -9 bzw. -16 des jeweiligen *Branch Point*-Motivs zu Guanosin mutiert (pST1.1_{A62} G, pST1.1_{A55} G sowie pST1.1_{A66} G). Nach Transfektion der Vektoren in *E. histolytica*-Trophozoiten zeigte sich, dass ausschließlich pST1.1_{A62} G zu einer Inhibition der Luciferase-Aktivität führte, während Mutationen an Position 54 oder 65 des *ehorf0.6*-Introns (pST1.1_{A55} G sowie pST1.1_{A66} G) keine Veränderung der Luciferase-Aktivitäten bewirkten (s. Abb. 17).

Das Ergebnis verdeutlicht, dass lediglich das *Branch Point*-Motiv an Position -9, nicht aber an Position -5 oder -16 oberhalb der Intron-Grenze TAG für den Spleißvorgang relevant ist.

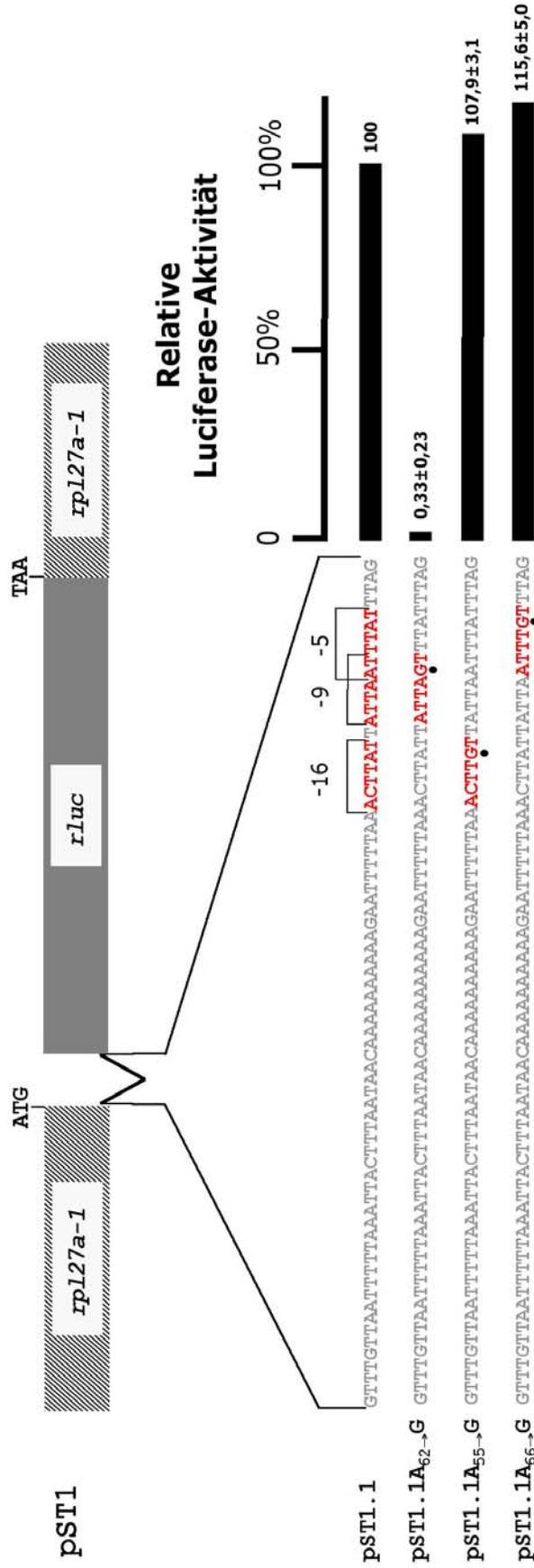


Abb. 17: Analyse möglicher Branch Point-Motive im ehorf0.6-Intron.

Das Intron des ehorf0.6-Gens besitzt drei putative Branch Point-Motive (WYTWAY), die an Position -5, -9 und -16 oberhalb der 3'-Spleißstelle lokalisiert sind. Um die Relevanz der einzelnen Motive für das Spleißen zu bestimmen, wurden ausgehend von dem Basisvektor pST1.1 Mutationskonstrukte generiert, in denen jeweils das invariante Adenosin-Nukleotid gegen ein Guanosin ausgetauscht wurde. Die Luciferase-Aktivität nach Transfektion der verschiedenen Expressionsplasmide ist in Prozent zum Basisvektor angegeben.

3.2.8 Das Vorhandensein amöbenspezifischer Konsensusmotive in einem artifiziiellen Intron ermöglicht das Spleißen in *E. histolytica*

Die bisher erzielten Resultate haben gezeigt, dass *E. histolytica*-Introns drei konservierte Sequenzmotive enthalten, die für das Entfernen von Introns erforderlich sind (s. 3.2.3). Um zu ermitteln, ob das Vorhandensein allein dieser Motive nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für das Spleißen ist, wurde ein „artifizielles“ Intron synthetisiert. Dieses Intron besteht aus 46 Bp und entspricht damit der Länge des kürzesten Introns, das bislang in *E. histolytica* gefunden wurde. Es wurde eine Nukleotidsequenz gewählt, die am 5'-Ende die Konsensus-Sequenz GTTTGTT und am 3'-Ende die Konsensus-Sequenz TAG bildet und das amöbenspezifische *Branch Point*-Motiv (ATTTAT) wurde 9 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle platziert (s. Abb. 18 A). Mit Ausnahme der konservierten Bereiche im hinteren Teil des Introns ist das synthetische Intron durch ein Fehlen von Adenosinen gekennzeichnet. Stattdessen wurden Guanosine, Cytosine und Thyminidine in zufälliger Abfolge eingefügt. Dieses Intron weist einen A/T-Gehalt von nur 63 % auf und unterschreitet damit deutlich den zuvor für die *E. histolytica*-Introns beobachteten A/T-Gehalt von 82 % (s. 3.2.5). Dieses artifizielle Intron wurde in den Expressionsvektor pST1.6 kloniert und in *E. histolytica*-Trophozoiten transfiziert. Interessanterweise lag die Stärke der Luciferase-Aktivität (nicht dargestellt) im Rahmen jener Aktivität, wie sie mit den zuvor beschriebenen Vektoren erzielt wurde (s. Basisvektoren pST1.1-pST1.5 unter 3.2.6.1).

Um sowohl die Relevanz des Adenosin-Bausteins beim Spleißen als auch die Funktionalität des gesamten *Branch Point*-Motivs in Abhängigkeit zu seiner Position zu untersuchen, wurde das *Branch Point*-Motiv des artifiziiellen Introns im Vektor pST1.6 auf folgende Weise verändert. Einerseits wurde der invariante Adenosin-Rest des *Branch Point*-Motivs zu Guanosin mutiert (pST1.6b), andererseits wurde das gesamte Motiv von Position -9 auf Position -32 oberhalb der 3'-Spleißstelle verschoben (pST1.6a). Nach Transfektion beider Vektoren ergab sich eine im Vergleich zu pST1.6 verminderte Luciferase-Aktivität von ca. 0,2 %.

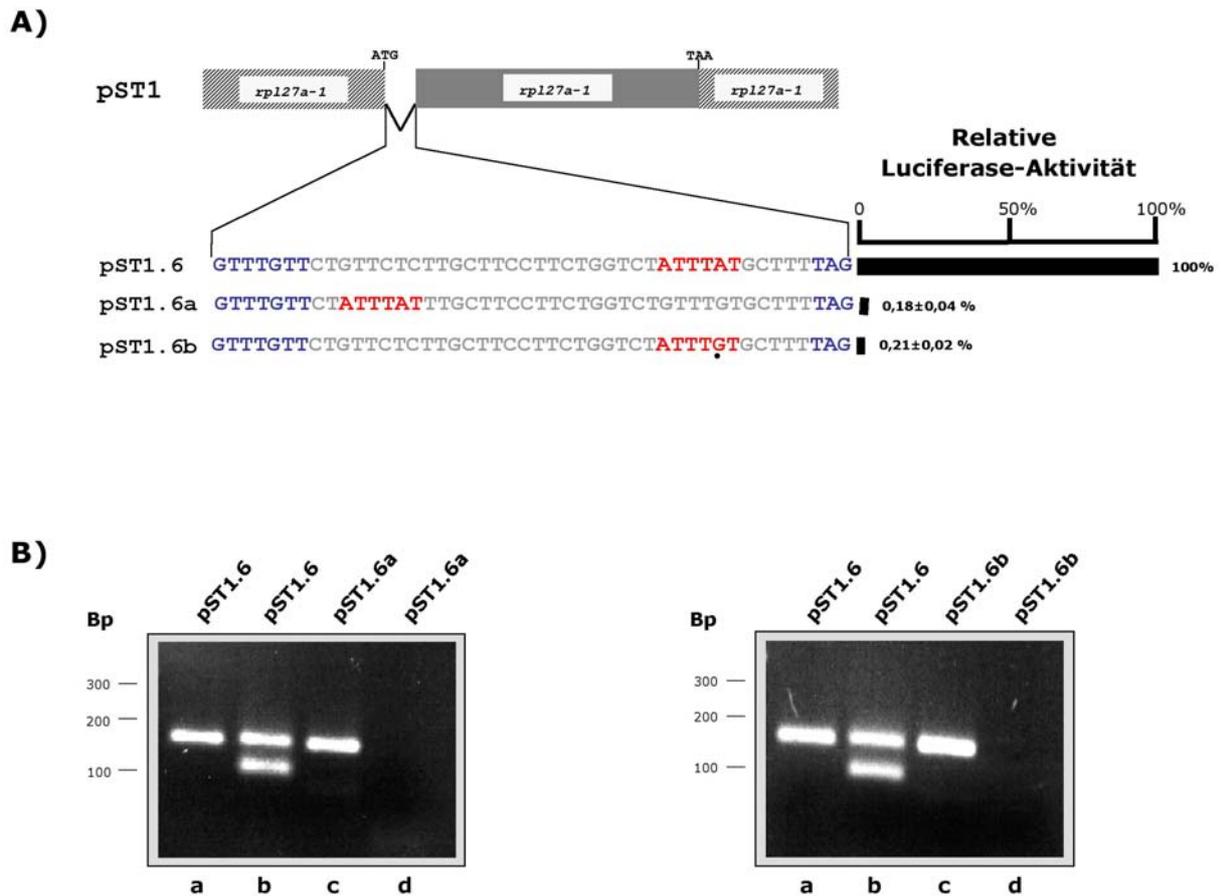


Abb. 18: Analyse des Spleißens nach Transfektion artifiziieller Introns.

A) Die 46 Bp umfassende Sequenz eines artifiziiellen Introns wurde in den Expressionsvektor pST1 kloniert (pST1.6). Die 5'- und 3'-Konsensussequenzen sind blau, das *Branch Point*-Motiv WYTWAY (W= A oder T; Y= C oder T) ist rot hervorgehoben. Die weitere Sequenz dagegen ist nicht amöbenspezifisch und besteht aus einer zufällig gewählten Abfolge von Cytosinen, Guanosinen und Thymidinen. Mit Hilfe des Expressionsplasmids pST1.6 sollte untersucht werden, ob die Konsensussequenzen ausreichend für das Spleißen sind. Um außerdem zu überprüfen, ob die Position des *Branch Point*-Motivs das Spleißen beeinflusst, wurde es von Position -9 nach -32 relativ zur 3'-Spleißstelle transloziert (pST1.6a). Die Relevanz des invarianten Adenosin-Nukleotids wurde mit Hilfe von pST1.6b überprüft. Dieser Vektor enthält eine Adenosin→Guanosin-Transition in dem *Branch Point*-Motiv (durch einen schwarzen Punkt hervorgehoben). Dargestellt ist die Luciferase-Aktivität nach Transfektion der Plasmide in Prozent zu pST1.6. B) Um zu überprüfen, ob die Abnahme der Luciferase-Aktivität in den Konstrukten pST1.6a und pST1.6b auf eine Inhibition des Spleißens zurückzuführen ist, wurden entsprechende RT-PCR Analysen durchgeführt (siehe Abb. 12 A). Bei erfolgreichem Spleißen des Introns ergibt sich ein Amplifikat von 117 Bp. Bei ungespleißten Produkten erreicht das Amplifikat eine Länge von 163 Bp. Dargestellt sind Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele mit den erzielten Amplifikationsprodukten. Folgende Matrizen wurden für die PCR verwendet: a) Basisvektor, b und c) cDNA transfizierter Zellen, d) gereinigte RNA transfizierter Zellen (Kontrolle).

Zur genaueren Analyse wurde erneut eine RT-PCR durchgeführt und die Produkte wurden auf einem Agarosegel (2 %) aufgetrennt (s. Abb. 18 B). Sofern das artifizielle Intron korrekt entfernt wurde, ergibt sich ein Amplifikat von 117 Bp und ungespleißte Produkte weisen eine Länge von 163 Bp auf. In den Spuren b wurden zwei Banden mit einer Größe von ca. 117 Bp bzw. 163 Bp amplifiziert. Dies deutet darauf hin, dass das artifizielle Intron des Expressionsvektors pST1.6 partiell gespleißt wurde. Eine Sequenzanalyse der PCR-Produkte bestätigte, dass das artifizielle Intron direkt oberhalb des GTTTGTT- und unterhalb des TAG-Motivs entfernt wurde. Hingegen ergab sich nach der Transfektion und RT-PCR von pST1.6a und pST1.6b in den Spuren c je eine ca. 163 Bp umfassende Bande was zeigt, dass diese Introns nicht herausgeschnitten wurden.

