
**Charakterisierung und Modulation der porenbildenden,
hämolytischen und Invasions-vermittelnden Wirkung
von Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes***

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie & Chemie
(Fachgebiet Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anke Bennert
aus Darmstadt

Gießen, 2007

angefertigt am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie des
Fachbereichs Medizin der Justus Liebig-Universität Gießen

Dekan des Fachbereichs

Biologie und Chemie: Prof. Dr. P. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Clauß

2. Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 03. Juli 2007

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> und seine medizinische Bedeutung.....	1
1.2 Listeriolysin O.....	3
1.3 Aufgabenstellung.....	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Zellkultur.....	8
2.1.1 Verwendete Zellen.....	8
2.1.2 Zellkulturbedingungen.....	8
2.2 Lösungen und Pharmaka.....	9
2.2.1 Ionenlösungen.....	9
2.2.2 Bakterielle Toxine und Überstände.....	10
2.2.3 Pharmaka und weitere Substanzen.....	13
2.3 Patch-Clamp-Messungen.....	15
2.3.1 Vorbereitung der Zellen.....	15
2.3.2 Herstellung der Patchpipetten.....	16
2.3.3 Aufbau und Versuchsdurchführung.....	16
2.3.4 Die Patch-Clamp-Konfigurationen.....	18
2.3.5 Auswertung und Liquid-Junction-Potentiale.....	19
2.4 Hämolyseversuche.....	20
2.4.1 Gewinnung und Aufbereitung der Erythrozyten.....	20
2.4.2 Versuchsansatz.....	20
2.4.3 Auswertung.....	21
2.5 Invasionsversuche.....	22
2.5.1 Vorbereitung der Zellen.....	22
2.5.2 Herstellen des Inoculums.....	22
2.5.3 Infektion.....	23
2.5.4 Entfernen nichtinvadierter Listerien.....	24
2.5.5 Gewinnung der invadierten Listerien.....	24
2.5.6 Bestimmung der Bakterienzahl.....	24
2.5.7 Auswertung.....	25
2.6 Statistik.....	25
2.7 Bezugsquellen der Lösungen und Chemikalien.....	26

3 Ergebnisse	27
3.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Zellmembran.....	27
3.1.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Membran von HEK293-Zellen....	27
3.1.2 Wirkung von Listeriolysin O auf die Membran von Immunzellen	30
3.2 Hämolytische Wirkung von Listeriolysin O.....	33
3.3 Porenschlüsse.....	35
3.3.1 Beteiligung zellulärer Komponenten	37
3.3.2 Membranverlagernder Transport.....	38
3.3.3 Caveolae-vermittelte Endozytose.....	41
3.3.4 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts	42
3.3.5 Einfluss von Ca ²⁺ -Ionen	43
3.4 Rolle der Phospholipasen C bei der Porenbildung.....	46
3.5 Thiol-Aktivierung von Listeriolysin O.....	47
3.5.1 Thiol-Aktivierung der porenbildenden Wirkung.....	47
3.5.2 Thiol-Aktivierung der hämolytischen Wirkung.....	53
3.5.3 Einfluss von Thiolen auf die Invasionsfähigkeit von <i>Listeria monocytogenes</i>	54
3.6 Einfluss von Protamin auf die Wirkung von Listeriolysin O.....	55
3.6.1 Einfluss von Protamin auf die porenbildende Wirkung.....	55
3.6.2 Einfluss von Protamin auf die hämolytische Wirkung.....	60
3.6.3 Einfluss von Protamin auf die Invasionsfähigkeit von <i>Listeria monocytogenes</i>	61
4 Diskussion	65
4.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Zellmembran	65
4.2 Hämolytische Wirkung von Listeriolysin O.....	66
4.3 Porenschlüsse.....	68
4.4 Rolle der Phospholipasen C bei der Porenbildung.....	71
4.5 Thiol-Aktivierung von Listeriolysin O.....	72
4.6 Einfluss von Protamin auf die Wirkung von Listeriolysin O.....	75
5 Zusammenfassung	78
Summary	79
6 Literaturverzeichnis	81
Anhang	89

1 Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes* und seine medizinische Bedeutung

Listerien sind grampositive, nicht-sporenbildende, stäbchenförmige Bakterien, die bei Raumtemperatur peritrich begeißelt sind (Seeliger & Jones 1986; Abbildung 1). Von insgesamt sechs Arten, in die sich die Gattung *Listeria* gliedert, ist bis auf Ausnahmefälle einzig *Listeria (L.) monocytogenes* humanpathogen. Wie *L. ivanovii* befällt *L. monocytogenes* außerdem auch Tiere, vor allem Schafe, Rinder und Nager (Rocourt & Cossart 1997, Schmid et al. 2005). Der Mensch infiziert sich in erster Linie durch Aufnahme kontaminierter Nahrung. Da *L. monocytogenes* ubiquitär vorkommt, kälte- und salztolerant ist und sich bei pH-Werten von 4,4 bis 9,4 vermehren kann, ist kaum eine Nahrungsquelle vor Kontamination geschützt (Vazquez-Boland et al. 2001, Khelef et al. 2005). Gegenüber den meisten anderen Nahrungsmittelinfektionen ist zwar die Inzidenz der Listeriose mit derzeit jährlich ca. 7 Fällen pro 1 Millionen Einwohnern sehr gering, jedoch ist die Mortalität umso höher. Selbst bei adäquater medizinischer Behandlung endet die Listeriose bei bis zu 30 % der Patienten tödlich (Khelef et al. 2005). Daher ist es wichtig, die Infektions- und Pathogenitätsmechanismen von *L. monocytogenes* besser zu verstehen.

Listeria monocytogenes verfügt über ein Repertoire an Pathogenitätsfaktoren, die den Erreger zur Invasion in verschiedenste Zelltypen und zur intrazellulären Lebensweise befähigen und ihm so das Überwinden bestimmter Schutzbarrieren im Körper wie der Intestinalbarriere, der Plazenta-Schranke und der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen (Vazquez-Boland et al. 2001).

Bei immunkompetenten Menschen führt die Aufnahme von Listerien normalerweise nicht zu einer klinisch manifesten Infektion. Bei älteren Menschen, Immunsupprimierten oder Schwangeren kann der Verzehr kontaminierter Nahrung jedoch zu einer ernsthaften Infektion, der sogenannten Listeriose führen. Gelingt es den Bakterien, die Intestinalbarriere

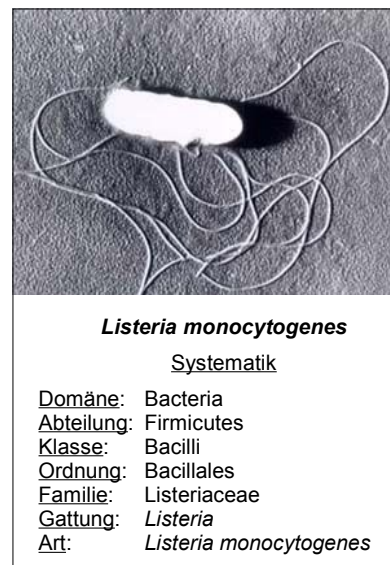


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme (aus textbookofbacteriology.net) und Systematik (nach wikipedia.de) von *Listeria monocytogenes*. Die Bakterien sind nur bei Raumtemperatur peritrich begeißelt.

zu überwinden, können sie über das Lymph- und Gefäßsystem zu den Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz gelangen, sich weiter ausbreiten und verschiedene Organe befallen. Am häufigsten sind Entzündungen des Verdauungstrakts (Gastroenteritis) und der Hirnhaut (Meningitis), wobei es meist zu einem Übergreifen auf das Gehirn kommt (Meningoenzephalitis) sowie zur Blutvergiftung (Sepsis). Bei einer Infektion von Schwangeren ist vor allem der Fötus gefährdet, wobei es zu Früh- und Totgeburten kommen kann (Vazquez-Boland et al. 2001).

