

## 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.