Durch die Untersuchungen an artifiziellen Introns konnte gezeigt werden, dass die in Amöben-Introns gefundenen Konsensus-Sequenzen an der 5'-Spleißstelle (GTTTGTT), der 3'-Spleißstelle (TAG) und der *Branch Point*-Region (WYTWAY, wobei W=A oder T; Y= C oder T) hinreichend für ein korrektes Spleißen sind. Darüber hinaus wurde die Positionsabhängigkeit des *Branch Point*-Motivs für das Spleißen der *E. histolytica*-Gene bestätigt.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung des *ehrpl27a*-Promotors

4.1.1 Die *ehrpl27a*-Gene sind stark konserviert

Das ribosomale Protein L27A wird in *E. histolytica* von vier Intron-enhaltenden Genen kodiert. Im Gegensatz zu den flankierenden und intervenierenden Sequenzen sind die Protein-kodierenden Bereiche zu 96 % identisch (s. Abb. 3). Möglicherweise sind die Gene *ehrpl27a-1* bis -3 zu einem sehr frühen evolutionären Zeitpunkt durch Rekombinationsereignisse entstanden, die zu diesen Genduplikationen führten. Das *rpl27a-4*-Gen hingegen ist vermutlich aus einer erst später erfolgten Verdopplung des *rpl27a-2*-Gens hervorgegangen, da nicht nur der kodierende Bereich beider Gene, sondern auch die Region stromaufwärts der Start-Codons identisch ist. Während die *Mammalia*-Gene für ribosomale Proteine generell in Multigen-Familien vorkommen, und auch in *T. brucei* mehrere *rpl27a*-Gene vorhanden sind (SOEHNGE et al., 1997; BROWN und WILLIAMS, 1999), liegt das *rpl27a*-Gen in *Drosophila* sowie in dem Microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* als Einzelkopie vor (SOEHNGE et al., 1997; BIDERRE et al., 1998). In *E. histolytica* liegt eine Vielzahl weiterer Gene in mehr als einer Kopie im Genom vor, wie z. B. die *rpl21*- (PETTER et al., 1994), *lektin*- (RAMAKRISHNAN et al., 1996), *aktin*- (EDMANN et al., 1987) und *ariel*-Gene (MAI und SAMUELSON, 1998) sowie die Gene für Cystein-Proteinasen (BRUCHHAUS et al., 1996; 2003).

Die *ehrpl27a*-Introns grenzen direkt an das jeweilige Translations-initiations-ATG (s. Abb. 2 und 3). Eine Separation des ATG vom Haupt-Exon wurde auch für die *rpl27a*-Gene anderer Organismen (COLOMBO et al., 1991; COLOMBO und FRIED, 1992; MAEDA et al., 1993) sowie für das humane *rp26*-Gen (FILIPENKO et al., 1998) nachgewiesen. Die Position der *rpl27a*-Introns ist in den meisten der im Tierreich beschriebenen *rpl27a*-Gene konserviert und wurde auch für entfernt verwandte Organismen wie Microsporidien und Menschen beschrieben (BIDERRE et al., 1998; KUSUDA et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass diese Introns bestimmte Funktionen ausüben, z. B. bei der Genexpression. Der in dieser Arbeit erbrachte Befund, dass die Entfernung der Introns in den

verschiedenen *ehrpl27a*-Genen zu einer signifikanten Abnahme der Expression führt, unterstützt diese Annahme.

4.1.2 Die Expression der *rpl27a*-Gene wird durch die nicht-kodierenden 5'-Regionen reguliert

Mit Hilfe von Expressionsvektoren, welche die *ehrpl27a*-flankierenden Regionen enthalten, wurde ermittelt, dass diese Gene mit unterschiedlicher Stärke in *E. histolytica*-Trophozoiten exprimiert werden (s. Abb. 4). Ein Einfluss flankierender Regionen von verschiedenen Mitgliedern einer Genfamilie auf die Genexpression wurde bislang noch nicht beschrieben, da die Expression von Fremdgenen in *E. histolytica* meist unter der Kontrolle einzelner *aktin*-, *lektin-ferredoxin*- oder *rpl21*-flankierender Regionen erfolgte (NICKEL und TANNICH, 1994; PURDY et al., 1994; HAMANN et al., 1995; GILCHRIST et al., 1995; MOSHITCH-MOSHKOVITCH et al., 1998).

Trotz der starken Konservierung innerhalb der verschiedenen *rpl27a*-kodierenden Regionen ist nicht auszuschließen, dass jede Kopie die Information für ein Protein mit leicht veränderter Funktion trägt und die unterschiedlich starke Expression der Gene die zellulären Anforderungen reflektiert. Die Tatsache, dass die Gene *rpl27a-2* und *rpl27a-4* identische 5'-Bereiche aufweisen, und ein ähnliches Expressionsmuster vermittelten, impliziert, dass diese 5'-Region für die Regulation der Genexpression verantwortlich ist. Um dies zu verifizieren, wurde das jeweilige endogene *rpl27a-3'*-Ende durch eine *aktin-3'*-flankierende Region ausgetauscht. Daraus resultierte für jedes Konstrukt eine ähnlich starke Luciferase-Aktivität, und das unterschiedliche Expressionsmuster blieb erhalten (s. Abb. 5). Demnach reguliert das 3'-Ende weder die absolute Stärke der Expression, noch ist es für die relativen Expressionsunterschiede zwischen den Genen verantwortlich. NICKEL und TANNICH (1994) zeigten, dass der 3'-nicht-kodierenden Region generell eine entscheidende Rolle bei der Genexpression in *E. histolytica* zugeschrieben werden kann. Bei der Prozessierung primärer Transkriptionsprodukte kommt es bereits während der Transkription zum Anheften der 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende, Spleißen der Exons und zur Polyadenylierung des 3'-Endes (PROUDFOOT, 2000). Den 3'-untranslatierten Regionen (UTR) der Gene höherer Eukaryoten kommen bedeutende funktionelle Aufgaben zu. Sie spielen eine Rolle bei der Termination der Transkription, beeinflussen die Stabilität der mRNA-Moleküle und sind in der Lage, die Effizienz

der Translation zu variieren (JACKSON und STANDART, 1990; KRUYLS et al., 1987). Der poly(A)-Schwanz wird von einem poly(A)-bindenden Protein erkannt, das die mRNA vor Degradation schützt (BERNSTEIN und ROSS, 1989), wobei die Länge des poly(A)-Schwanzes eine entscheidende Rolle spielen kann (NUDEL et al., 1976). Da sich nach dem Austausch der *rpl27a*-flankierenden Regionen gegen die *aktin*-3'-Region nahezu gleich starke Luciferase-Aktivitäten ergaben, ist zu vermuten, dass diese der mRNA ähnliche Eigenschaften zuweisen. Vermutlich wird die Stärke der Transkription durch die verschiedenen 5'-Regionen reguliert.

In der Hefe erfolgt die Regulation der Expression von *rp*-Genen in Anpassung an variierende Umweltbedingungen hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene (MAGER und PLANTA, 1991). Höhere Eukaryoten hingegen regulieren die Expression der *rp*-Gene post-transkriptionell durch mRNA-Prozessierung und post-translationelle Modifikationen (AMALDI et al., 1989). Ein Beispiel für eine post-transkriptionelle Regulation in *E. histolytica* lieferten MOSHITCH-MOSHKOVITCH und Mitarbeiter (1998) anhand der beiden *rpl21*-Gene. Beide Kopien werden gleich stark transkribiert, jedoch weist die mRNA ein unterschiedliches Bindungsmuster an die Ribosomen auf (PETTER et al., 1994). In Kinetoplastiden wurde bislang noch kein Nachweis für eine Transkriptionskontrolle erbracht. In diesen Organismen wird die Expression zahlreicher Gene ausschließlich post-transkriptionell bzw. post-translationell reguliert (STILES et al., 1999).

4.1.3 Der Promotor des *ehrp127a-1*-Gens besitzt typische Merkmale eukaryotischer Promotoren

Zur Lokalisierung von Sequenzabschnitten, welche die Genexpression regulieren, wurden 9 unterschiedlich große Deletionsfragmente der *rpl27a-1*-5'-flankierenden Region stromaufwärts eines Luciferase-Gens platziert. Die graduierte Abnahme der Luciferase-Aktivität nach Deletion verschiedener Bereiche (s. Abb 6) lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass diese Region in ihrem grundsätzlichen Aufbau den Promotoren höherer Eukaryoten ähnelt.

Ein typischer eukaryotischer Promotor für die RNA-Polymerase II, welche die Transkription Protein-kodierender Gene höherer Eukaryoten katalysiert, wird in zwei Bereiche unterteilt. Die proximale Region ist für die Erkennung der Transkriptionsstartstelle verantwortlich, die von *cis*-aktiven Promotor-Grundelementen vermittelt wird. Weiter entfernt liegende Bereiche

hingegen modulieren die Transkriptionsrate. Zu den proximalen Promotor-Grundelementen zählen das TATA-Element (25-30 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts lokalisiert), das Initiator-Element (umgibt den Transkriptionsstart) sowie die 40-100 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts lokalisierte CCAAT-Box (MCKNIGHT und KINGSBURY, 1982; STRUHL, 1987; SMALE et al., 1989). Zu den distalen Promotorelementen gehören sog. GC-Boxen, die bis zu einigen hundert Bp oberhalb des Transkriptionsstarts lokalisiert sowie *Enhancer*-Elemente, die mehrere tausend Bp von der Transkriptionsstartstelle entfernt sind (MCKNIGHT und KINGSBURY, 1982; LODISH et al., 1996). Die proximale Promotorregion bildet eine Zielscheibe für regulative Proteine, welche die RNA-Polymerase II an den Transkriptionsstartpunkt dirigieren. Bei der Ausbildung dieses Prä-Initiationskomplexes hat der Transkriptionsfaktor IID die größte Bedeutung (ROEDER, 1991; NIKOLOV und BURLEY, 1997).

Zum grundsätzlichen Verständnis des Promotoraufbaus in *E. histolytica* trugen im Wesentlichen nur zwei ausgedehnte Studien bei, die an der 5'-flankierenden Region der 170-kD-Lektin-Gene *hgl2* und *hgl5* durchgeführt wurden. Daraus ging hervor, dass sich die amöbenspezifischen, *cis*-aktiven Promotor-Grundelemente wie die CCAAT-, TATA-, und GAAC-Motive stark von denen anderer Eukaryoten unterscheiden (BUSS et al., 1995; PURDY et al., 1996). Zusätzlich vollzieht sich die monocistronisch verlaufende Transkription in vielen Genen an einem ungewöhnlichen ATTCA-Motiv (BRUCHHAUS et al., 1993), das von PURDY und Mitarbeitern (1996) als Initiator-Element betrachtet wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Amöben-Promotoren in Säugersystemen nicht aktiv sind und dieses umgekehrt auch für die SV40- und CMV-Promotoren in *E. histolytica* gilt (PURDY et al., 1994).

Die Abnahme der Luciferase-Aktivität nach Deletion der *ehrp127a-1*-5'-Regionen von -497 Bp bis -380 Bp, -143 Bp bis -105 Bp bzw. -105 Bp bis -55 Bp resultierte in Werten um 50 %, 25 % bzw. 5 % (s. Abb. 6). Dies ist vermutlich auf *cis*-aktive Elemente zurückzuführen, die in den deletierten Regionen enthalten sind. Die proximale Promotorregion ist auf die -33 Bp-Region eingrenzbar, die eine Basisaktivität von ca. 5 % lieferte. Nahezu identische Werte ergaben sich nach sukzessiver Deletion der intergenischen Region von *hgl2*, die das nachgeschaltete Gen einer bakteriellen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase kontrollierte. Innerhalb der deletierten Abschnitte wurden amöbenspezifische Sequenzelemente identifiziert (BUSS et al., 1995).

Die Deletion von 5'-nicht-kodierenden Bereichen ist eine oft verwendete Methode zur Eingrenzung von Promotorregionen und Identifizierung von Sequenzmotiven, die an einer Transkriptionsregulation beteiligt sind. Sie wurde z.B. auch bei *Dictyostelium* und *Acanthamoeba catellanii* eingesetzt (EARLY und WILLIAMS, 1989; WONG et al., 1992). Der Promotoraufbau ist auch bei anderen Protozoen bislang weniger gut charakterisiert als in höheren Eukaryoten, dennoch lassen sich einige übereinstimmende Motive erkennen. So wurden in der Promotorregion von *Dictyostelium* GC-reiche und TATA-Motive identifiziert (EARLY und WILLIAMS, 1989; SUCIC et al., 1993), und in *Tetrahymena*-Promotoren wurde eine CCAAT-Box beschrieben (BRUNK und SADLER, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass in *Trichomonas vaginalis* die Transkription von einem Initiator-Element vermittelt wird (QUON et al., 1994) und in *Acanthamöba catellanii* (WONG et al., 1992) sowie in *Plasmodium* wurden eukaryotische TATA- bzw. CCAAT-Boxen und Motive, die Homologien zur SV40-*Enhancer*-Sequenz aufweisen, identifiziert (RUIZ I ALTABA et al., 1987).

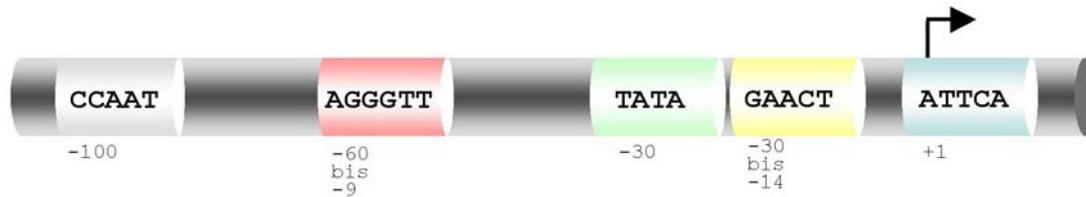
In der hier durchgeführten Studie bestand das längste *ehrpl27a-1-5'*-Fragment aus den 497 Bp oberhalb des Transkriptionsstarts und die resultierende Luciferase-Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt (s. Abb. 6). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich stromaufwärts weitere, die Transkription regulierende *Enhancer*-Elemente befinden. Der *ehrpl27a-1*-Transkriptionsstart ist lediglich 155 Bp vom 3'-Ende des nächstgelegenen offenen Leserahmens entfernt (s. Abb. 2). Die distale Promotorregion des *rpl27a-1*-Gens befindet sich demnach in der Protein-kodierenden Region eines anderen Gens. Die intergenischen Regionen von *E. histolytica* sind mit einer Länge zwischen 66 und 2000 Bp (PETTER et al., 1992; BRUCHHAUS et al., 1993; WILLHOEFT et al. 1999 a; 2001) im Vergleich zu höheren Eukaryoten relativ kurz. Wie den Sequenzen der *E. histolytica*-Datenbank (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>) zu entnehmen ist, beträgt die Länge einer durchschnittlichen intergenischen Region ca. 500 Bp. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass die Promotoren in Teile der kodierenden Region stromaufwärts gelegener Gene hineinreichen. GANGOPADHYAY und Mitarbeiter (1997) zeigten sogar, dass Stop- und Startcodon der *E. histolytica*-Gene *ehmcm3* und *ehpak* lediglich durch 37 Bp intergenische Region getrennt sind, wobei die mRNA-Transkripte überlappen und somit der gesamte Bereich transkriptionell aktiv ist. Obwohl alle bisher untersuchten Gene in *E. histolytica*

monocistronisch transkribiert werden, bleibt abzuwarten, ob nicht wenigstens eine kleine Zahl von eng gekoppelt angeordneten Genen polycistronisch transkribiert wird. Auch in Leishmanien (LANDFEAR et al., 1983), Plasmodien (LANZER et al., 1992 a) und Trypanosomen (WONG et al., 1993) wurde eine enge Nachbarschaft kodierender Sequenzen beobachtet.