Dank seiner fakultativ intrazellulären Lebensweise kann *L. monocytogenes* nicht nur zelluläre Schutzbarrieren im Körper des Wirts überwinden, sondern sich auch den extrazellulären Komponenten seines Immunsystems entziehen. Die Invasion in Wirtszellen erfolgt sowohl bei professionellen Phagozyten wie Makrophagen als auch bei nicht zum Immunsystem gehörigen Zellen über Endozytose (Abb. 2).

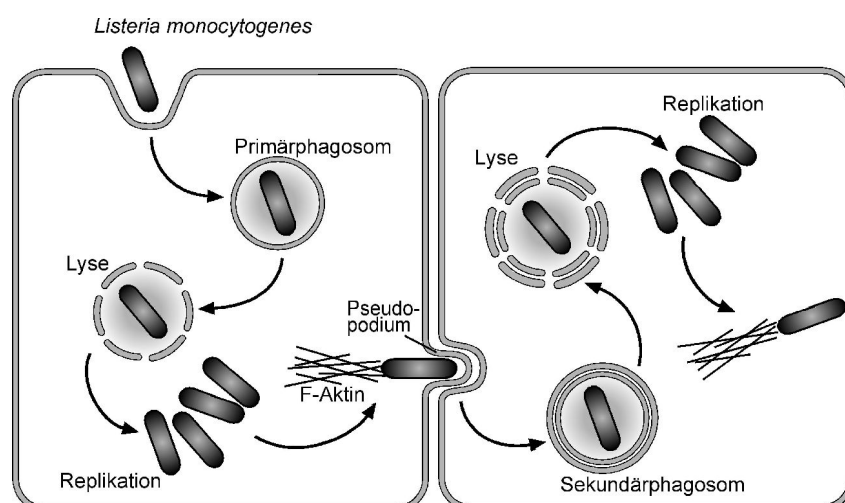


Abb. 2: Intrazellulärer Lebenszyklus von *L. monocytogenes* (verändert nach Tilney & Portnoy 1989). Erklärungen im Text.

Unmittelbar nach ihrer Aufnahme in die Zellen befinden sich die Bakterien im sogenannten Primärphagosom. Um dem Angriff durch phagosomale Komponenten zu entgehen, müssen sich die Listerien innerhalb von 30 Minuten durch Lyse der Phagosomenmembran aus diesem Kompartiment befreien (Gaillard et al. 1987, Tilney & Portnoy 1989). Gelingt dies, kann sich *L. monocytogenes* im Zytoplasma vermehren und mit Hilfe von Aktinschweifen, die es aus den Aktinmolekülen der Wirtszelle bildet, fortbewegen. Stoßen die Bakterien dabei auf die Zellmembran, bilden sich Pseudopodien, die sich in benachbarte Zellen hineinstülpen können. In diesen Fällen kommt es zu einem sogenannten „Cell-to-cell spread“ (Dramsi et al. 1998, Gedde et al. 2000), einem Ausbreiten der Listerien von Zelle zu Zelle,

indem das Pseudopodium mitsamt dem Bakterium von der neuen Wirtszelle phagozytiert wird. Durch diesen Verbreitungsmechanismus entzieht sich *L. monocytogenes* der extrazellulären Immunreaktion. Nach einem „Cell-to-cell spread“ müssen sich die Bakterien aus dem sogenannten Sekundärphagosom, das von zwei Membranen begrenzt wird, befreien und der Zyklus kann von neuem beginnen.

L. monocytogenes verdankt diesen besonderen Infektionsmechanismus einer Reihe von Pathogenitätsfaktoren, die in einem chromosomalen Virulenz-Gencluster von fast 9 kb codiert sind. Zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren zählen die Internaline InlA und InlB, die an der Bakterienoberfläche verankert sind und die Invasion in Zellen vermitteln, die normalerweise keine Fremdorganismen phagozytieren (Gaillard et al. 1991). Der Aktin-Akkumulationsfaktor ActA ermöglicht es den bei Körpertemperatur unbegeißelten Bakterien, Aktin-Filamente der Wirtszelle zu einem Aktinschweif zu arrangieren und sich mit diesen intrazellulär fortzubewegen (Tilney & Portnoy 1989).

Allen Pathogenitätsfaktoren voran steht jedoch das Protein Listeriolysin O (LLO), das die Lyse der Phagosomenmembranen vermittelt. Während die Befreiung aus dem Primärphagosom in bestimmten Zelltypen in reduziertem Maße auch ohne LLO gelingt (Marquis et al. 1995, Grundling et al. 2003), ist LLO für die Befreiung aus dem Sekundärphagosom essentiell (Gedde et al. 2000) und damit entscheidend für die Virulenz.

1.2 Listeriolysin O

Listeriolysin O (LLO) ist der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes*. LLO-defiziente Stämme sind nicht virulent und werden vom infizierten Wirt sogar eliminiert, ohne eine Immunantwort induziert zu haben. Werden dagegen nicht-pathogene Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *L. innocua* mit LLO ausgestattet, werden sie in die Lage versetzt, sich nach der Phagozytose aus dem Phagosom zu befreien, ins Zytoplasma vorzudringen und sich dort zu vermehren, wozu sie normalerweise nicht fähig sind (Bielecki et al. 1990)

Seit über 40 Jahren wird LLO als Hämo-/Zytolysin eingestuft (Girard et al. 1963, Njoku-Obi et al. 1963, Jenkins et al. 1964). Ein direkter Nachweis seiner porenbildenden Wirkung gelang jedoch erst kürzlich mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Repp et al. 2002). Listeriolysin gehört zur großen Familie der cholesterolabhängigen Zytolysine (CDC = cholesterol dependent cytolysin), die bisher 23 verschiedene Mitglieder mit Molekulargewichten zwischen 47 und 60 kDa umfasst (Billington et al. 2000). Die

einkettigen Polypeptide werden allesamt von grampositiven Bakterien gebildet, lysieren unter Bildung oligomerer Poren cholesterolhaltige Membranen und sind durch eine tryptophanreiche, 11 Basenpaare lange Konsensussequenz, das sogenannte Undecapeptid, charakterisiert.

Da die zytolytische Aktivität der meisten CDCs durch Thiole und andere reduzierende Agenzien verstärkt wird, wurden diese Toxine früher als „thiol-activated cytolysins“ bezeichnet (Billington et al. 1999). Verantwortlich für diese Eigenschaft ist der hochkonservierte Cysteinrest innerhalb des Undecapeptids. Dieser stellt bei 20 der 23 bisher bekannten CDCs den einzigen Cysteinrest in der gesamten Aminosäuresequenz dar. Während Intermedilysin aus *Streptococcus intermedius* und Pyolysin aus *Arcanobacterium pyogenes* als einzige Vertreter kein Cystein besitzen und auch keine Thiol-Aktivierbarkeit aufweisen (Nagamune et al. 1996, Billington et al. 1997), ist Ivanovilysin aus *L. ivanovii* das einzige Mitglied mit einem weiteren Cysteinrest außerhalb des Undecapeptids. Der genaue Mechanismus und die biologische Bedeutung der Thiol-Aktivierbarkeit sind bisher nicht geklärt. Einerseits wird dem Phänomen bisher keine hohe Relevanz zugeordnet, da CDCs auch in Abwesenheit von Thiolen hämolytisch aktiv sind (Billington et al. 1997). Andererseits weist die starke Konservierung des verantwortlichen Cysteins auf einen möglichen Selektionsvorteil hin.