4.1.4 Das AGGGTT-Motiv ist ein Promotor-Element ribosomaler *E. histolytica*-Gene

In den nicht-kodierenden 5'-Regionen zahlreicher ribosomaler *E. histolytica*-Gene wurde ein neues AGGGTT-Promotorelement identifiziert. Das Element liegt auch in invertierter Orientierung vor (ACCCTT) und ist zwischen 9 und 60 Bp oberhalb des Startcodons ATG lokalisiert (s. Abb. 7). Es zeigte sich, dass dieses poly-Purin-Motiv nicht in der 5'-Region anderer Haushalts-Gene (z. B. für metabolische Enzyme, Aktin oder Lektin) von *E. histolytica* enthalten ist. Die bislang identifizierten amöbenspezifischen Promotorelemente (s. 4.1.3) finden sich in vielen, jedoch längst nicht in allen untersuchten Genen. Darüber hinaus sind diese Motive keinem speziellen Gentypp zuzuordnen, sondern kommen in den unterschiedlichsten Genen vor. Es wurde somit in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein Promotorelement identifiziert, das offenbar ausschließlich in *rp*-Genen gefunden wird und für die Regulation von wesentlicher Bedeutung ist. Mit einer Abnahme der Expression von 77 % nach Mutagenese dieser Sequenz (s. Abb. 8) weist das AGGGTT-Element eine ähnlich starke Wirkung auf wie die TATA- oder GAACT-Elemente des *lektin*-Promotors, die für 80 % bzw. 75 % der Promotoraktivität verantwortlich sind (BUSS et al., 1995; PURDY et al., 1996). Ein gegensätzlich orientiertes Promotorelement wurde auch im *rpl1*- und *rpl21*-Gen der Pflanze *Spinacia oleracea* beobachtet (LAGRANGE et al., 1993), wobei es im *rpl1*-Promotor an einer negativen Transkriptionsregulation beteiligt ist (ZHOU et al., 1992).

Unter Berücksichtigung des AGGGTT-Motivs sind alle bislang identifizierten Amöben-Promotorelemente in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



MOTIV	ENTFERNUNG VOM TRANSKRIPTIONSSTART (BP)	PUTATIVE FUNKTION
TCCAATAA	100	CCAAT-Box (BUSS et al., 1995)
AGGGTT	9 bis 60	Positiv-regulierendes Element , nur in rp-Genen vorhanden (diese Arbeit)
TATTTAAA	30	TATA-Box (BRUCHHAUS et al., 1993)
GAACT	30 bis 14	Positiv-regulierendes Element (PURDY et al., 1996; SINGH et al., 2002)
ATTCA	0	Initiator-Element (BRUCHHAUS et al., 1993; PURDY et al., 1996)

Abb. 19: Darstellung *cis*-aktiver Promotorelemente in *E. histolytica*-Genen.

Die Abbildung fasst alle bislang beschriebenen Sequenzmotive aus den Promotorregionen unterschiedlicher *E. histolytica*-Gene zusammen. Zahlen unterhalb der Motive markieren die Position relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die von den Autoren postulierten Funktionen dieser Motive sind in der Tabelle erwähnt.

Interessanterweise findet die Initiation der Transkription des *ehrp121-1*-Gens an dem AGGGTT-Motiv statt (PETER et al., 1994), das an Position -14 lokalisiert ist (s. Abb. 7). Die Transkription der *ehrp127a*-Gene hingegen beginnt nicht an diesem Element, sondern weiter stromabwärts, an Position -11 (das Ergebnis ist nicht dargestellt). Möglicherweise dirigiert dieses Element in einigen ribosomalen Genen die RNA-Polymerase II an die Region der Transkriptionsstartstelle und ist in weiteren Genen auf andere Art am Transkriptionsvorgang beteiligt. Eine derartige Rollenverteilung desselben

Promotorgrundelements wurde auch für das *E. histolytica*-GAACT-Element beschrieben (SINGH et al., 2002). Während es im *hgl5*-Gen die Transkription kontrolliert, nimmt das GAACT-Element im Ferredoxin-Gen eine sekundäre Rolle ein, denn die Transkription wird hier hauptsächlich von einem ATTCA-Element kontrolliert. Derart unterschiedliche Funktionen eines Promotorelements weisen auf einen bereits relativ komplexen Transkriptions-Kontrollmechanismus hin.

Die Synthese von Proteinen an den Ribosomen stellt für alle Zellen eine fundamentale Aufgabe dar. Die Biosynthese eukaryotischer Ribosomen erfordert die Akkumulation von vier rRNAs und über 80 verschiedenen ribosomalen Proteinen. Angesichts ihrer Bedeutung muss die Rate der Ribosomen-Formation im Verlauf verschiedener Entwicklungsstadien und während variierender äußerer Einflüsse ständig angepasst werden (MAGER, 1988). Es ist demnach nicht verwunderlich, dass die *rp*-Gene über komplexe Kontrollmechanismen reguliert werden. So wurden spezielle, die Transkription regulierende Promotorelemente in *rp*-Genen von *S. cerevisiae* beschrieben (SCHWINDINGER et al., 1987). Möglicherweise gewährleistet auch das ungewöhnliche AGGGTT-Promotorelement ribosomaler *E. histolytica*-Gene die Bereitstellung der Ribosomen-Komponenten. Darüber hinaus wurde in *S. cerevisiae* und *Xenopus laevis* eine andere Art der Regulation von *rp*-Genen beschrieben. Hier hemmt ein ribosomales Protein die Menge seines eigenen Intron-haltigen primären Transkriptes, indem es an dieses Intron bindet und dadurch das Spleißen verhindert (BOZZONI et al., 1984; DABEVA et al., 1986). In Anbetracht der im Tierreich konservierten Position der *ehrp127a*-Introns wäre ein solcher Rückkopplungsmechanismus bei der Regulation dieser Gene durchaus denkbar.

Da die Funktion von Promotorelementen durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, liegt die Vermutung nahe, dass *E. histolytica* Proteine besitzt, welche spezifisch an das AGGGTT-Element binden können. Weiterführende Studien mit Hilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* könnten zur Identifizierung derartiger Proteine beitragen. Im Einklang mit der Aussage, dass die Bindung des TFIID essentiell für die Transkription der meisten TATA-losen eukaryotischen Gene ist (PUGH und TJIAN, 1991), wurde in *E. histolytica* ein TATA-bindendes Protein (TBP) identifiziert, dessen funktionelle

Domäne 55 % Identität zur *Homo sapiens*-, 54 % zur *A. castellani*- und 37 % zur *P. falciparum*-Sequenz aufweist (LUNA-ARIAS et al., 1999). Eine DNA-bindende Eigenschaft wurde allerdings für dieses Protein bislang nicht nachgewiesen. Daneben wurden in *E. histolytica* 3 weitere Proteine identifiziert, die mit einer Transkriptionskontrolle in Verbindung gebracht werden (GILCHRIST et al., 2001; SCHAENMAN et al., 2001).

Es bleibt festzuhalten, dass Gen-Promotoren von *E. histolytica* spezifische Sequenz-Motive enthalten, die bisher nicht in anderen eukaryotischen Organismen gefunden wurden. Dennoch scheinen die Prinzipien der Genregulation mit denen anderer Eukaryoten vergleichbar zu sein.

4.2 Charakterisierung der *E. histolytica*-Introns

4.2.1 Das Spleißen verstärkt die Expression der *ehrp127a*-Gene

Um den Effekt von Introns auf die Genexpression zu untersuchen, wurden neben Intron-haltigen Expressionsvektoren Intron-lose Derivate generiert, deren Luciferase-Aktivitäten nach Transfektion miteinander verglichen wurden. Nach Deletion der Introns war die Expression signifikant herabgesetzt (s. Abb.9).

Es ist schon seit längerem bekannt, dass eine fehlende Genexpression Intron-loser Vektoren durch das Hinzufügen intervenierender Sequenzen aufgehoben werden kann (GRUSS et al., 1979; HAMER und LEDER, 1979). Weitere Untersuchungen an *Mammalia*-Zellen (BUCHMAN und BERG 1988), transgenen Mäusen (BRINSTER et al., 1988), Pflanzen (CALLIS et al., 1987) und *Drosophila* (DUNKER et al., 1997) bestätigten eine Intron-abhängige erhöhte Genexpression. Derartige stimulierende Effekte von Introns werden als das Ergebnis einer verbesserten prä-mRNA-Stabilisierung und eines effizienteren Exports derselben aus dem Nukleus ins Cytoplasma angesehen (RYU und MERTZ, 1989; LEGRAIN und ROSBASH, 1989). Darüber hinaus sind Introns auch auf andere Weise an der Genregulation beteiligt. So enthalten einige Introns stimulierende Bereiche für die Transkription (BANERJI et al., 1983; CHUNG und PERRY, 1989), oder aber Elemente, die an der Stilllegung (*Silencing*) von Genen beteiligt sind (SIU et al., 1994, RIPPE et al., 1989). Das Vorkommen *cis*-aktiver Sequenzen in den *ehrp127a*-Introns ist zwar nicht auszuschließen, allerdings hätten diese in der

durchgeführten *Linker-Scanning*-Mutagenese des *ehrp127a-1*-Introns (s. 3.2.3.1) durch eine Inhibition der Luciferase-Aktivität identifiziert werden müssen. An einer jeweiligen Inhibition waren jedoch nur Sequenzmotive beteiligt, die direkt den Spleiß-Prozess kontrollieren. Demnach ist es eher unwahrscheinlich, dass derartige, die Transkription verstärkende Elemente in dem Intron enthalten sind. Dies ist jedoch nicht grundsätzlich auszuschließen, da nur 55 des 70 Bp umfassenden *rpl27a-1*-Introns mutiert wurden und die Introns 2 und 3 eine andere Nukleotidsequenz enthalten, die keiner Mutationsanalyse unterzogen wurden.

Mit Hilfe von Northern Blot- oder quantitativen RNA-Analysen ist es möglich, die Einflüsse von Introns genauer zu untersuchen. Wäre die Menge reifer Luciferase-mRNA nach Transfektion der Intron-Deletionskonstrukte tatsächlich geringer, würden die *ehrp127a*-Introns auf ungeklärte Weise zu einer vermehrten Bildung der Transkripte beitragen. Sofern allerdings kein quantitativer Unterschied zwischen Intron-haltigen gegenüber Intron-losen mRNA-Spezies vorhanden wäre, könnte die erhöhte Proteinmenge auf eine posttranskriptionelle Regulation zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass der prä-mRNA-Spleißosom-Komplex das Transkript vor endogenen Nukleasen schützt. Auch BOURDON und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass eine erhöhte Luciferase-Aktivität Intron-haltiger Konstrukte nicht mit einer verstärkten Produktion von Luciferase-mRNA-korrelierte. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von anderen Arbeitsgruppen erzielt (EVANS und SCARPULLA, 1989; MATSUMOTO et al., 1998). Es wird vermutet, dass durch die Bindung von RNP an die Exon-Intron-Grenzen des primären Transkriptes die Translationsmaschinerie in der Lage ist, die mRNA effizienter zu rekrutieren (BOURDON et al., 2001).

Der stimulierende Effekt Intron-haltiger Expressionsvektoren hängt in einigen Fällen von der Stärke des verwendeten Promotors ab (NEUBERGER und WILLIAMS, 1988). So kann und dasselbe Intron in Anwesenheit verschiedener Promotoren eine 3- bis 36-fache Stimulation induzieren (ZIELER und HUYNH, 2002). Da der *ehrp127a-1*-Promotor die stärkste Aktivität aufwies (s. 3.1.3.1), müsste er demnach den größten, die *ehrp127a-2*- und *ehrp127a-4*-Introns den schwächsten stimulierenden Effekt ausüben. Es zeigte sich jedoch, dass das Intron des *rpl27a-3*-Gens einen signifikant stärkeren Einfluss hat als das

rpl27a-1-Intron ($P < 0,02$), wodurch in diesem Fall keine Korrelation mit der Stärke des Promotors vorzuliegen scheint. Interessanterweise ist die Expressionsstärke in der durchgeführten Deletionsstudie umso höher, je geringer die Länge des untersuchten *rpl27a*-Introns ist. Den größten stimulierenden Effekt weist das 50-Bp-Intron des *rpl27a-3*-Gens mit einer Verdopplung der Aktivität auf, gefolgt vom 70 Bp umfassenden *rpl27a-1*-Intron und den 114 Bp-Introns *rpl27a-2* bzw. *rpl27a-4*, wobei die beiden zuletzt genannten Introns die Expression um nur ca. ein Drittel erhöhten. Es wäre denkbar, dass die Formation des Spleißosoms in *E. histolytica* bei geringerer Intron-Länge begünstigt wird, oder dass dieser Komplex zu einer verbesserten Stabilität beiträgt und ein schnelleres Prozessieren des primären Transkripts ermöglicht.

4.2.2 Die Introns von *E. histolytica* enthalten stark konservierte Konsensussequenzen

Durch vergleichende Intron-Analysen und *Linker-Scanning*-Mutagenese des *ehrp127a-1*-Introns wurden im Rahmen dieser Arbeit Konsensussequenzen in *E. histolytica*-Introns festgelegt (s. Abb. 13). Diese ermöglichten die Identifizierung weiterer Introns im Verlauf der Sequenzanalyse des *E. histolytica*-Genoms (s. Abb. 14). Die Introns umfassen durchschnittlich 65 Bp, weisen einen A/T-Gehalt von 82 % auf und enthalten die Konsensusmotive GTTTGTT bzw. TAG an den 5'-und 3'-Spleißstellen sowie die putative *Branch Point*-Region WYTWAY (W=A oder T; Y= C oder T).