Bisher ist lediglich von Perfringolysin (PFO) aus *Clostridium perfringens* die monomere, dreidimensionale Struktur aufgeklärt worden (Abb. 3). Perfringolysin gilt daher als Prototyp der CDCs. Das Molekül besitzt vier Domänen, die in erster Linie aus β -Faltblättern bestehen. Die genauen Funktionen der einzelnen Domänen bei der Porenbildung sind bisher nur teilweise erforscht. Für die Membranbindung ist die C-terminale Domäne 4 verantwortlich, in der sich das stark konservierte Undecapeptid mit der Sequenz 458 ECTGLAWEWWR 468 befindet. Die beiden Tryptophanreste an Position 464 und 467 sind essentiell für die hämolytische Aktivität von PFO.

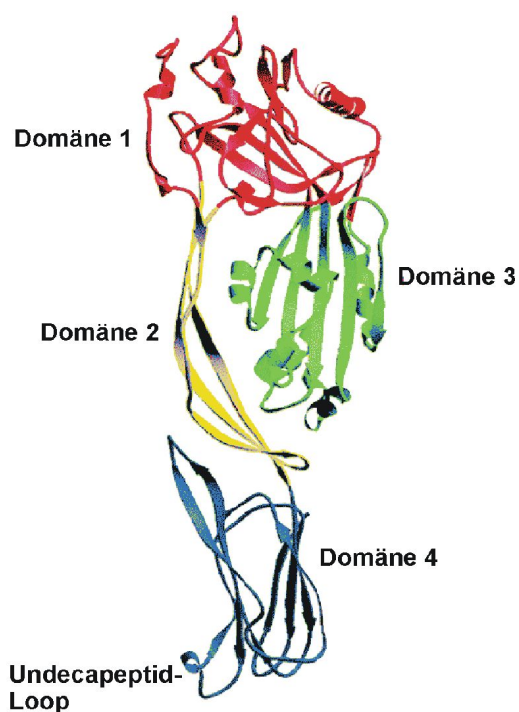


Abb. 3: 3D-Struktur von Perfringolysin aus *Clostridium perfringens* (verändert nach Rossjohn et al. 1997). Erklärungen im Text.

Lange Zeit ging man davon aus, dass Cholesterol den Rezeptor für CDCs darstellt und dass das Undecapeptid diese Bindung vermittelt. Zwar ist Cholesterol essentiell für die zytolytische Aktivität, eine Interaktion mit dem Undecapeptid konnte bisher jedoch nicht überzeugend nachgewiesen werden (Palmer 2001). Neuere Arbeiten weisen eher auf eine Funktion des Cholesterols bei der Oligomerisierung (Jacobs et al. 1998) bzw. der Membraninsertion (Giddings et al. 2003) hin. Man geht davon aus, dass sich die Monomere nach der Bindung, bei der es nur zu einer geringen Insertion der LLO-Moleküle in die Membran kommt, durch laterale Diffusion zu Oligomeren zusammenlagern können (Abb. 4).

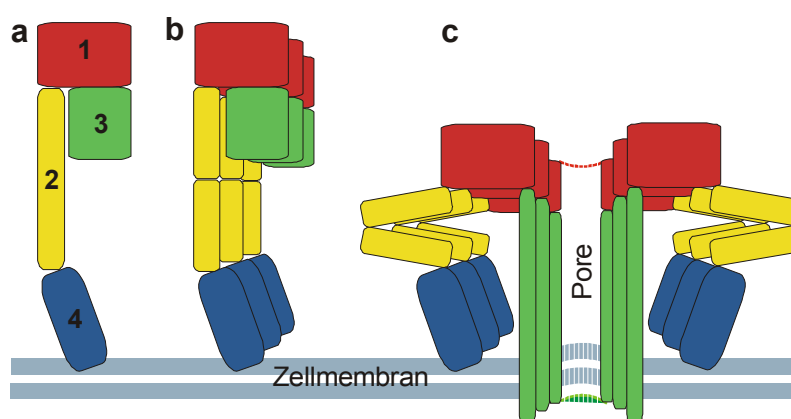


Abb. 4: Schematische Darstellung der Porenbildung durch ein cholesterolabhängiges Zytolysin. Die Zahlen kennzeichnen die Domänen 1-4. Das Monomer bindet mit Domäne 4 an die Zellmembran (a) und lagert sich mit anderen Monomeren zusammen (b). Durch Konformationsänderungen können die Domänen 3 die Zellmembran vollkommen durchdringen und zusammen die innere Wand der Pore bilden. Hier sind nur 6 Monomere angedeutet. Abbildung verändert nach Tilley et al. 2005.

Die Domänen 1 und 3 sind maßgeblich an der Oligomerisierung beteiligt. Zunächst bildet sich eine Art Vorläuferpore, die erst noch tiefer in die Membran eindringen muss. Um weiter zu inserieren, ist eine Konformationsänderung notwendig, bei der die Domäne 2 destabilisiert wird und ihren Kontakt zu Domäne 3 verliert. Sechs kurze α -Helices aus Domäne 3 formen sich zu zwei β -Haarnadel-Strukturen um (TMH = transmembrane hairpin 1 und 2) und können durch Einknicken der Domäne 2 in die Membran eindringen. Im Oligomer bilden sie zusammen eine große sogenannte „ β -Barrel“, die die Membran durchspannt und die innere Wand der funktionellen Pore darstellt (Czajkowsky et al. 2004, Tilley et al. 2005).

Die beschriebenen Erkenntnisse um die Bildung und Insertion oligomerer Membranporen durch CDCs stützen sich auf Untersuchungen von Perfringolysin- und Pneumolysin-Poren

mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Techniken. Die untersuchten Pneumolysin-Poren bestehen aus 30-50 Monomeren und besitzen einen Innendurchmesser von 32-43 nm (Tilley et al. 2005). Für die Bildung dieser Poren wurden jedoch etwa um drei Zehnerpotenzen höhere CDC-Konzentrationen eingesetzt als für die elektrophysiologische Untersuchung von LLO-Poren in der vorliegenden Arbeit. Der derzeitige Kenntnisstand um die Oligomerisierung und Insertion von Perfringolysin und Pneumolysin läßt sich daher nicht zwangsläufig auf die in dieser Arbeit mittels der Patch-Clamp-Technik untersuchten LLO-Poren übertragen.

Der direkte elektrophysiologische Nachweis von LLO-Poren deckte auf, dass das Toxin keine einfachen, kontinuierlich vorhandenen Löcher in der Membran bildet, sondern dass es auch zu Porenschlüssen kommt (Repp et al. 2002). Bei sublytischen Konzentrationen besteht ein Gleichgewicht zwischen Porenbildungen und -schlüssen. Der Mechanismus der Porenschlüsse ist bisher unklar.

LLO ist vor allem für die Befreiung von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom wichtig. Diese Funktion wird durch das saure pH-Optimum seiner lytischen Wirkung gefördert. In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, dass LLO auch bereits in sublytischen Konzentrationen verschiedene zelluläre Reaktionen induziert (Pizarro-Cerda & Cossart 2006). Dazu gehört z.B. die Stimulation des MAP-Kinase-Weges (Tang et al. 1996), die Induktion der Expression von Zytokinen (Nishibori et al. 1996) und Adhäsionsfaktoren (Kayal et al. 1999), die Stimulation der Mucin-Exozytose in Intestinalzellen (Coconnier et al. 2000) und die Induktion der Apoptose in Lymphozyten (Carrero et al. 2004). Die meisten dieser Effekte werden vermutlich durch Ca^{2+} -Ionen vermittelt (Billington et al. 2000, Khelef et al. 2005), die durch LLO-Poren in die Wirtszelle eindringen (Repp et al. 2002). Die Kenntnis der Poren-Eigenschaften ist daher wichtig für das Verständnis der Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und der Wirtszelle.