Generell folgen eukaryotische Introns in ihrem Aufbau der „GT-AG-Regel“, nach welcher alle Introns mit einem GT-Dinukleotid beginnen und mit einer AG-Sequenz enden (BREATHNACH et al., 1978; GALLWITZ und SURES, 1980; NG und ABELSON, 1980; MOUNT, 1982). Dieser Konsensus wurde für höhere Eukaryoten zu GTPuAGT und YAG (MOUNT, 1982; SENAPATHY et al., 1990) bzw. GTATGT und TAG in Hefe-Introns erweitert (PADGETT et al., 1986; SENAPATHY et al., 1990). Die Konsensussequenzen aus weiteren Introns sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

ORGANISMUS	5'-SPLEIßSTELLE	3'-SPLEIßSTELLE
Entamoeba (diese Arbeit)	G ₁₀₀ T ₁₀₀ T ₁₀₀ T ₉₈ G ₉₈ T ₉₂ T ₅₈	T ₉₂ A ₁₀₀ G ₁₀₀
Acanthamoeba (WONG et al., 1992)	G ₄₄ T ₄₄ A ₃₉ C ₃₆ G ₃₃ Y ₁₉	C ₃₂ A ₄₄ G ₄₄
Dictyostelium (RIVERO, 2002)	G ₁₀₀ T ₁₀₀ A ₉₁ A ₆₉ G ₆₆ T ₈₄	T ₆₅ A ₁₀₀ G ₁₀₀
Tetrahymena (CSANK et al., 1990)	G ₁₀₀ T ₁₀₀ A ₉₃ A ₇₄ T ₅₆ A ₅₆ A ₅₉ T ₄₈ T ₇₈	T ₇₀ A ₁₀₀ G ₁₀₀
S.cerevisiae (CSANK et al., 1990)	G ₁₀₀ T ₁₀₀ A ₉₇ T ₈₉ G ₁₀₀ T ₉₄	Y ₁₀₀ A ₁₀₀ G ₁₀₀
Vertebrata (PADGETT et al., 1986)	G ₁₀₀ T ₁₀₀ Pu ₆₀ A ₇₄ G ₈₄ T ₅₀	C ₇₈ A ₁₀₀ G ₁₀₀

Tab. 1: Vergleich von Intron-Grenzen verschiedener Eukaryoten.

Dargestellt sind 5'- und 3'-Konsensussequenzen aus den Introns verschiedener Eukaryoten. Zahlenangaben innerhalb der Motive repräsentieren die Häufigkeit einzelner Nukleotide an entsprechender Position. Y= Pyrimidin; Pu= Purin.

Die Position der Nukleotide innerhalb der 5'-Konsensussequenzen ist in Hefen und Amöben stark konserviert, wobei sich die Konservierung in anderen Organismen auf die ersten 2-3 Nukleotide beschränkt. Die 5'-Konsensussequenzen bestehen zudem in *E. histolytica* aus heptameren-, in *Tetrahymena* aus nonameren- und in den meisten anderen Organismen aus pentameren Motiven. Ein gemeinsames Charakteristikum aller 5'-Spleißstellen ist ein Guanosin-Rest an Position 5. Ein besonderes Merkmal stellt der in *E. histolytica*-Introns zu 100 % vertretene Thyminid-Rest an Position 3 der 5'-Spleißstelle dar, in anderen Organismen findet sich an dieser Position ein Adenosin-Rest. Die 3'-Spleißstelle ist mit einem Trinukleotid in allen Organismen stark konserviert, in *E. histolytica* besteht es hauptsächlich aus der Sequenz TAG.

Die YNYYPuAY-Branch Point-Region der Vertebraten-Introns befindet sich an Position -30 bis -50 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle (PADGETT et. al., 1986; KNIPPERS, 2001). In *S. cerevisiae*-Introns weist die Sequenz der Verzweigungsstelle TACTAAC eine wesentlich geringere Varianz auf und ist 20 bis 55 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle gelegen (LANGFORD und GALLWITZ, 1983; 1984). Die Verzweigungsstelle weist in den *E. Histolytica*-Genen nur 6 Bp auf, in *Dictyostelium*, *S. cerevisiae* und Vertebraten besteht sie aus 7 Nukleotiden. Das

Charakteristikum der *Branch Point*-Regionen aller bekannten Introns ist ein invariantes Adenosin-Nukleotid, das essentiell für die Ausbildung der Lasso-Struktur ist (s. Abb. 1.1). Wie die Tabelle 2 zeigt, sind die *Branch Point*-Motive der *Dictyostelium*- und Hefe-Introns identisch. Vergleicht man diese mit dem putativen Amöben *Branch Point*-Motiv WYTWAY, so zeigt sich, dass letzteres um 1 Nukleotid verkürzt ist. Die invarianten Nukleotide T und A, die in den *E. histolytica*-Introns vorkommen, sind auch in dem TACTAAY-Motiv der Hefe- bzw. *Dictyostelium*-Introns enthalten. Auch das einzige bislang in *Giardia lamblia* identifizierte Intron (NIXON et al., 2002) enthält (neben der 5' Konsensussequenz CTATGT und der 3'-Konsensussequenz CAG) ein WYTWAY-Motiv, das aus der Sequenz ACTAAC besteht.

ORGANISMUS	BRANCH POINT-REGION	DISTANZ ZUR 3'-SPLEIBSTELLE
<i>Entamoeba</i> (diese Arbeit)	WYTWAY	7-11 Bp
<i>Dictyostelium</i> (RIVERO, 2002)	TACTAAY	20-60 Bp
<i>S.cerevisiae</i> (LANGFORD und GALLWITZ, 1983)	TACTAAC	30-50 Bp ₀
<i>Vertebrata</i> (PADGETT et al., 1986)	YNYYPuAY	20-55 Bp ₀

Tab. 2: Vergleich von *Branch Point*-Regionen verschiedener Eukaryoten.

Dargestellt sind *Branch Point*-Sequenzen und ihre jeweiligen Position relativ zur 3'-Spleißstelle innerhalb verschiedener Eukaryoten-Introns. N= beliebiges Nukleotid; Y= Pyrimidin; Pu= Purin.

Diese Vergleiche zeigen, dass das *Branch Point*-Motiv, aber auch die 5'- und 3'-Konsensussequenzen von *cis*-spleißenden, einzelligen Organismen relativ konserviert sind, sich aber deutlich von denen höherer Eukaryoten unterscheiden.

4.2.3 Die Funktion des WYTWAY-Motivs ist an eine definierte Position relativ zur 5'-Spleißstelle gebunden

Die Position des putativen WYTWAY-Motivs der *E. histolytica*-Introns, nämlich durchschnittlich an Position -9 oberhalb des TAG, ist für seine Funktion von großer Bedeutung (s. Abb. 17).

In anderen Organismen erlaubt die Position des *Branch Point*-Motivs einen wesentlich größeren Spielraum (s. 4.2.2, Tab. 2). Die konservierte Position könnte im Zusammenhang mit der geringen durchschnittlichen Länge der *E. histolytica*-Introns (65 Bp) stehen. So wäre denkbar, dass bei der Formation des Spleißosoms durch die Assoziation der snRNP-Partikel auf dem primären Amöben-Transkript ein definierter Abstand der *Branch Point*-Region zur 3'-Spleißstelle erforderlich sein muss, um das Interagieren der Spleißfaktoren räumlich zu ermöglichen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass auch das *Giardia*-Intron nur eine Länge von 35 Bp aufweist (NIXON et al., 2002) und sich die putative *Branch Point*-Region mit Position -7 nah am 3'-Ende befindet. So könnte die genaue Erkennung der *Branch Point*-Region durch ihre stark konservierte Position gewährleistet sein, die ihrerseits eine Adaption an eine gewisse Intronlänge ist. Die etwas größeren *Dictyostelium*-Introns (durchschnittlich 112 Bp) weisen bereits eine sehr schwache positionelle Konservierung der *Branch Point*-Region auf (Position -20 bis -60) und auch bei den bis zu 10.000 Bp umfassenden Vertebraten-Introns wäre die postulierte sterische Komponente zu vernachlässigen. In diesen Introns könnte eine genaue und effektivere Spleißreaktion durch weitere Sequenzinformationen gewährleistet werden, wie z. B. die Folge von Pyrimidinen, die sich in allen Vertebraten-Introns zwischen der *Branch Point*-Region und der 3'-Spleißstelle findet. Es zeigte sich nämlich, dass Primär-Transkripte wesentlich effektiver gespleißt werden, wenn eine Folge von 11 Pyrimidinen, insbesondere Uridine, zwischen der *Branch Point*-Region und der 3'-Spleißstelle lokalisiert ist (COOLIDGE et al., 1997). Eine derartige Sequenz fehlt den *E. histolytica*-Introns, ist jedoch in den Introns der *Dictyostelium*-Gene vorhanden (RIVERO, 2002). Dass darüber hinaus eine Pyrimidin-Sequenz für den Spleißvorgang notwendig ist, wurde am Spleißen eines besonders kleinen *Drosophila*-Introns (59 Bp) nachgewiesen (KENNEDY und BERGET, 1997). Es ist also denkbar, dass eine Pyrimidin-Sequenz die schwache positionelle Konservierung der *Branch Point*-Region ausgleicht, bzw. deren besseren Erkennung ermöglicht.

Angesichts dieser Hypothese muss jedoch bedacht werden, dass die durchschnittlich 500 Bp umfassenden Hefe-Introns keine Pyrimidin-reiche Sequenz enthalten, die Introns weisen dennoch eine variable Position der *Branch Point*-Regionen auf (-30 bis -50). Viele dieser Introns enthalten bis zu 13 Thymidin-Reste (CSANK et al., 1990) und eine Erhöhung der Thymidin-Anzahl verstärkt die Nutzbarkeit der 3'-Spleißstelle (PATTERSON und GUTHRIE, 1991). Wie oben bereits erwähnt, weisen die Hefe-Introns wesentlich striktere Konsensus-Motive auf als die der Vertebraten. Vermutlich kann der Spleißapparat in diesen Organismen relativ genauen Sequenzanforderungen folgen, da ein Großteil der Hefe-Gene, wenn überhaupt, meist nur ein Intron enthalten, das zudem noch am 5'-Ende des Gens liegt (FINK, 1987). Die Hefe-Introns würden demnach eine Art Sonderstellung einnehmen, in der die Pyrimidin-Folge aufgrund stringenter Konsensussequenzen vernachlässigt werden kann. Dies allerdings ging vermutlich zulasten der Rekombinationsfähigkeit, denn die Flexibilität der Konsensus-Sequenzen höherer Eukaryoten bietet wahrscheinlich größere Variationen bei dem Zusammenfügen kodierender Regionen (KNIPPERS, 2001).

4.2.4 Die konservierten Motive in *E. histolytica*-Introns haben funktionellen Einfluss auf das Spleißen

Durch Mutationen der 5'- und 3'-Konsensussequenzen und der putativen *Branch Point*-Region wurde gezeigt, dass diese Elemente für das Spleißen erforderlich sind (s. Abb. 11 und 15).

Der Einfluss konservierter Nukleotide auf das Spleißen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen durch Mutationsstudien nachgewiesen. In Hefe-Introns wurde die Spleißreaktion durch die Mutation des GT-Dinukleotids zu AT und CT sowie GA und GG sehr stark gehemmt (VIJAYRAGHAVAN et al., 1986; RUIS et al., 1994). Neben dem universellen GT-Nukleotid ist der Guanodin-Rest an Position 5 des Hefe-GTATGT-Motivs, der in allen bislang untersuchten 5'-Spleißstellen zu finden ist, nachweislich in den Spleißvorgang involviert (PARKER und GUTHRIE, 1985; VIJAYRAGHAVAN et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit hat sich nach Transfektion des Konstrukts pST1M₃₋₅ ebenfalls gezeigt, dass das Vorhandensein der ersten beiden GT-Nukleotide in *E. histolytica*-Introns nicht ausreicht, sondern dass ein korrektes Spleißen auch die Präsenz der Nukleotide an Position 3-5 der 5'-Konsensussequenz GTTTGTT erfordert (s. Abb. 11). Aufgrund der genannten konservierten Position in allen Introns und der daraus abgeleiteten Relevanz ist

zu vermuten, dass der Guanosin-Rest an Position 5 für den Spleißvorgang in *E. histolytica* von Bedeutung ist.

Die Nutzbarkeit der 5'-Spleißstelle hängt teilweise von einer Interaktion mit der U1-snRNA ab (SILICIANO und GUTHRIE, 1988; SERAPHIN und ROSHBASH, 1990), wobei die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch diese snRNA ein initialer Schritt ist. Das konservierte Motiv der U1-snRNA 5'-UAACUUACCU-3' bindet mit 5 Nukleotiden (zwischen Position 3 bis 8) an die Hefe-5'-Konsensussequenz GUAUGU. Hingegen ist die 5'-Konsensussequenz GUUUGUU der Entamoeben-Introns dazu in nur 3 Positionen komplementär. Da die U1-snRNA-Sequenz aus *E. histolytica* nicht bekannt ist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die endogene U1-snRNA eine häufigere Basenpaarung mit dem entsprechenden GUUUGUU-Motiv eingehen würde. Es wird vermutet, dass die U1-snRNA im frühen Verlauf der Reaktion abgelöst und die räumliche Nachbarschaft zwischen der 5'-Spleißstelle und der *Branch Point*-Region anschließend von der U6-snRNA vermittelt wird (KANDELS-LEWIS und SERAPHIN 1993; LESSER und GUTHRIE, 1993). Die U6-snRNA ist sowohl in Länge als auch Sequenz die am stärksten konservierte nukleare RNA und weist 77 % Identität zwischen *S. cerevisiae* und *Homo sapiens* auf (BROW und GUTHRIE, 1988). Sie wurde auch in *E. histolytica* identifiziert (MIRANDA et al., 1996). Es zeigt sich, dass die Nukleotide 1, 2, 3 und 5 aus diesem ACAGAG-Motiv eine Komplementarität zu den Positionen 6, 5, 4 und 2 der GUAUGU Hefe-5'-Konsensussequenz aufweisen. Eine Bindung derselben U6-snRNA-Nukleotide wäre ebenfalls mit den Positionen 6, 5, 4 und 2 der Entamoeben-5'-Konsensussequenz GUUUGUU möglich. Die im Vergleich zu Hefe-Introns veränderte 5'-Konsensussequenz der Amöben-Introns bindet demnach zwar mit weniger Nukleotiden an den Spleißfaktor U1-snRNA, der einen ersten Kontakt zum Intron herstellt. Jedoch ist die wesentlich wichtigere Bindung des GUUUGUU-Motivs an die generell stark konservierten Nukleotide der U6-snRNA in gleichem Maße wie in der Hefe gewährleistet. Damit würde die hauptsächliche Funktion der stark konservierten GUUUGUU-Sequenz der Amöben-Introns mit der Funktion der leicht veränderten Form des Hefe-GUAUGU-Motivs übereinstimmen, nämlich die Bindung von Spleißfaktoren zur Annäherung der 5'-Spleißstelle an die Verzweigungsstelle.