Bei der Befreiung aus dem Phagosom sind neben LLO auch die beiden listeriellen Phospholipasen C involviert. *L. monocytogenes* exprimiert zwei verschiedene Enzyme dieser Klasse: Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) und die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC). Beide unterstützen LLO bei der Befreiung der Listerien aus dem Phagosom, spielen jedoch in verschiedenen Infektionsstadien eine Rolle: Die Befreiung aus dem Primärphagosom nach der initialen Invasion wird von der PI-PLC beeinflusst, die wie LLO aktiv sezerniert wird (Smith et al.

1995, Poussin & Goldfine 2005). Nach einem „Cell-to-cell spread“ wird die Befreiung aus dem Sekundärphagosom durch die PC-PLC gefördert (Vazquez-Boland et al. 1992, Schlüter et al. 1998), die von *L. monocytogenes* als Pro-Enzym sezerniert und erst durch die ebenfalls sezernierte listerielle Metalloprotease oder spezifische Wirtsfaktoren aktiviert wird (Schlüter et al. 1998, Yeung et al. 2005). Bisher ist unklar, auf welche Weise die Phospholipasen die LLO-vermittelte Lyse des primären und sekundären Phagosoms unterstützen. Sowohl eine eigenständige Destabilisierung oder Permeabilisierung der Zellmembran als auch eine Verstärkung der Lyse durch die Stimulation intrazellulärer Signalwege kommt in Frage.

1.3 Aufgabenstellung

Da LLO-Poren die Basis vieler zellulärer Effekte im Zuge einer Listerieninfektion bilden, ist es wichtig, den Prozess der Porenbildung besser zu verstehen. Ziel der Arbeit war zunächst die Identifikation wichtiger Eigenschaften von LLO-Poren. Es sollte geklärt werden, ob bei der Porenbildung ein Synergismus zwischen LLO und den listeriellen Phospholipasen C besteht. Für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Listerien und Wirtszellen war die Frage wichtig, wie sich das Schließen von LLO-Poren erklären lässt. Daher galt es zu klären, ob Porenschlüsse auf Veränderungen der Pore selbst und/ oder auf Mechanismen der Wirtszelle beruhen.

Ein weiterer Schwerpunkt bestand in der Modulation der LLO-Poren durch endogene und exogene Substanzen. Hierbei sollte sowohl eine Aktivierbarkeit durch Thiole als auch eine Hemmbarkeit durch Protamin getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die LLO-Wirkung zum einen durch die Untersuchung der Porenbildung durch sublytische Toxin-Konzentrationen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten Hämolyseversuche durchgeführt werden, um Aufschluss über die Kopplung porenbildender und hämolytischer Wirkung zu erlangen und die Vor- und Nachteile beider Methoden zur Untersuchung von LLO-Effekten zu beurteilen. Invasionsversuche sollten klären, inwiefern sich das Eindringen von *L. monocytogenes* in Wirtszellen durch Manipulation der LLO-Poren beeinflussen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zellen

- Für Patch-Clamp-Experimente wurden in erster Linie humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen = human embrionic kidney cells) benutzt. HEK293-Zellen eignen sich gut für die Untersuchung von Membranporen, da sie geringe endogene Ionenkanalaktivitäten aufweisen. Außerdem kamen Maus-Mikroglia-Zellen (BV-2-Zellen), murine Neuroblastom-Zellen (Neuro-2a-Zellen) sowie humane Erythrozyten zum Einsatz, deren jeweilige Besonderheiten zur Bearbeitung spezieller Fragestellungen genutzt wurden. Aufgrund ihres größeren Durchmessers sind menschliche Erythrozyten für Patch-Clamp-Experimente besser geeignet als Schafserythrozyten.
- Bei Hämolyseversuchen hingegen wurden wegen der besseren Verfügbarkeit Schafserythrozyten verwendet. Humane Erythrozyten wurden hier nur einmalig zum Vergleich benutzt.
- Die Invasion von *L. monocytogenes* in Säugerzellen wurde an humanen Larynxkarzinomzellen (HEp2-Zellen) untersucht, da die Bakterien bei diesem Zelltyp eine relativ hohe Invasionsrate aufweisen. Sie wurden uns von Prof. Domann (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Zellkulturbedingungen

HEK293-Zellen wurden in einer 1:1 (v/v)-Mischung aus Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) und Ham's F12-Medium kultiviert, die mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin versetzt wurde.

BV-2-Zellen und Neuro-2a-Zellen wurden in DMEM mit 5 % neonatalem Kälberserum (NKS), 2 mM Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert.

HEp2-Zellen wurden in MEM (Minimal Essential Medium) mit Earle's Salzen und 2 mM L-Glutamin kultiviert, das zusätzlich mit 10 % (v/v) FKS und 1 % NEA (v/v) (non essential aminoacids) versetzt worden war.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem Zellkultur-Inkubator (CO₂-Inkubator 6220, Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte. Die Atmosphäre bestand aus 94 % Luft- und 6 % CO₂-Anteil. Es wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 94 mm verwendet. Das Zellkultur-Medium (10 ml) wurde jeden dritten Tag gewechselt. Wenn der Schalenboden dicht mit Zellen bedeckt war, wurden die Zellen zum Passagieren zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS = phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH = 7,4) gewaschen und anschließend mit 5 ml trypsinhaltigem (0,05 % w/v) PBS behandelt. Sobald man unter dem Lichtmikroskop eine deutliche Abrundung der Zellen sah, wurde die Trypsinlösung abgesaugt. Die nun nur noch schwach adhärenen Zellen wurden mit 10 ml frischem Kulturmedium abgespült und durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette weitestgehend vereinzelt, um sie schließlich in neue Petrischalen mit bereits vorgelegtem Kulturmedium zu überführen. Hierbei wurde je nach Bedarf eine Verdünnung von 1:5 bis 1:20 vorgenommen. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurden die neuen Petrischalen vorsichtig geschwenkt.

Die Vorbereitung der jeweiligen Zellen für die verschiedenen Experimente ist in den Abschnitten 2.3 bis 2.7 beschrieben.

2.2 Lösungen und Pharmaka

2.2.1 Ionenlösungen

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Zusammensetzung der in verschiedenen Versuchen verwendeten Extrazellulärlösungen (E), sowie der Intrazellulärlösungen (I) für die Patch-Clamp-Experimente. Die Ionenkonzentrationen richten sich nach den physiologischen Begebenheiten im intakten Organismus. Sie wurden allerdings bei Bedarf für bestimmte Fragestellungen modifiziert. So wurde bei E_{Ca²⁺-frei}-Lösung durch das Fehlen von CaCl₂ und den Zusatz des Ca²⁺-Chelators EGTA eine freie Ca²⁺-Konzentration von Null erzielt.

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Extrazellulärlösungen (in mM)

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	EGTA	Glucose	HEPES
E1	140	3	2	2	-	15	10
E_{Ca²⁺-frei}	140	3	2	-	1	15	10

Die Extrazellulärlösungen wurden mit ca. 4 mM NaOH auf einen physiologischen pH-Wert von 7,35 eingestellt.

Auch die Intrazellulärlösungen I_0 und $I_{Ca^{2+}\text{-frei}}$ enthielten keine freien Ca^{2+} -Ionen. Während jedoch die $I_{Ca^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung mit 10 mM BAPTA „stark“ Ca^{2+} -gepuffert war, wurde in der I_0 -Lösung nur „schwach“ gepuffert, so dass sich die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration zum Beispiel durch einen Ca^{2+} -Einstrom von außen erhöhen konnte.