Die Mutation der *E. histolytica*-3'-Spleißstelle von TAG zu GAT resultierte in einer totalen Inhibition des Spleißvorgangs (s. Abb. 12), während der Prozess nach Mutation des Motivs zu GAG nur partiell inhibiert wurde. Dieses Ergebnis impliziert, dass das letzte Nukleotid des Konsensusmotivs im Gegensatz zum ersten eine wichtigere Funktion für den Spleißvorgang in *E. histolytica* hat. Auch die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigen eine starke Beteiligung des letzten Guanosin-Restes an der Expression eines β -Galactosidase-Reporters (RUIS et al., 1994), wobei im Gegensatz zu *E. histolytica* außerdem eine Involvierung des Adenosin-Restes nachgewiesen wurde (VIJAYRAGHAVAN et al., 1986). Bei den beschriebenen Untersuchungen des Hefe-Konsensus YAG wurde eine mögliche Beteiligung des ersten Nukleotids nicht untersucht. Neben den Amöben-Introns, die zu 92 % einen Thymidin-Rest an Position 1 des Motivs enthalten, findet sich auch in Hefe-Introns zu 100 % eines der beiden Pyrimidine (s. 4.2.2, Tab. 1). Es bleibt zu vermuten, dass auch in der Hefe das gesamte YAG-Motiv der 3'-Spleißstelle für einen korrekten Spleißvorgang benötigt wird. Insgesamt ist die 3'-gelegene Introngrenze aller bekannten Organismen aus T/CAG aufgebaut, womit dieser Teil des Introns zwischen den verschiedenen Eukaryoten wesentlich stärker konserviert ist als die 5'-gelegene Introngrenze.

Die Tatsache, dass Sequenzhomologe zu den *Branch Point*-Motiven eukaryotischer Introns in den intervenierenden Sequenzen von *E. histolytica* funktionslos sind (s. Abb. 11), veranlasste die Suche nach einer amöben-spezifischen *Branch Point*-Region im *ehrpl27a-1*-Intron, die in der Identifizierung der für *E. histolytica*-Introns speziellen WYTWAY-Sequenz resultierte. In *S. cerevisiae* eingefügte fremde intervenierende Sequenzen mit den an den Intron-Grenzen lokalisierten, universellen GT-AG-Nukleotiden können nicht gespleißt werden (LANGFORD et al., 1983). Dies ist möglicherweise auf die im Gegensatz zu den Vertebraten sehr stringenten Hefe-Konsensussequenzen zurückzuführen. Da das WYTWAY-Motiv aus *E. histolytica* nahezu identisch ist mit dem Hefe *Branch Point*-Motiv ist anzunehmen, dass auch die Amöben-Sequenz von dem Spleißapparat der Hefen erkannt wird. Demnach würde wahrscheinlich eine in ein Hefe-Gen inserierte intervenierende *E. histolytica*-Sequenz korrekt herausgeschnitten werden.

4.2.5 Das invariante Adenosin in der WYTWAY-Region von *E. histolytica*-Introns kennzeichnet diese Sequenz als *Branch Point*-Region

Durch neutrale Adenosin→Guanosin-Transition der invarianten Adenosin-Reste in den *Branch Point*-Regionen verschiedener *E. histolytica*-Introns wurde gezeigt, dass ein erfolgreiches Spleißen vom Vorhandensein dieser Adenosin-Reste abhängig ist (s. Abb. 15). Die Mutation verhinderte, dass die Introns aus den primären Transkripten entfernt wurden (s. Abb. 16). Eine Ausnahme stellte das *ehorf0.6*-Intron dar, denn die pST1.1A₆₂→G-mRNA wurde zwar gespleißt, jedoch erfolgte das Entfernen des Introns nicht an vorhergesagter Position, sondern direkt unterhalb des durch die Mutation von ATTAAT zu ATTAGT neu entstandenen TAG Tri-Nukleotids. Unmittelbar 8 Bp stromaufwärts dieser Basen ist ein weiteres WYTWAY-Motiv lokalisiert (s. Abb. 17). Es ist anzunehmen, dass diese ACTTAT Sequenz mit der 5'-Spleißstelle interagiert und die Funktion des deaktivierten *Branch Point*-Motivs übernimmt. Dadurch vergrößerte sich die Länge des nachgewiesenen Transkriptes um 9 Nukleotide im Vergleich zur korrekt gespleißten Wildtyp-RNA. Trotz der Punktmutation war also dennoch gewährleistet, dass ein Spleißen an amöbenspezifischen Konsensussequenzen erfolgen konnte. Der offene Leserahmen der vergrößerten mRNA blieb zwar erhalten, jedoch stellt die ursprüngliche TAG-Spleißstelle in diesem Transkript ein Stop-Codon dar. Die derart gespleißte mRNA führte vermutlich zu einem Abbruch der Translation, was im Einklang mit der verzeichneten Inhibition der Luciferase-Aktivität steht (s. Abb. 15).

Die Introns *eherd2* und *ehrp127a-1* der Vektoren pST1.2A₅₄→G und pST1A₆₁→G enthalten eine vom WYTWAY-Konsensus (W=A oder T; Y= C oder T) abweichende Sequenz: aacAATAACaac bzw. attACTTAAttc (die abweichenden Adenosin-Reste sind unterstrichen, das WYTWAY-Motiv ist in großen, benachbarte Nukleotide in kleinen Nukleotiden gezeigt, und der invariante Adenosin-Baustein ist durch fett-gedruckte Buchstaben hervorgehoben). In der intervenierenden *ehrp127a*-Sequenz sind zwei benachbarte Adenosin-Reste so angeordnet, dass jeder für sich der invariante Baustein eines separaten, um ein Nukleotid verschobenen *Branch Point*-Motivs sein könnte: attACTTAAttc oder attACTTAAttc. Nach der Punktmutation zu attACTTGAttc könnte die nicht vollständig inhibierte Luciferase-Aktivität (10 %) darauf zurückzuführen sein,

dass ein geringer Anteil des primären Transkripts auch durch das alternativ nutzbare Motiv `attaCTTGATtc` gespleißt werden kann. Mit der Lokalisation an Position -8 befindet sich diese Sequenz zudem ebenfalls in erforderter Distanz zur 3'-Spleißstelle. Es wäre sogar denkbar, dass neben der präferentiellen Erkennung von `attACTTAttc` beide Motive auch *in vivo* genutzt werden könnten. Dafür spricht die Beobachtung, dass die Luciferase-Aktivität nach der `attaCTTAGTtc`-Mutation nicht gänzlich unbeeinflusst blieb, sondern „nur“ 70- 80 % erreichte. Da sowohl bei der Erkennung des einen oder des anderen Motivs dieselbe 3'-Spleißstelle genutzt werden könnte, wäre das korrekte Spleißen der Exons in beiden Fällen möglich. Auf Nukleinsäure-Ebene ließ sich allerdings nach der `attACTTGttc`-Mutation trotz der 10 % Luciferase-Aktivität nicht nachweisen, dass auch reife mRNA-Transkripte gebildet wurden (s. Abb. 16). Vermutlich war der Anteil ungespleißter Moleküle so dominant, dass nur diese in der PCR amplifiziert wurden.

Auch durch die A→G-Transition des in dem Vektor `pST1.2A54→G` enthaltenen *eherd2*-Introns wurde ein TAG-Konsensusmotiv und damit eine zusätzliche 3'-Spleißstelle generiert, an der zumindest ein Teil des primären Transkripts nachweislich gespleißt wurde. Im Gegensatz zu `pST1.1A62→G` ist im *eherd2*-Intron weder in der Wildtyp-Sequenz `aacAATACaac`, noch nach der Transition zu `aacAATAGCaac` ein zweites striktes WYTWAY-Motiv vorhanden. Es bleibt zu vermuten, dass das Spleißen an kryptischen Motiven erfolgte, die nach der Punktmutation aktiviert wurden. Dabei muss auch korrekt gespleißte Luciferase-mRNA entstanden sein, was sowohl auf Protein- als auch auf Nukleinsäure-Ebene nachweisbar war (s. Abb. 15 und 16). Bei Abweichungen vom WYTWAY-Konsensus könnte also zwar die Erkennung der 3'-Spleißstelle gewährleistet bleiben, jedoch scheint die Identität des die Verzweigung ausbildenden Nukleotids nicht unausweichlich festgelegt zu sein. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass in *S.cerevisiae*- und Vertebraten-Introns die Bildung der Verzweigung zwar meist von dem am weitesten 3'-gelegenen Adenosin innerhalb des *Branch Point*-Motivs aus startet, jedoch in *Mammalia*-Zellextrakten zum geringen Anteil ebenfalls das vorangehende Nukleotid die Verzweigung ausüben kann (HORNIG et al., 1986; NOBLE et al., 1987; 1988). Daneben wurde in weiteren Mutationsstudien an Vertebraten-Introns (RUSKIN et al., 1985; REED und MANIATIS, 1988) sowie dem

TACTAAC-Motiv aus Hefe-Introns (FOUSER und FRIESEN, 1986; VIJAYRAGHAVAN, 1986; RUIS et al., 1994; QUERY et al., 1994) gezeigt, dass das Spleißen an kryptischen *Branch Point*-Regionen bzw. -Nukleotiden nach Verlust des invarianten Adenosin-Restes zumindest teilweise kompensiert werden kann.

ZHUANG und Mitarbeiter (1989) demonstrierten, dass das *Branch Point*-Element teilweise durch eine *Watson-Crick*-Basenapaarung mit der U2-snRNA interagiert. Es wäre demnach nicht verwunderlich, wenn modifizierte *Branch Point*-Regionen aufgrund verminderter Kompatibilität zur U2-snRNA nicht mehr als solche erkannt werden könnten. Die oben genannten Beispiele zeigen jedoch, dass es trotzdem zu einer Interaktion kommen muss. Die Erkennung der verschiedensten *Branch Point*-Regionen im Tierreich wird vermutlich von nur einem GUAGUA-Motiv innerhalb der jeweiligen U2-snRNA gewährleistet, denn trotz gravierender Sequenz- und Größenunterschiede zwischen der U2-snRNA aus Metazoa und Hefe (ARES, 1986) ist dieser Bereich, welcher an die *Branch Point*-Region bindet, in allen Organismen zu 75 % identisch und essentiell für das Zellwachstum (IGEL und ARES, 1988; SHUSTER und GUTHRIE, 1988; ZHUANG et al., 1989). Obwohl die U2-snRNA der Amöben unbekannt ist, ist eine hohe Verwandtschaft essentieller Abschnitte zu bekannten U2-snRNA-Sequenzen naheliegend, d.h. die GUAGUA-Sequenz der *E. histolytica*-U2-snRNA interagiert vermutlich auch mit dem WYTWAY-Motiv. Auch die Interaktion mit leicht veränderten Nukleotiden ist denkbar, womit die Nutzung der *Branch Point*-Region durch die U2-snRNA nicht unausweichlich an das Vorhandensein obligatorischer Nukleotide gebunden ist. Dies verdeutlicht, dass der Spleißvorgang zwar vorgegebenen Anforderungen nachgehen muss, ein gewisser Spielraum unter bestimmten Umständen jedoch toleriert werden kann.

Um zu ermitteln, inwieweit jedes Nukleotid des WYTWAY-Motivs an der Ausübung seiner Aufgaben beteiligt ist, wie z. B. die Bindung an U2-snRNA oder aber den nukleophilen Angriff der Adenosin-2'-OH-Gruppe auf die 5'-Spleißstelle, wäre die Punktmutation jedes einzelnen Nukleotids erforderlich gewesen. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der amöbenspezifischen WYTWAY- zu den Hefe-TACTAAC-Motiven, sind die Funktionen der letzteren Sequenz wahrscheinlich teilweise auf das *E. histolytica*-Motiv übertragbar. Da beispielsweise beide *Branch Point*-Regionen an Position 3 bzw. 4 grundsätzlich einen Thymidin-Rest enthalten, dürfte diesem Nukleotid ebenfalls eine spezielle

Funktion zukommen. Ebenso wie für Hefe-Introns gezeigt, (LANGFORD et al., 1984; VIJAYRAGHAVAN et al., 1986) könnte sich auch die Mutation des universellen Thymidin-Restes in den Amöben-Introns inhibitorisch auf das Spleißen auswirken.