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Intrazellulärlösungen für Patch-Clamp-Experimente (in mM, soweit nicht anders angegeben)

	$[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$	KGlut	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	HEPES
Istandard	100 nM	140	20	2	29,69 μ M	0,1	10
I_0	-	140	20	2	-	0,1	10
$I_{Ca^{2+}\text{-frei}}$	-	140	20	2	-	10	10

Die Istandard-Lösung und die I_0 -Lösung wurden mit ca. 0,3 mM, die $I_{Ca^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung mit etwa 4,5 mM KOH auf einen pH-Wert von 7,30 eingestellt. (KGlut = Kaliumglutamat).

Die pH-Werte aller Ionenlösungen wurden mit Hilfe eines pH-Meters (Valimatic 761, Knick, Berlin) eingestellt und die Osmolalitäten mit dem Osmomat 030 der Firma Gonotec (Berlin) kontrolliert. Die Werte lagen bei 300 bis 308 mOsmol/kg für Extrazellulärlösungen bzw. 304 bis 342 mOsmol/kg für Intrazellulärlösungen. Lag die Osmolalität der Intrazellulärlösung deutlich höher als die der Extrazellulärlösung, bestand die Gefahr der Aktivierung von sogenannten stretch-activated cation channels (SACs) infolge eines osmotisch bedingten Anschwellens der Zelle. Um derartige Störungen zu vermeiden, wurde die Osmolalität der Extrazellulärlösung gegebenenfalls mit Sorbitol erhöht. Sorbitol selber beeinflusste die elektrophysiologischen Eigenschaften der gemessenen Zellen nicht.

2.2.2 Bakterielle Toxine und Überstände

Listeriolysin (LLO) ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes*, der von den Bakterien aktiv in die Umgebung sezerniert wird. Für die Untersuchung von LLO konnte daher ein Kulturüberstand der Listerien verwendet werden, der die sezernierten Substanzen und damit auch LLO enthielt. Die Herstellung dieses Überstands wird weiter unten beschrieben.

Folgende Listerienstämme, die wir vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erhielten, kamen zum Einsatz:

***L. monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a** (Glaser et al. 2001). Dieser Wildtyp-Stamm wird abgekürzt mit „*L.m.*“ bezeichnet.

L. monocytogenes* EGD-e Δ *hly

Diesem Stamm fehlt das für LLO codierende *hly*-Gen. Im folgenden wird der Stamm mit „*L.m.* Δ *hly*“ abgekürzt.

L. monocytogenes* EGD-e Δ *plcAplcB

Bei diesem Stamm wurden die für die beiden Phospholipasen C codierenden Abschnitte im *plcA-prfA*-Operon (*plcA*) bzw. im Lecithinase-Operon (*plcB*) deletiert. Der Stamm wird im folgenden vereinfacht „*L.m.* Δ *plcAplcB*“ genannt.

Alle Bakterienstämme wurden bei 4 °C auf Kulturplatten mit einem Durchmesser von 94 mm gehalten. Der Nährboden bestand aus 10 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) und 1,5 % Agar-Agar. Zum Schutz vor Kodenswasser wurde der Deckel der Kulturplatten mit Parafilm® abgedichtet. Wenn die Einzelkolonien zu verschmelzen begannen, wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse neu ausgestrichen und dabei verdünnt. Danach wurden die frisch angeimpften Kulturplatten für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

Gewinnung bakterienfreier Kulturüberstände

Zur Gewinnung bakterienfreier Überstände wurde zunächst eine „Übernacht-Kultur“ der Listerien in BHI-Flüssigmedium angelegt, um eine standardisierte Bakteriendichte zu erreichen. Dazu wurden zwei mittelgroße Kolonien mit einer ausgeglühten Impföse von der Kulturplatte in einen sterilen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt, der mit 20 ml BHI-Medium beschickt worden war. Der Kolben wurde mit einem sterilen Papierstopfen verschlossen und die Bakteriensuspension über Nacht in einem Schüttelinkubator (HT Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Um die Bakterien in die exponentielle Wachstumsphase zu überführen, in der sie verstärkt LLO sezernieren, wurde der Übernacht-Kultur am nächsten Morgen 20 ml frisches BHI-Medium zugefügt und die Kultur für weitere drei Stunden im Schüttelinkubator inkubiert („3 h-Kultur“). Um eine einheitliche Konzentration von Bakterien zu gewährleisten, wurde die Optische Dichte (OD) der Kultur danach auf 2,0 eingestellt. Die Messung der OD erfolgte im Spektrophotometer Biochrom 4060 (Pharmacia Biochrom Ltd, Cambridge, England) bei 650 nm und 1 cm Schichtdicke gegen BHI-Medium.

Da das BHI-Medium neben den aktiv sezernierten Stoffen noch viele weitere Inhaltsstoffe enthält, die Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnten, war es zur Toxingewinnung nötig, die Bakterien in Extrazellulärlösung (Abschnitt 2.2.1, Tab. 1) mit 0,5 % FAF-BSA (= fatty acid-free bovine serum albumine, fettsäurefreies Rinderserumalbumin) zu überführen. FAF-BSA diente dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und sollte auf diese Weise die unspezifische Bindung von LLO an den Wänden des Reaktionsgefäßes vermindern. Um die Listerien zu überführen, wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 4 °C und 4800 rpm zentrifugiert (Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet nach dreimaligem Waschen mit Extrazellulärlösung in 10 ml Extrazellulärlösung mit 0,5 % FAF-BSA resuspendiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator. Zur Entfernung der Bakterien wurde nochmals für 5 Minuten bei 4800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der nun alle sezernierten Komponenten enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und durch einen 0,2 µm Sterilfilter (Renner GmbH, Dannstadt) filtriert. Anschließend wurde er auf Eis zu je 500 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, lyophilisiert (GT2-Lyophilisator, Leybold-Heraeus GmbH, Hanau) und bei -20 °C gelagert. Das Lyophilisat wurde vor dem Experiment wieder in 500 µl aqua bidest gelöst und je nach Bedarf weiter in Extrazellulärlösung mit 0,5 % FAF-BSA verdünnt.

Bei den so gewonnen Überständen ist zu beachten, dass sie neben LLO und den listeriellen Phospholipasen C weitere, sezernierte Proteinkomponenten der Listerien enthielten. Die genaue LLO-Konzentration im Überstand war daher nicht durch eine Proteinbestimmung zu ermitteln, so dass bei den jeweiligen Experimenten nur Angaben zum Verdünnungsfaktor des Überstands gemacht werden konnten.

Gereinigtes Toxin

Zur Absicherung, dass die mit Überstand gemachten Beobachtungen tatsächlich auf LLO zurückzuführen waren, wurde uns von Prof. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) für Kontrollexperimente gereinigtes LLO zur Verfügung gestellt. Gereinigtes LLO kam außerdem dann zum Einsatz, wenn in den Experimenten die genaue Kenntnis der LLO-Konzentration erforderlich war. Die Gewinnung von LLO erfolgte wie bei Darji et al. (1995) beschrieben. Da hierbei sezerniertes LLO aufgereinigt wurde, fehlt wie auch im Überstand, die 25 AS lange N-terminale Signalsequenz, die man beim „rohen“ LLO-Molekül vorfindet (Mengaud et al. 1988). Das Toxin besitzt dadurch eine molare Masse von 56 kDa. Die Stocklösung hatte eine LLO-Konzentration von 273 µg/ml in PBS und wurde bei -80°C gelagert. Die Verdünnung

von gereinigtem LLO und den bakterienfreien Überständen erfolgte stets in Extrazellulärlösung mit 0,5 % (w/v) FAF-BSA. Die Verdünnungen wurden bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

Neben LLO wurde in einigen Versuchen auch das α -Hämolysin (α -Hly) aus *Escherichia coli* verwendet. Dieses Toxin wurde uns von Dr. Walev (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt und gilt als Prototyp der ebenfalls porenbildenden Familie der sogenannten RTX-Toxine (repeats in toxin). Die α -Hly-Stocklösung hatte eine Konzentration von 0,15 mg/ml, war in 8 M Guanidin gelöst und wurde bei -20 °C gelagert. Vor den Experimenten wurde das Toxin zunächst mit 8 M Guanidin auf 50 μ g/ml und schließlich mit E1-Lösung und 0,5 % FAF-BSA (w/v) auf 1 μ g/ml verdünnt. Die Lagerung bis unmittelbar vor der Applikation erfolgte dann bei 4 °C.