4.2.6 Mutationen an den Konsensussequenzen der Introns verhindern die Ausbildung der Lasso-Struktur

Bei der Translation unvollständig prozessierter prä-mRNA mit verbleibenden Introns würden defekte Proteine entstehen, welche unter Umständen die Funktion der normalen Proteine stören könnten. Daher ist es entscheidend, dass nur vollständig prozessierte mRNA vom Nukleus ins Cytoplasma transportiert wird. So zeigte sich, dass in Hefe- und Säugerzellen der Export eines Primärtranskriptes durch die Assoziation mit dem Spleißosom verhindert wird (LODISH et al., 1996; LEGRAIN und ROSBASH, 1989). In der hier vorgelegten Arbeit wurde die aus transfizierten Trophozoiten isolierte Gesamt-RNA RT-PCR-Analysen unterzogen. Durch die generierten Amplifikate ist davon auszugehen, dass sowohl die mRNA der Wildtyp- als auch der Mutationskonstrukte im Cytoplasma der Amöben vorhanden war. LEGRAIN und ROSBASH (1989) führten in ein halbsynthetisches Intron Deletionen an der 5'-Spleißstelle bzw. der *Branch Point*-Region ein. Sie zeigten, dass die resultierende mRNA ins Cytoplasma transportiert wurde, im Gegensatz zu der RNA des nicht-mutierten Konstruktes, die RNP-assoziiert im Nukleus verblieb. Die Autoren postulieren, dass die Mutationen an den Spleißstellen und den *Branch Point*-Regionen der Introns diese Sequenzen so verändert haben, dass das jeweilige Intron von den snRNAs sehr viel langsamer als solches erkannt wird. Die sich anhäufende, unvollständig prozessierte mRNA könnte dann wie ein Intron-loses Transkript aus dem Nukleus transportiert werden. Es wäre durchaus denkbar, dass auch das Vorhandensein ungespleißter RNA im Cytoplasma der transfizierten Amöben auf diesen Sachverhalt zurückzuführen ist.

Die Größe der Intron-haltigen mRNA gibt zudem Aufschluss darüber, an welchem Schritt die Spleißreaktion gestoppt wurde. Es ist davon auszugehen, dass bereits die Öffnung der ersten Exon-Intron-Grenze und Ausbildung der Lasso-Struktur verhindert wurden. Hätte dieser erste Schritt des Spleißvorgangs ablaufen können, wäre die gebildete mRNA um 26 Nukleotide kleiner.

4.2.7 Introns innerhalb eines primären Transkriptes werden zum großen Teil anhand der amöbenspezifischen Konsensussequenzen von der Spleißmaschinerie erkannt

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Trophozoiten von *E. histolytica* ein Gen mit einer artifiziellen intervenierenden Sequenz transkribieren und korrekt an der GT/AG-Intron-Grenze spleißen (s. Abb. 18). Es sind zwar in der Literatur einige Experimente mit synthetischen Introns beschrieben, um z. B. die Identifizierung von *Branch Point*-Regionen bzw. Export-regulierender Sequenzen zu ermöglichen oder die Spleißbarkeit von Introns in Abhängigkeit ihrer Position zu untersuchen (LANGFORD et al., 1984; LEGRAIN und ROSBASH, 1989; YOSHIMATSU und NAGAWA, 1994). Hingegen lagen bislang noch keine Experimente zur Ermittlung der minimalen Sequenzanforderungen des Spleißapparates vor.

Das in dieser Arbeit generierte artifizielle Intron besteht mit Ausnahme der konservierten Motive GTTTGTT-, TAG- bzw. ATTTAT ausschließlich aus Sequenzabschnitten, die in dieser Zusammensetzung in *E. histolytica* sonst nicht gefunden wurden. Aus der korrekten Entfernung des gesamten Introns kann geschlossen werden, dass trotz der unspezifischen Sequenz die Formation des Spleißosoms durch die Bindung von U1-, U2- sowie U4-6-snRNA an die spezifischen Konsensussequenzen gewährleistet ist. Darüber hinaus wird deutlich, dass diese Motive ausreichen, um den Spleißprozess zu gewähren. Es können keine Aussagen bezüglich der Menge gebildeter reifer mRNAs getroffen werden, da weder die Luciferase-Aktivitäten direkt mit den Aktivitäten anderer Konstrukte verglichen, noch entsprechende quantitative RNA-Analysen durchgeführt wurden. Die mit Hilfe der RT-PCR-Analysen amplifizierte Produkte spiegeln zudem nicht unbedingt die Mengenverhältnisse der tatsächlich von der Zelle produzierten mRNA-Moleküle wider, denn die präferenzielle Amplifikation einer oder der anderen RNA-Spezies kann in einer derartigen Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Es wurde also nicht ermittelt wie viel, sondern lediglich dass ein Teil der „artifiziellen mRNA“ im gespleißten Zustand vorlag. Möglicherweise wird die artifizielle Sequenz aufgrund ihres geringen A/T-Gehaltes langsamer als gewöhnlich erkannt, so dass der andere Teil der RNA in ungespleißter Form, wie unter 4.2.6 bereits angedeutet, den Zellkern verlässt.

Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Informationen zur Anatomie der Entamöben-Introns erlangen im Zuge des *E. histolytica*-Genomprojektes eine wichtige Bedeutung. Insbesondere die Festlegung offener Leserahmen und die Entdeckung neuer Gene innerhalb unbekannter DNA-Abschnitte wird durch intervenierende Sequenzen, die geringe Länge intergenischer Regionen und den A/T-Reichtum genomischer Sequenzen erschwert. Die neugewonnene Kenntnis über die Exon-Intron-Strukturen und des daraus ableitbaren Algorithmus wird die Annotation neuer Gene in *E. histolytica* erleichtern.

5. Zusammenfassung

Die Amöbiasis, hervorgerufen durch die Infektion mit dem humanpathogenen Protozoon *Entamoeba histolytica*, ist neben der Malaria und der Schistosomiasis eine der häufigsten Parasitosen in tropischen und subtropischen Ländern. Die Infektion mit *E. histolytica* ist durch eine längere Phase einer asymptomatischen Darmbesiedlung mit dem Parasiten gekennzeichnet. In Einzelfällen kann es im Verlauf der Infektion zu einer Invasion mit den klinischen Zeichen von Amöbenruhr oder Amöbenleberabszess kommen. Es ist bislang ungeklärt, welche Mechanismen die Invasivität von *E. histolytica* auslösen. Es wird vermutet, dass die Regulation einer größeren Anzahl von Genen für die Pathogenität der Amöben verantwortlich ist, jedoch liegen zur Zeit nur sehr unzureichende Informationen über Struktur, Organisation und Regulation der Gene von *E. histolytica* vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch die Organisation und Regulation der Intron-haltigen *E. histolytica ehrp127a*-Multigenfamilie untersucht. Darüber hinaus wurde die Struktur von Introns analysiert und die für das Spleißen relevanten Sequenzmotive charakterisiert.

Die *ehrp127a*-Gene kodieren in *E. histolytica* für eine Subklasse von Proteinen der größeren Ribosomen-Untereinheit. Es konnte gezeigt werden, dass die kodierenden Regionen der *ehrp127a*-Gene zu 96% identisch sind, wohingegen sich die flankierenden Regionen und intervenierenden Sequenzen stark unterscheiden. Vermutlich sind die Gene durch Duplikationsereignisse während einer noch nicht sehr lang zurückliegenden Phase der Evolution der Amöben entstanden. Die stromaufwärts bzw. stromabwärts der *ehrp127a*-Gene gelegenen offenen Leserahmen sind durch relativ kurze intergenische Regionen (105 bis 278 Bp) voneinander getrennt und auch die intervenierenden Sequenzen der einzelnen *ehrp127a*-Gene bestehen lediglich aus 46 bis 115 Bp. Durch Transfektion eines Reportergens unter Kontrolle der verschiedenen *ehrp127a*-flankierenden Regionen zeigte sich, dass die Gene in den Trophozoiten von *E. histolytica* unterschiedlich stark exprimiert werden, wobei für die unterschiedliche Expression die nicht-kodierenden-5'-Regionen verantwortlich sind und die nicht-kodierenden-3'-Regionen keinen Einfluss darauf haben.

Deletionsanalysen ergaben, dass die untersuchte *ehrpl27a-1-5'*-Promotorregion mindestens vier Sequenzbereiche enthält, die für die volle Promotoraktivität benötigt werden. Darüber hinaus wurde ein neues Sequenzmotiv identifiziert, das offenbar ausschließlich in ribosomalen Genen von *E. histolytica* vorhanden ist. Dieses AGGGTT-Motiv ist zwischen Position -9 bis -60 oberhalb des Startcodons lokalisiert. Durch Mutation des Motivs wurde gezeigt, dass es einen wesentlichen Anteil an der Kontrolle der Expression des *ehrpl27a-1*-Gens trägt. Neben der Promotorregion wird die Stärke der Expression der verschiedenen *ehrpl27a*-Gene durch die Anwesenheit eines singulären Introns maßgeblich beeinflusst, da die Deletion des Introns zu einer signifikanten Abnahme der *ehrpl27a*-Expression führt.

Die weitere Analyse genomischer Sequenzabschnitte ergab, dass *E. histolytica* weitaus mehr Introns besitzt, als bislang angenommen wurde. Durch den Vergleich korrespondierender genomischer DNA-Abschnitte von *E. histolytica* bzw. der nah verwandten Spezies *E. dispar* und entsprechender cDNA-Sequenzen, wurden weitere Introns in den Amöben identifiziert. Der Vergleich der verschiedenen Introns ergab, dass diese durchschnittlich eine Länge von 65 Bp und einen A/T-Gehalt von 82 % aufweisen. Alle Introns enthalten an der 5'- bzw. 3'-Spleißstelle die konservierten Sequenzmotive GTTTGTT bzw. TAG sowie das Motiv WYTWAY (W= A oder T; Y= C oder T), das in einem engen Rahmen von 7-11 Bp oberhalb der 3'-Spleißstelle lokalisiert ist. Das WYTWAY-Motiv stellt offenbar die spezifische *Branch Point*-Region der Amöben-Introns dar. Mit Hilfe von *Linker-Scanning*-Mutagenese, gezielten Punktmutationen, der Verwendung zufälliger Nukleotidabfolgen und RT-PCR-Analysen wurde nachgewiesen, dass die drei Motive für den korrekten Spleißvorgang notwendig und ausreichend sind. Darüber hinaus ist der Adenosin-Rest innerhalb des WYTWAY Motivs sowie die korrekte Lokalisation dieses Motivs oberhalb der 3'-Spleißstelle essentiell für einen korrekten Spleißvorgang.

Neben dem gewonnenen Einblick in die Mechanismen der Genregulation sollten insbesondere die neu identifizierten konservierten Sequenzmotive das Auffinden von Introns im Zuge des derzeit durchgeführten *E. histolytica* Genomprojekts erheblich erleichtern.

6. Literaturverzeichnis

- Abelson, J. (1979). RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu Rev Biochem* **48**: 1035-1069.
- Amaldi, F., Bozzoni, I., Beccari, E. und Pierandrei-Amaldi, P. (1989). Expression of ribosomal protein genes and regulation of ribosome biosynthesis in *Xenopus* development. *Trends Biochem Sci* **14**: 175-178.
- Ares, M., Jr. (1986). U2 RNA from yeast is unexpectedly large and contains homology to vertebrate U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Cell* **47**: 49-59.
- Banerjee, A.K. (1980). 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **44**: 175-205.
- Banerji, J., Olson, L. und Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**: 729-740.
- Bass, B.L. und Cech, T.R. (1984). Specific interaction between the self-splicing RNA of *Tetrahymena* and its guanosine substrate: implications for biological catalysis by RNA. *Nature* **308**: 820-826.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H. und Tromp, M.C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**: 819-826.
- Bernstein, P. und Ross, J. (1989). Poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci* **14**: 373-377.
- Biderre, C., Metenier, G. und Vivares, C.P. (1998). A small spliceosomal-type intron occurs in a ribosomal protein gene of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol* **94**: 283-286.
- Borst, P. und Greaves, D.R. (1987). Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* **235**: 658-667.
- Bourdon, V., Harvey, A und Lonsdale, D.M. (2001). Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO Rep* **2**: 394-398.
- Bozzoni, I., Fragapane, P., Annesi, F., Pierandrei-Amaldi, P., Amaldi, F. und Beccari, E. (1984). Expression of two *Xenopus laevis* ribosomal protein genes in injected frog oocytes. A specific splicing block interferes with the L1 RNA maturation. *J Mol Biol* **180**: 987-1005.

- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F. und Chambon, P. (1978). Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4853-4857.
- Breathnach, R. und Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**: 349-383.
- Breitbart, R.E., Andreadis, A. und Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 467-495.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E. und Palmiter, R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 836-840.
- Brody, E. und Abelson, J. (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**: 963-967.
- Brow, D.A. und Guthrie, C. (1988). Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature* **334**: 213-218.
- Brown, S.V. und Williams, N. (1999). Analysis of the 60 S ribosomal protein L27a (L29) gene of *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* **29**: 731-736.
- Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C. und Tannich, E. (1993). Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* **12**: 925-933.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M. und Tannich, E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* **22**: 255-263.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J. Hall, N. und Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains a multitude of twenty cysteine protease genes of which only a small subset is expressed during *in-vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell* **im Druck**.
- Brunk, C.F. und Sadler, L.A. (1990). Characterization of the promoter region of *Tetrahymena* genes. *Nucleic Acids Res* **18**: 323-329.
- Buchman, A.R. und Berg, P. (1988). Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol* **8**: 4395-4405.
- Buss, H., Lioutas, C., Dobinsky, S., Nickel, R. und Tannich, E. (1995). Analysis of the 170-kDa lectin gene promoter of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **72**: 1-10.
- Callis, J., Fromm, M. und Walbot, V. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev* **1**: 1183-1200.

- Cartegni, L., Chew, S.L. und Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**: 285-298.
- Cech, T.R. (1986). The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* **44**: 207-210.
- Chu, V.T., Adamidi, C., Liu, Q., Perlman, P.S. und Pyle, A.M. (2001). Control of branch-site choice by a group II intron. *Embo J* **20**: 6866-6876.
- Chung, S. und Perry, R.P. (1989). Importance of introns for expression of mouse ribosomal protein gene rpL32. *Mol Cell Biol* **9**: 2075-2082.
- Clark, C.G. und Diamond, L.S. (1991). Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* **49**: 297-302.
- Clark, C.G. und Roger, A.J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6518-6521.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2110-2114.
- Colombo, P., Yon, J. und Fried, M. (1991). The organization and expression of the human L7a ribosomal protein gene. *Biochim Biophys Acta* **1129**: 93-95.
- Colombo, P. und Fried, M. (1992). Functional elements of the ribosomal protein L7a (rpL7a) gene promoter region and their conservation between mammals and birds. *Nucleic Acids Res* **20**: 3367-3373.
- Coolidge, C.J., Seely, R.J. und Patton, J.G. (1997). Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* **25**: 888-896.
- Cornelissen, A.W., Overdulve, J.P. und van der Ploeg, M. (1984). Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* **88**: 531-553.
- Crabb, B.S. und Cowman, A.F. (1996). Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7289-7294.
- Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* **204**: 264-271.
- Csank, C., Taylor, F.M. und Martindale, D.W. (1990). Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **18**: 5133-5141.