2.2.3 Pharmaka und weitere Substanzen

L-Cystein und N-Acetyl-Cystein (NAC) gehören zur Klasse der Thiole. Wie alle Thiole zeichnen sich jeweils durch eine freie Schwefelwasserstoffgruppe (Thiolgruppe) aus (Abb. 5), auf die ihre reduzierende Wirkung zurückzuführen ist.

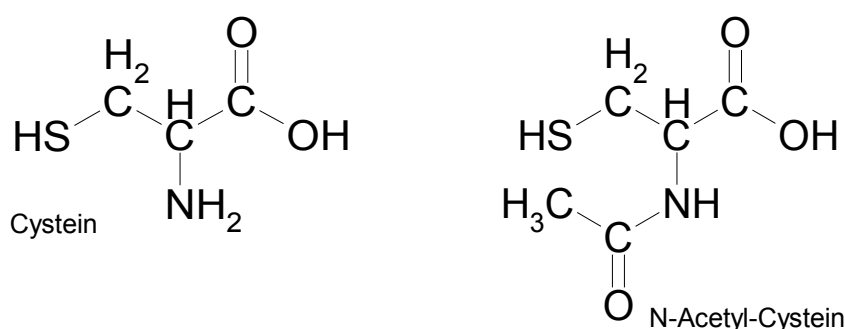


Abb. 5: Strukturformeln der verwendeten Thiole L-Cystein und N-Acetyl-Cystein (NAC)

L-Cystein ist die einzige Aminosäure mit einer freien Thiolgruppe und besitzt ein Molekulargewicht von 121,2 g/mol. In Proteinen trägt L-Cystein zur Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur bei. L-Cystein ist außerdem am Katalysemechanismus zahlreicher Enzyme beteiligt. NAC ist ein häufig verwendetes Pharmakon mit einer Molmasse von 163,2 g/mol. Rezeptfrei erhältlich wird es in erster Linie als Schleimlöser (Mukolytikum) bei Husten eingenommen, obwohl eine solche Wirkung in klinischen Studien bisher nicht belegt werden konnte (Gillissen 2006). Wichtig ist seine Anwendung als Antidot bei einer Paracetamol-Intoxikation.

Protamin ist ein peptidisches Polykation mit einem Molekulargewicht von 4-5 kDa (Becker 1961). Zwanzig seiner 31 Aminosäurereste werden durch Arginin dargestellt. In der Medizin wird es als Heparin-Antidot und zur Herstellung von NPH-Verzögerungsinsulin (Neutral-Protamin-Hagedorn-Insulin) verwendet. In der Nahrungsmittelindustrie findet Protamin als sogenanntes „Cationic Antimicrobial Peptide“ (CAP) bei der Konservierung von kohlenhydratreichen Produkten Verwendung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Protamin Grade IV und Protaminsulfat verwendet, die jeweils aus Lachssperma gewonnen wurden. Zur Konzentrationsberechnung wurde ein Molekulargewicht von 4500 g/mol angenommen.

Charybdotoxin ist ein Skorpiongift, welches in dieser Arbeit zum Blockieren von Ca^{2+} -abhängigen, spannungsunabhängigen K^{+} -Kanälen in BV-2-Zellen benutzt wurde.

Cytochalasin D ist ein Antibiotikum, das von verschiedenen Pilzspezies gebildet wird. Die membrangängige Substanz findet in der Forschung häufig Anwendung bei Untersuchungen zur Funktion des Zytoskeletts. Cytochalasin D bindet an freie Enden von Aktinfilamenten, wodurch sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation von Aktin-Monomeren inhibiert wird (Cooper 1987). Das in dieser Arbeit verwendete Cytochalasin D stammt von *Zygosporium mansonii*.

BAPTA (1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetysäure) diente als Ca^{2+} -Chelator für Intrazellulärlösungen (Abschnitt 2.2.1) und besitzt ein Molekulargewicht von 476,4 g/mol.

EGTA (Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-cetylsäure) bildet Chelat-Komplexe mit mono-, di- und trivalenten Kationen, wobei die Bildung von Ca^{2+} -Komplexen besonders begünstigt wird. Der Chelator wurde in einer Konzentration von 1 mM zum Binden von freien Ca^{2+} -Ionen bei der Herstellung von $\text{E}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung eingesetzt (Abschnitt 2.2.1).

FAF-BSA (fatty acid-free bovine serum albumine) wurde in Stocklösungen von LLO und Protamin standardmäßig in 0,5 %-iger Konzentration eingesetzt, um deren unspezifische Bindung an die Wandungen von Reaktionsgefäßen und Messkammern zu vermindern. Fettlösliche Substanzen und Fettsäuren sind im Blut hauptsächlich an Albumin gekoppelt. Da jedoch in BSA enthaltene freie Fettsäuren eigene Effekte auf Ionenkanäle haben können,

wurde zur Herstellung der Stocklösungen von LLO und Protamin fettsäurefreies Rinderserumalbumin verwendet. Die Endkonzentration des FAF-BSA in den jeweiligen Versuchen lag bei 0,025 %.

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) diente als Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Ionenlösungen (Abschnitt 2.2.1). Das Puffer-Optimum von HEPES liegt bei pH 6,8 -8,2 (pK 7,5). HEPES hat ein Molekulargewicht von 238,3 g/mol.

TRITON® X-100 ist ein Detergens, das die Lipidkomponenten von Zellmembranen angreift. In Invasionsversuchen (Abschnitt 2.5) wurde es als 0,2 %-ige Lösung (v/v) zum Zellaufschluss eingesetzt.

2.3 Patch-Clamp-Messungen

2.3.1 Vorbereitung der Zellen

In den Patch-Clamp-Experimenten dienten Petrischalen mit 35 mm Durchmesser als Messkammern. Mit Ausnahme der Erythrozyten wurden die Zellen 16 bis 28 Stunden vor Versuchsbeginn in geringer Dichte in 2 ml Kulturmedium ausgesät, um die Versuche während der Wachstumsphase der Zellen durchführen zu können und das Auftreten wachstumsgehemmter oder apoptotischer Zellen zu vermeiden. Zum Zeitpunkt der Messung betrug die Zellzahl etwa $4\text{-}5 \times 10^5$ Zellen pro Schale. Vor der Messung wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden 3-5 mal mit E1-Lösung (siehe Abschnitt 2.2.1) gewaschen und die Messkammer mit 2 ml E1-Lösung gefüllt. Nach etwa 10 Minuten war die Badtemperatur von 21 °C erreicht und es wurde mit den Messungen begonnen. Gemessen wurden ausschließlich Zellen, die keinen Kontakt zu Nachbarzellen hatten und eine für die jeweilige Zelllinie typische Größe und Form besaßen.

Die für Patch-Clamp-Messungen verwendeten humanen Erythrozyten wurden am Tag der Messung aus frischem Blut von mir und einer weiteren Probandin isoliert. Durch einen Stich mit einer sterilen Einwegkanüle (0,45 x 23 mm) wurden 2-3 Tropfen Blut aus einer Fingerkuppe gewonnen und sofort in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl E1-Lösung überführt. Durch eine dreiminütige Zentrifugation in einer Heraeus Biofuge 15 (Heraeus, Hanau) bei 300 rpm (= 714 g) wurden die Erythrozyten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Erythrozyten wurden in 500 µl E1-Lösung resuspendiert. Es folgten 2-3

weitere Waschschritte, bis der Überstand vollkommen klar war. Zur Messung wurde ein Tropfen der Erythrozytensuspension in eine Petrischalen mit 35 mm Durchmesser mit 2 ml Extrazellulärlösung gegeben.

2.3.2 Herstellung der Patchpipetten

Verwendet wurden Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament, einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,87 mm (Hilgenberg GmbH, Malsfeld). Diese wurden mit einem Horizontal-Puller (Flaming Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato, Kalifornien, USA) in mehreren Stufen gezogen. Die Spitzen wurden mit Hilfe einer CPZ101 Pipette Forge (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert. Vor der Messung wurden die Patchpipetten mit 12 μ l Intrazellulärlösung befüllt, so dass die Spitze der chlorierten Messelektroden spitze nach dem Einspannen der Patchpipette in die Halterung in die Lösung ragte. Verwendet wurden nur Patchpipetten mit einem elektrischen Widerstand von 5 - 12 M Ω . Eine Ausnahme bildeten Patch-Clamp-Experimente an Erythrozyten, in denen höherohmige Pipetten (20-50 M Ω) verwendet wurden.

2.3.3 Aufbau und Versuchsdurchführung

Um die empfindliche Messapparatur vor elektrischen Störungen zu schützen, befand sich der gesamte Versuchsaufbau in einem Faraday'schen Käfig. Lediglich der Computer und der Hauptverstärker (EPC-9, HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) mit integriertem Interface (ITC-16) sowie das Bedienelement zur Temperaturkontrolle waren außerhalb des Käfigs untergebracht. Zum Schutz vor Erschütterungen waren Messkammer und Mikromanipulatoren auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert.

Die 35 mm-Petrischalen wurden mit Hilfe einer Halterung im Strahlengang eines Invertmikroskops (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen) fixiert. Dies ermöglichte bei 320-facher Vergrößerung ein gezieltes Heranfahren der Patchpipetten an die Zellen und die optische Kontrolle der Zellen während der Messung. Mit Hilfe eines in der Messkammer-Halterung befindlichen Peltierelements wurde die Badtemperatur konstant auf 21 °C gehalten (Temperature Control System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). Die Temperaturkontrolle erfolgte über einen Temperaturregler, dessen Fühler direkt an der Messkammer platziert war. Die Kühlung des Peltierelements erfolgte durch ein externes

Flüssigkühlsystem (Thermal Aquarius III, Thermaltake Germany GmbH, Norderstedt).

In der Messkammer befanden sich eine Badelektrode aus chloriertem Feinsilberdraht und die Patchpipette, bestehend aus einem ebenfalls chlorierten Feinsilberdraht (der Messelektrode) in einer Borosilikat-Glaskapillare. Die Patchpipette war an einem elektromechanisch betriebenen Mikromanipulator (NCL-3, Lang GmbH, Hüttenberg) befestigt, der mittels eines Joysticks fein reguliert werden konnte und ein vorsichtiges Aufsetzen der Pipette auf die Zellen ermöglichte. Des Weiteren war die Patchpipette über Polyethylenschläuche und ein U-Manometer mit einer 50 ml-Kolbenspritze verbunden. Auf diese Weise konnte Über- und Unterdruck von bis zu 0,1 bar appliziert werden. Überdruck verhinderte das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Patchpipette beim Annähern an die Zelle. Unterdruck wurde zum Erleichtern eines G Ω -Seals und zum Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (Abschnitt 2.3.4) genutzt. Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau des Messstandes.

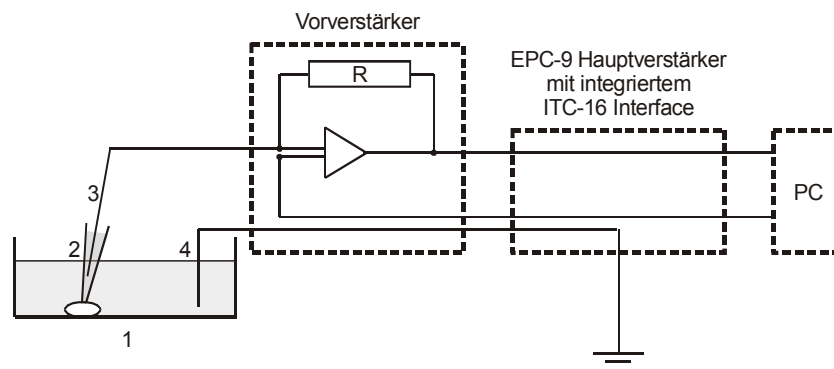


Abb. 6: Schematischer Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes. Die in der Badlösung der Messkammer (1) befindliche Zelle ist über die Intrazellulärlösung leitend mit der Messelektrode (3) der Patchpipette (2) verbunden. Eine Badelektrode (4) dient als Referenz.

Die Elektroden waren über die Elektrolyte der Extrazellulärlösung in der Messkammer und eine in der Patchpipette befindliche Intrazellulärlösung leitend verbunden. Befand sich im Versuch eine Zellmembran zwischen Mess- und Badelektrode, konnte so der über diese Membran fließende Strom registriert werden. Die Messsignale wurden mit einem Vorverstärker innerhalb des Faraday'schen Käfigs verstärkt und hierbei in Spannungssignale umgewandelt. Der hohe Eingangswiderstand des Vorverstärkers ermöglichte die Umsetzung kleinster Ströme im pA-Bereich. Erst nach dieser störungsgeschützten Vorverstärkung wurde das Messsignal vom außerhalb des Käfigs stehenden Hauptverstärker weiter verstärkt (meist 2 oder 5 mV/pA). Ein integrierter analoger Bessel-Filter diente zur Filterung der Messsignale. Über das Interface wurden die Messsignale normalerweise mit einer Frequenz

(sampling rate) von 333 Hz digitalisiert. Das Cut-Off-Signal des Filters betrug ein Drittel der Digitalisierungsfrequenz. Das digitalisierte Messsignal wurde anschließend zur bildlichen Darstellung, Speicherung und Analyse auf den Computer übertragen. Über den PC und das Programm „Pulse + PulseFit“ wurden zudem die Klemmspannungen vorgegeben. Diese wurden über das Interface analogisiert und dann über den Haupt- an den Vorverstärker weitergeleitet. Bei Abweichungen zwischen der vorgegebenen Klemmspannung und dem Pipettenpotential wurden diese durch einen zur Differenz proportionalen Strom ausgeglichen. Auf diese Weise wurde die Spannung der Zellmembran auf den gewünschten Wert „geklemmt“. Hierbei schützte der hohe Eingangswiderstand des Vorverstärkers vor einem Rückfluss des Stromes und damit vor einem Zusammenbruch des Membranpotentials.