- Dabeva, M.D., Post-Beittenmiller, M.A. und Warner, J.R. (1986). Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5854-5857.
- Dacks, J.B. und Doolittle, W.F. (2001). Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell* **107**: 419-425.
- Deitsch, K.W., Calderwood, M.S. und Wellems, T.E. (2001). Malaria. Cooperative silencing elements in var genes. *Nature* **412**: 875-876.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. und Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 431-432.
- Diamond, L.S. und Clark, C.G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* **40**: 340-344.
- Donald, R.G. und Roos, D.S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11703-11707.
- Donelson, J.E., Hill, K.L. und El-Sayed, N.M. (1998). Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* **91**: 51-66.
- Duffy, M.F., Reeder, J.C. und Brown, G.V. (2003). Regulation of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: censoring freedom of expression? *Trends Parasitol* **19**: 121-124.
- Duncker, B.P., Davies, P.L. und Walker, V.K. (1997). Introns boost transgene expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **254**: 291-296.
- Early, A.E. und Williams, J.G. (1989). Identification of sequences regulating the transcription of a *Dictyostelium* gene selectively expressed in prespore cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 6473-6484.
- Edman, U., Meza, I. und Agabian, N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3024-3028.
- Evans, M.J. und Scarpulla, R.C. (1989). Introns in the 3'-untranslated region can inhibit chimeric CAT and beta-galactosidase gene expression. *Gene* **84**: 135-142.
- Fidock, D.A., Nomura, T., et al. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**: 861-871.
- Filipenko, M.L., Vinichenko, N.A., Karpova, G.G., Mertvetsov, N.P. und Amaldi, F. (1998). Isolation, structural analysis and mapping of the functional gene of human ribosomal protein S26. *Gene* **211**: 287-292.

- Fink, G.R. (1987). Pseudogenes in yeast? *Cell* **49**: 5-6.
- Fong, Y.W. und Zhou, Q. (2001). Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414**: 929-933.
- Fouser, L.A. und Friesen, J.D. (1986). Mutations in a yeast intron demonstrate the importance of specific conserved nucleotides for the two stages of nuclear mRNA splicing. *Cell* **45**: 81-93.
- Gallwitz, D. und Sures, I. (1980). Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2546-2550.
- Gangopadhyay, S.S., Ray, S.S., Sinha, P. und Lohia, A. (1997). Unusual genome organisation in *Entamoeba histolytica* leads to two overlapping transcripts. *Mol Biochem Parasitol* **89**: 73-83.
- Gardner, M.J., Hall, N. et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.
- Garwood, J. und Lepesant, J.A. (1994). The *Drosophila melanogaster* homologue of ribosomal protein S18. *Gene* **141**: 231-235.
- Gelderman, A.H., Bartgis, I.L., Keister, D.B. und Diamond, L.S. (1971). A comparison of genome sizes and thermal-denaturation-derived base composition of DNAs from several members of *Entamoeba histolytica* group. *J Parasitol* **57**: 912-916.
- Ghosh, S.K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. und Samuelson, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum und golgi apparatus. *Infect Immun* **67**: 3073-3081.
- Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**: 501.
- Gilchrist, C.A., Streets, H.L., Ackers, J.P. und Hall, R. (1995). Transient expression of luciferase in *Entamoeba histolytica* driven by the ferredoxin gene 5' and 3' regions. *Mol Biochem Parasitol* **74**: 1-10.
- Gilchrist, C.A., Holm, C.F., Hughes, M.A., Schaeffer, J.M., Mann, B.J. und Petri, W.A., Jr. (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3' sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *J Biol Chem* **276**: 11838-11843.
- Göringer, H.U., Koslowsky, D.J., Morales, T.H. und Stuart, K. (1994). The formation of mitochondrial ribonucleoprotein complexes involving guide RNA molecules in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1776-1780.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R. und Sharp, P.A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**: 345-353.
- Graveley, B.R., Hertel, K.J. und Maniatis, T. (1999). SR proteins are 'locators' of

- the RNA splicing machinery. *Curr Biol* **9**: R6-7.
- Gruss, P., Lai, C.J., Dhar, R. und Khoury, G. (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4317-4321.
- Hamann, L., Nickel, R. und Tannich, E. (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8975-8979.
- Hamer, D.H. und Leder, P. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**: 1299-1302.
- Hornig, H., Aebi, M. und Weissmann, C. (1986). Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA splicing *in vitro*. *Nature* **324**: 589-591.
- Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P. und Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* **253**: 6551-6560.
- Igel, A.H. und Ares, M., Jr. (1988). Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing. *Nature* **334**: 450-453.
- Jackson, R.J. und Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* **62**: 15-24.
- Johnson, A.M. (1990). Comparison of dinucleotide frequency and codon usage in *Toxoplasma* and *Plasmodium*: evolutionary implications. *J Mol Evol* **30**: 383-387.
- Joyce, M.P. und Ravdin, J.I. (1988). Pathology Of Human Amoebiasis. In: *Amoebiasis: Human Infection by E. histolytica* (Ravdin, J.I., Hrsg.). Wiley, New York: 129-146.
- Kandels-Lewis, S. und Seraphin, B. (1993). Involvement of U6 snRNA in 5' splice site selection. *Science* **262**: 2035-2039.
- Kennedy, C.F. und Berget, S.M. (1997). Pyrimidine tracts between the 5' splice site and branch point facilitate splicing and recognition of a small *Drosophila* intron. *Mol Cell Biol* **17**: 2774-2780.
- Knapp, B., Nau, U., Hundt, E. und Kupper, H.A. (1991). Demonstration of alternative splicing of a pre-mRNA expressed in the blood stage form of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **266**: 7148-7154.
- Knippers, R. (2001). Molekulare Genetik. 8. Aufl., Georg Thieme Verlag., Stuttgart.
- Krainer, A.R., Maniatis, T., Ruskin, B. und Green, M.R. (1984). Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell* **36**: 993-1005.

- Krause, M. und Hirsh, D. (1987). A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* **49**: 753-761.
- Kruys, V., Wathelet, M., Poupart, P., Contreras, R., Fiers, W., Content, J. und Huez, G. (1987). The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6030-6034.
- Kusuda, J., Hirai, M., Tanuma, R., Hirata, M. und Hashimoto, K. (1999). Genomic structure and chromosome location of RPL27A/Rpl27a, the genes encoding human and mouse ribosomal protein L27A. *Cytogenet Cell Genet* **85**: 248-251.
- Lagrange, T., Franzetti, B., Axelos, M., Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1993). Structure and expression of the nuclear gene coding for the chloroplast ribosomal protein L21: developmental regulation of a housekeeping gene by alternative promoters. *Mol Cell Biol* **13**: 2614-2622.
- Laird, P.W., Zomerdijk, J.C., de Korte, D. und Borst, P. (1987). *In vivo* labelling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Embo J* **6**: 1055-1062.
- Landfear, S.M., McMahon-Pratt, D. und Wirth, D.F. (1983). Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol* **3**: 1070-1076.
- Langford, C.J. und Gallwitz, D. (1983). Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. *Cell* **33**: 519-527.
- Langford, C.J., Klinz, F.J., Donath, C. und Gallwitz, D. (1984). Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* **36**: 645-653.
- Lanzer, M., de Bruin, D. und Ravetch, J.V. (1992 a). Transcription mapping of a 100 kb locus of *Plasmodium falciparum* identifies an intergenic region in which transcription terminates and reinitiates. *Embo J* **11**: 1949-1955.
- Lanzer, M., de Bruin, D. und Ravetch, J.V. (1992 b). A sequence element associated with the *Plasmodium falciparum* KAHRP gene is the site of developmentally regulated protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **20**: 3051-3056.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. und Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* **7**: 996-1007.
- Legrain, P. und Rosbash, M. (1989). Some *cis*- and *trans*-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**: 573-583.

- Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitology Today* **13**: 178-183.
- Lerner, M.R. und Steitz, J.A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5495-5499.
- Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. und Steitz, J.A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**: 220-224.
- Lesser, C.F. und Guthrie, C. (1993). Mutations in U6 snRNA that alter splice site specificity: implications for the active site. *Science* **262**: 1982-1988.
- Liston, D.R. und Johnson, P.J. (1998). Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* **14**: 261-265.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. und Darnell, J. (1996). Molekulare Zellbiologie. 2. Aufl., Walter de Gruyter Verlag., Berlin, New York.
- Lohia, A. und Samuelson, J. (1993). Cloning of the ehcdc2 gene from *Entamoeba histolytica* encoding a protein kinase p34cdc2 homologue. *Gene* **127**: 203-207.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B. (1997). Parasitologie. Spektrum Akademischer Verlag., Heidelberg, Berlin.
- Luna-Arias, J.P., Hernandez-Rivas, R., de Dios-Bravo, G., Garcia, J., Mendoza, L. und Orozco, E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology* **145**: 33-40.
- Maeda, N., Kenmochi, N. und Tanaka, T. (1993). The complete nucleotide sequence of chicken ribosomal protein L7a gene and the multiple factor binding sites in its 5'-flanking region. *Biochimie* **75**: 785-790.
- Mager, W.H. (1988). Control of ribosomal protein gene expression. *Biochim Biophys Acta* **949**: 1-15.
- Mager, W.H. und Planta, R.J. (1991). Coordinate expression of ribosomal protein genes in yeast as a function of cellular growth rate. *Mol Cell Biochem* **104**: 181-187.
- Mai, Z. und Samuelson, J. (1998). A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich *Entamoeba histolytica* antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich *E. histolytica* protein. *Infect Immun* **66**: 353-355.
- Maniatis, T. und Reed, R. (2002 a). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**: 499-506.
- Maniatis, T. und Tasic, B. (2002 b). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**: 236-243.
- Martinez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In: Amoebiasis.

- Amsterdam Elsevier Science: 11-43.
- Matsumoto, K., Wassarman, K.M. und Wolffe, A.P. (1998). Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. *Embo J* **17**: 2107-2121.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. und Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* **8**: 491-501.
- McCoy, J.J., Mann, B.J. und Petri, W.A., Jr. (1994). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun* **62**: 3045-3050.
- McKnight, S.L. und Kingsbury, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**: 316-324.
- Miranda, R., Salgado, L.M., Sanchez-Lopez, R., Alagon, A. und Lizardi, P.M. (1996). Identification and analysis of the u6 small nuclear RNA gene from *Entamoeba histolytica*. *Gene* **180**: 37-42.
- Moore M.J., Query, C. und Sharp, P.A. (1993). Splicing for Precursors to mRNA by the Spliceosome. *The RNA World*: 303-355.
- Moshitch-Moshkovitch, S., Petter, R., Levitan, A., Stolarsky, T. und Mirelman, D. (1998). Regulation of expression of ribosomal protein L-21 genes of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* is at the post-transcriptional level. *Mol Microbiol* **27**: 677-685.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**: 459-472.
- Müller, U.F., Lambert, L. und Göringer, H.U. (2001). Annealing of RNA editing substrates facilitated by guide RNA-binding protein gBP21. *Embo J* **20**: 1394-1404.
- Murphy, W.J., Watkins, K.P. und Agabian, N. (1986). Identification of a novel Y-branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. *Cell* **47**: 517-525.
- Nagel, S.D. und Boothroyd, J.C. (1988). The alpha- and beta-tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol Biochem Parasitol* **29**: 261-273.
- Nakaar, V., Bermudes, D., Peck, K.R. und Joiner, K.A. (1998). Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 229-239.
- Naora, H. und Deacon, N.J. (1982). Relationship between the total size of exons and introns in protein-coding genes of higher eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6196-6200.

- Neuberger, M.S. und Williams, G.T. (1988). The intron requirement for immunoglobulin gene expression is dependent upon the promoter. *Nucleic Acids Res* **16**: 6713-6724.
- Newman, A. (1994). Activity in the spliceosome. *Current Biology* **4**: 462-464.
- Ng, R. und Abelson, J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3912-3916.
- Nickel, R. und Tannich, E. (1994). Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7095-7098.
- Nikolov, D.B. und Burley, S.K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 15-22.
- Nixon, J.E., Wang, A., Morrison, H.G., McArthur, A.G., Sogin, M.L., Loftus, B.J. und Samuelson, J. (2002). A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3701-3705.
- Noble, J.C., Pan, Z.Q., Prives, C. und Manley, J.L. (1987). Splicing of SV40 early pre-mRNA to large T and small t mRNAs utilizes different patterns of lariat branch sites. *Cell* **50**: 227-236.
- Noble, J.C., Prives, C. und Manley, J.L. (1988). Alternative splicing of SV40 early pre-mRNA is determined by branch site selection. *Genes Dev* **2**: 1460-1475.
- Nudel, U., Soreq, H. und Littauer, U.Z. (1976). Globin mRNA species containing poly(A) segments of different lengths. Their functional stability in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* **64**: 115-121.
- Nygaard, O., Nilsson, L. und Westermann, P. (1987). Characterisation of the ribosomal binding site for eukaryotic elongation factor 2 by chemical cross-linking. *Biochim Biophys Acta* **910**: 245-253.
- Padgett, R.A., Konarska, M.M., Grabowski, P.J., Hardy, S.F. und Sharp, P.A. (1984). Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**: 898-903.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. und Sharp, P.A. (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* **55**: 1119-1150.
- Parker, R. und Guthrie, C. (1985). A point mutation in the conserved hexanucleotide at a yeast 5' splice junction uncouples recognition, cleavage, and ligation. *Cell* **41**: 107-118.
- Patterson, B. und Guthrie, C. (1991). A U-rich tract enhances usage of an alternative 3' splice site in yeast. *Cell* **64**: 181-187.
- Patzelt, E., Perry, K.L. und Agabian, N. (1989). Mapping of branch sites in trans-spliced pre-mRNAs of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **9**: 4291-4297.

- Peebles, C.L., Perlman, P.S., Mecklenburg, K.L., Petrillo, M.L., Tabor, J.H., Jarrell, K.A. und Cheng, H.L. (1986). A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell* **44**: 213-223.
- Petter, R., Rozenblatt, S., Nuchamowitz, Y. und Mirelman, D. (1992). Chromosome walk in *Entamoeba histolytica*: the gene encoding for ribosomal protein L21 neighbors one of the actin genes. *Arch Med Res* **23**: 45-48.
- Petter, R., Moshitch, S., Rozenblatt, S., Nuchamowitz, Y. und Mirelman, D. (1994). Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Gene* **150**: 181-186.
- Peyret, P., Katinka, M.D., Duprat, S., Duffieux, F., Barbe, V., Barbazanges, M., Weissenbach, J., Saurin, W. und Vivares, C.P. (2001). Sequence and analysis of chromosome I of the amitochondriate intracellular parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora). *Genome Res* **11**: 198-207.
- Plaimauer, B., Ortner, S., Wiedermann, G., Scheiner, O. und Duchene, M. (1994). An intron-containing gene coding for a novel 39-kilodalton antigen of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **66**: 181-185.
- Pollack, Y., Katzen, A.L., Spira, D.T. und Golenser, J. (1982). The genome of *Plasmodium falciparum*. I: DNA base composition. *Nucleic Acids Res* **10**: 539-546.
- Porter, M.E. (2002). Positive and negative effects of deletions and mutations within the 5' flanking sequences of *Plasmodium falciparum* DNA polymerase delta. *Mol Biochem Parasitol* **122**: 9-19.
- Proudfoot, N.J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **14**: 105-110.
- Proudfoot, N.J. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* **25**: 290-293.
- Pugh, B.F. und Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**: 1935-1945.
- Purdy, J.E., Mann, B.J., Pho, L.T. und Petri, W.A., Jr. (1994). Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7099-7103.
- Purdy, J.E., Pho, L.T., Mann, B.J. und Petri, W.A., Jr. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 91-103.
- Query, C.C., Moore, M.J. und Sharp, P.A. (1994). Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev* **8**: 587-597.

- Quon, D.V., Delgadillo, M.G., Khachi, A., Smale, S.T. und Johnson, P.J. (1994). Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4579-4583.
- Rajkovic, A., Davis, R.E., Simonsen, J.N. und Rottman, F.M. (1990). A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8879-8883.
- Ramakrishnan, G., Ragland, B.D., Purdy, J.E. und Mann, B.J. (1996). Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **19**: 91-100.
- Reddy, R. und Busch, H. (1983). Small nuclear RNAs and RNA processing. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **30**: 127-162.
- Reed, R. und Maniatis, T. (1985). Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* **41**: 95-105.
- Reed, R. und Maniatis, T. (1988). The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **2**: 1268-1276.
- Rippe, R.A., Lorenzen, S.I., Brenner, D.A. und Breindl, M. (1989). Regulatory elements in the 5'-flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha 1 type I collagen gene. *Mol Cell Biol* **9**: 2224-2227.
- Rivero, F. (2002). mRNA processing in *dictyostelium*: sequence requirements for termination and splicing. *Protist* **153**: 169-176.
- Roeder, R.G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci* **16**: 402-408.
- Rogers, J. und Wall, R. (1980). A mechanism for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1877-1879.
- Roos, D.S. (1993). Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **268**: 6269-6280.
- Rowen, L., Young, J., et al. (2002). Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics* **79**: 587-597.
- Ruis, B.L., Kivens, W.J. und Siliciano, P.G. (1994). The interaction between the first and last intron nucleotides in the second step of pre-mRNA splicing is independent of other conserved intron nucleotides. *Nucleic Acids Res* **22**: 5190-5195.
- Ruiz i Altaba, A., Ozaki, L.S., Gwadz, R.W. und Godson, G.N. (1987). Organization and expression of the *Plasmodium knowlesi* circumsporozoite

- antigen gene. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 233-245.
- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T. und Green, M.R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* **38**: 317-331.
- Ruskin, B., Greene, J.M. und Green, M.R. (1985). Cryptic branch point activation allows accurate *in vitro* splicing of human beta-globin intron mutants. *Cell* **41**: 833-844.
- Ryu, W.S. und Mertz, J.E. (1989). Simian virus 40 late transcripts lacking excisable intervening sequences are defective in both stability in the nucleus and transport to the cytoplasm. *J Virol* **63**: 4386-4394.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sanchez-Lopez, R., Gama-Castro, S., Ramos, M.A., Merino, E., Lizardi, P.M. und Alagon, A. (1998). Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 355-359.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J. und Roe, B.A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **143**: 161-178.
- Sargeant, P.G., Williams, J.E. und Grene, J.D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 519-521.
- Sawadogo, M. und Sentenac, A. (1990). RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu Rev Biochem* **59**: 711-754.
- Schaenman, J.M., Gilchrist, C.A., Mann, B.J. und Petri, W.A., Jr. (2001). Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA-binding motif RRM. *J Biol Chem* **276**: 1602-1609.
- Scholze, H. und Tannich, E. (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol* **244**: 512-523.
- Schürch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R. und Roditi, I. (1994). Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol* **14**: 3668-3675.
- Schwindinger, W.F. und Warner, J.R. (1987). Transcriptional elements of the yeast ribosomal protein gene CYH2. *J Biol Chem* **262**: 5690-5695.
- Senapathy, P., Shapiro, M.B. und Harris, N.L. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications

- to genome project. *Methods Enzymol* **183**: 252-278.
- Seraphin, B. und Rosbash, M. (1990). Exon mutations uncouple 5'-splice site selection from U1 snRNA pairing. *Cell* **63**: 619-629.
- Shapiro, T.A. und Englund, P.T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* **49**: 117-143.
- Sharp, P.A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* **77**: 805-815.
- Shuster, E.O. und Guthrie, C. (1988). Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides. *Cell* **55**: 41-48.
- Sibley, L.D. und Howe, D.K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol* **219**: 3-15.
- Siliciano, P.G. und Guthrie, C. (1988). 5'-splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes Dev* **2**: 1258-1267.
- Singh, U., Gilchrist, C.A., Schaenman, J.M., Rogers, J.B., Hockensmith, J.W., Mann, B.J. und Petri, W.A. (2002). Context-dependent roles of the *Entamoeba histolytica* core promoter element GAAC in transcriptional activation and protein complex assembly. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 107-116.
- Siu, G., Wurster, A.L., Duncan, D.D., Soliman, T.M. und Hedrick, S.M. (1994). A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *Embo J* **13**: 3570-3579.
- Smale, S.T. und Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**: 103-113.
- Soehnge, H., Huang, X., Becker, M., Conover, D. und Stern, M. (1997). Cloning and sequencing of ribosomal protein L27a and a gene similar to human GS1 in Drosophila. *Gene* **185**: 257-263.
- Sogin, M.L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **1**: 457-463.
- Sogin, M.L. und Silberman, J.D. (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* **28**: 11-20.
- Soldati, D. und Boothroyd, J.C. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* **260**: 349-352.
- Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H. und Meade, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* **93**: 781-807.
- Struhl, K. (1987). Promoters, activator proteins und the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**: 295-297.

- Stuart, K. und Feagin, J.E. (1992). Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol* **141**: 65-88.
- Sturm, N.R. und Simpson, L. (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* **61**: 879-884.
- Sucic, J.F., Selmin, O. und Rutherford, C.L. (1993). Regulation of the *Dictyostelium* glycogen phosphorylase 2 gene by cyclic AMP. *Dev Genet* **14**: 313-322.
- Sutton, R.E. und Boothroyd, J.C. (1986). Evidence for *trans* splicing in trypanosomes. *Cell* **47**: 527-535.
- Tachibana, H., Ihara, S., Kobayashi, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T. und Watanabe, Y. (1991). Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 2234-2239.
- Tannich, E. (1998). Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 593-596.
- Tessier, L.H., Keller, M., Chan, R.L., Fournier, R., Weil, J.H. und Imbault, P. (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by *trans*-splicing in *Euglena*. *Embo J* **10**: 2621-2625.
- Tschudi, C. und Ullu, E. (1990). Destruction of U2, U4, or U6 small nuclear RNA blocks *trans* splicing in trypanosome cells. *Cell* **61**: 459-466.
- Underwood, M.R. und Fried, H.M. (1990). Characterization of nuclear localizing sequences derived from yeast ribosomal protein L29. *Embo J* **9**: 91-99.
- Urban, B., Blasig, C., Förster, B., Hamelmann, C. und Horstmann, R.D. (1996). Putative serine/threonine protein kinase expressed in complement-resistant forms of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **80**: 171-178.
- Van Lunzen, J.T., E., Burchard, G.D. (1996). Amöbenruhr und Amöbenleberabszess. *Deutsches Ärzteblatt* **93**: A-3410-3416.
- Vazquez-Macias, A., Martinez-Cruz, P., Castaneda-Patlan, M.C., Scheidig, C., Gysin, J., Scherf, A. und Hernandez-Rivas, R. (2002). A distinct 5' flanking var gene region regulates *Plasmodium falciparum* variant erythrocyte surface antigen expression in placental malaria. *Mol Microbiol* **45**: 155-167.
- Venter, J.C., Adams, M.D., et. al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Vijayraghavan, U., Parker, R., Tamm, J., Iimura, Y., Rossi, J., Abelson, J. und Guthrie, C. (1986). Mutations in conserved intron sequences affect multiple steps in the yeast splicing pathway, particularly assembly of the

- spliceosome. *Embo J* **5**: 1683-1695.
- Vinkenoog, R., Veldhuisen, B., Speranca, M.A., del Portillo, H.A., Janse, C. und Waters, A.P. (1995). Comparison of introns in a *cdc2*-homologous gene within a number of *Plasmodium* species. *Mol Biochem Parasitol* **71**: 233-241.
- Wahlgren, M., Fernandez, V., Chen, Q., Svard, S., und Hagblom, P. (1999). Waves of malarial variations. *Cell* **96**: 603-606.
- Walsh, J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* **8**: 228-238.
- WHO (1997). Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiol Rec* 72:97-100.
- Willhoeft, U., Hamann, L. und Tannich, E. (1999 a). A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* **67**: 5925-5929.
- Willhoeft, U., Buss, H. und Tannich, E. (1999 b). Analysis of cDNA expressed sequence tags from *Entamoeba histolytica*: identification of two highly abundant polyadenylated transcripts with no overt open reading frames. *Protist* **150**: 61-70.
- Willhoeft, U., Campos-Gongora, E., Touzni, S., Bruchhaus, I. und Tannich, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist* **152**: 149-156.
- Willhoeft, U., Buss, H. und Tannich, E. (2002). The abundant polyadenylated transcript 2 DNA sequence of the pathogenic protozoan parasite *Entamoeba histolytica* represents a nonautonomous non-long-terminal-repeat retrotransposon-like element which is absent in the closely related nonpathogenic species *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* **70**: 6798-6804.
- Wise, J.A. (1993). Guides to the heart of the spliceosome. *Science* **262**: 1978-1979.
- Wong, J.M., Liu, F. und Bateman, E. (1992). Isolation of genomic DNA encoding transcription factor TFIID from *Acanthamoeba castellanii*: characterization of the promoter. *Nucleic Acids Res* **20**: 4817-4824.
- Wong, S., Morales, T.H., Neigel, J.E. und Campbell, D.A. (1993). Genomic and transcriptional linkage of the genes for calmodulin, EF-hand 5 protein and ubiquitin extension protein 52 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **13**: 207-216.
- Wu, Y., Sifri, C.D., Lei, H.H., Su, X.Z. und Wellems, T.E. (1995). Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 973-977.

- Yoshimatsu, T. und Nagawa, F. (1994). Effect of artificially inserted intron on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol* **13**: 51-58.
- Zhang, L. und Doudna, J.A. (2002). Structural insights into group II intron catalysis and branch-site selection. *Science* **295**: 2084-2088.
- Zhou, D.X., Li, Y.F., Rocipon, M. und Mache, R. (1992). Sequence-specific interaction between S1F, a spinach nuclear factor und a negative *cis*-element conserved in plastid-related genes. *J Biol Chem* **267**: 23515-23519.
- Zhuang, Y.A., Goldstein, A.M. und Weiner, A.M. (1989). UACUAAC is the preferred branch site for mammalian mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2752-2756.
- Zieler, H. und Huynh, C.Q. (2002). Intron-dependent stimulation of marker gene expression in cultured insect cells. *Insect Mol Biol* **11**: 87-95.

Danksagung

Herrn Prof. Egbert Tannich möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die großartige Betreuung meiner Arbeit, die wertvollen Anregungen sowie für seine ständige Unterstützung danken. Sein „klarer Blick“, mit dem er alle Sachverhalte durchleuchtet, war während meiner Ausbildung von unschätzbarem Wert.

Herrn Prof. Schäfer möchte ich meinen herzlichen Dank für die Begutachtung dieser Arbeit aussprechen.

Frau PD Dr. Iris Bruchhaus danke ich zutiefst für die unerschöpfliche fachliche, praktische und moralische Unterstützung, mit der sie mir stets zur Seite stand und die mich sehr motivierte.

Frau Heidrun Buss möchte ich ein großes Dankeschön dafür aussprechen, dass sie mich auf ausgezeichnete Weise in die molekularbiologischen Techniken einwies und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Britta Weseloh möchte ich herzlich für ihre enorme Hilfsbereitschaft danken.

Ina Hennings, thank you so much for your endless support and for having such a great time - keep celebrating those Fridays!

Ein riesiger Dank gebührt meinem Kollegen Felix Asche, der mir vom ersten Tag an durch Tat, Kraft und Ratschläge großartigen Beistand leistete. Ihm verdanke ich die „lebendigsten“ Momente meiner Doktorandenzeit.

Meinen (ehemaligen) Kollegen Meiki Bente, Eduardo Campos-Gongora, Simone Harder, Andreas Krüger, Kerstin Isermann, Hannelore Lotter und Martina Wiesgigl danke ich für die Unterstützung, die mir jeder auf seine Weise gewährte, und die mich sehr motivierte.

Frau Ute Bekker-Greve danke ich unendlich für ihre großartige Unterstützung.

Die Dankbarkeit, die meinem Alexander Grundl gebührt, lässt sich nicht in Worte fassen. Diese Arbeit ist nicht zuletzt durch seinen Beistand, seine unermessliche Geduld und mit Hilfe der Kraft, die ich aus seiner Anwesenheit schöpfe, entstanden.