2.3.4 Die Patch-Clamp-Konfigurationen

Die Ableitung von Membranströmen mit der Patch-Clamp-Technik ist in verschiedenen Konfigurationen möglich. Diese sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

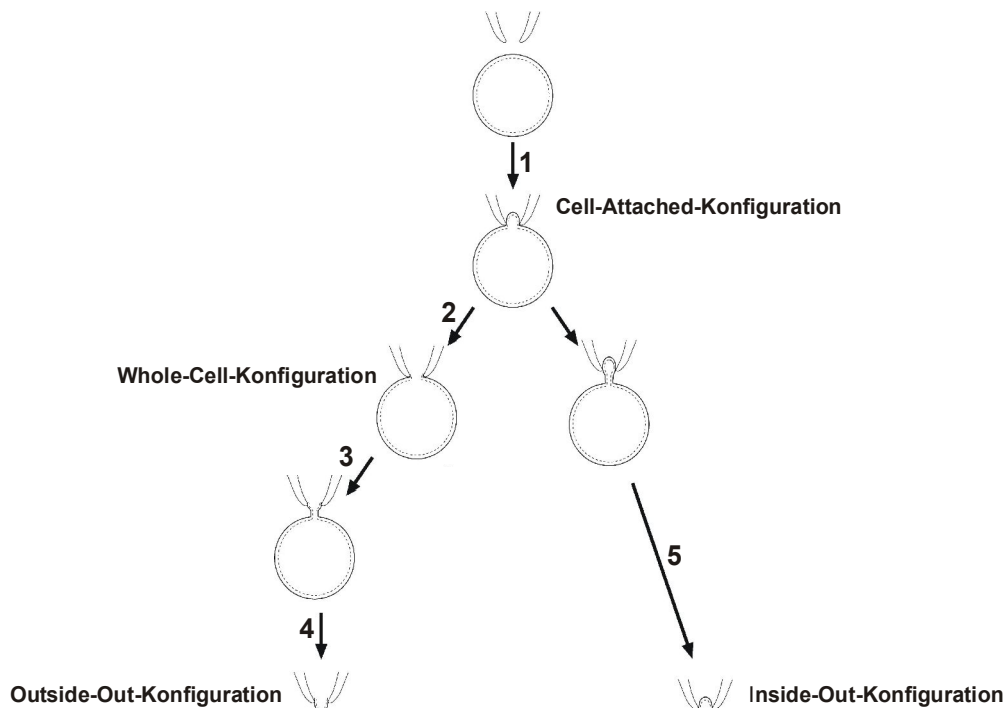


Abb. 7: Die vier klassischen Ableitungskonfigurationen der Patch-Clamp-Technik. (1) Herstellen eines G Ω -Seals durch die Cell-Attached-Konfiguration. (2) Die Whole-Cell-Konfiguration wird mit Hilfe von Unterdruck und einem Spannungspuls erzielt. Durch langsames Entfernen der Patchpipette von der Zelle (3) bis zum Abreißen der Verbindung wird die Outside-Out-Konfiguration erreicht (4). Die Inside-Out-Konfiguration wird ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration durch ruckartiges Entfernen der Pipette von der Zelle erzielt (5). Sie wurde in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt. Nähere Erläuterungen im Text (verändert nach Hamill et al. 1981).

Für das Anlegen von Klemmspannungen und die Ableitung von Membranströmen ist eine sehr dichte Verbindung zwischen Patchpipette und Membran nötig. Dazu wurde die Patchpipette zunächst so dicht an die Zelle herangefahren, bis eine kleine Eindellung der Zelle zu beobachten war. Dann wurde der Überdruck abgelassen und ein Unterdruck von bis zu 0,1 bar angelegt, bis ein sogenannter $G\Omega$ -Seal erreicht war, d.h. bis der elektrische Widerstand mindestens ein $G\Omega$ betrug (normalerweise 2 - 50 $G\Omega$).

Bereits in dieser Konfiguration, der sogenannten Cell-Attached-Konfiguration, lassen sich elektrophysiologische Experimente durchführen, bei denen nur Ströme über den von der Patchpipette begrenzten Membranfleck gemessen werden. Die meisten Messungen dieser Arbeit wurden jedoch in der Whole-Cell-Konfiguration gemacht, bei welcher der Membranstrom der ganzen Zelloberfläche gemessen wird. Zu diesem Zweck wurde bei einem angelegten Unterdruck von 0,1 bar ein kurzer Spannungspuls appliziert (-900 mV für 100 μ s), der den von der Patchpipette umgebenen Membranfleck zerstörte und einen freien Ladungsfluss zwischen Intrazellulärlösung und Zytoplasma ermöglichte (2). Der elektrische Widerstand liegt dann zwischen 0,5 und 2 $G\Omega$. Einige Experimente wurden in der zellfreien Outside-Out-Konfiguration durchgeführt. Hierbei verbleibt nur ein kleiner Membranfleck an der Patchpipette, wobei der elektrische Widerstand ca. 2-50 $G\Omega$ beträgt. Die frühere Außenseite der Membran ist dabei nach außen der Extrazellulärlösung zugewandt, die innere Membranseite ist zum Pipetteninneren gerichtet und steht mit der Intrazellulärlösung in Kontakt. Um diese Konfiguration zu erreichen, wurde die Patchpipette aus der Whole-Cell-Konfiguration unter optischer Kontrolle langsam von der Zelle abgezogen (3), bis sich der an der Pipette befindliche Membranpatch vollständig von der Zelle ablöste (4).

2.3.5 Auswertung und Liquid-Junction-Potentiale

Die Datenaufnahme und -darstellung erfolgte mit dem Programm „Pulse + PulseFit“ (v. 8.50, HEKA Elektronik, Lambrecht). Zur Analyse und Auswertung wurden ebenfalls „Pulse + PulseFit“, sowie die Programme „Patch“ (v. 1.0, Bernd Letz), „IgorPro“ (v. 3.15, WaveMetrics, Oregon, USA), „Excel 2000“ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und Graph Pad Prism (v.3.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Die graphische Bearbeitung von Diagrammen und Originalaufzeichnungen erfolgte mit „Micrografx Picture Publisher“ (v. 8.0, Micrografx Inc., Richardson, Texas, USA) und „CorelDraw“ (v. 8, Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

Die angegebenen Ströme und Spannungen entsprechen der allgemeinen Konvention (Bertl et al. 1992). Bei Strömen mit negativem Vorzeichen handelt es sich um einen Nettoeinstrom positiver Ladung. Diese Einwärtsströme sind bei den Originalaufzeichnungen als nach unten gerichtete Stromausschläge gekennzeichnet.

Aufgrund der unterschiedlichen ionalen Zusammensetzung von Extra- und Intrazellulärlösung bildet sich an der Patchpipette wegen der größenbedingten verschiedenen Beweglichkeit der Ladungsträger ein sogenanntes Liquid-Junction-Potential aus (Barry & Lynch 1991, Neher 1992). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungskombinationen beträgt dieses Potential etwa 10 mV. Alle in dieser Arbeit angegebenen Membranpotentiale sind um diesen Wert korrigiert worden.

2.4 Hämolyseversuche

2.4.1 Gewinnung und Aufbereitung der Erythrozyten

Die hämolytische Wirkung von Listeriolysin wurde an Schafs- und Humanerythrozyten untersucht. Defibriniertes Schafsblut wurde uns aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Im Kühlschrank konnte das Blut bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert werden. Das Humanblut wurde durch eine Ärztin bzw. einen Arzt mit Hilfe eines 0,8 mm Butterfly-Venenpunktionsbestecks (LDKS Oversan, Mailand, Italien) aus der linken Armvene von mir und zwei weiteren gesunden Probanden entnommen und dann ebenfalls im Kühlschrank gelagert. Zur Aufbereitung der Erythrozyten wurden 2 ml Blut drei Minuten lang bei 300 rpm (=794 g) in einer Heraeus Biofuge 5 zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, das Zellpellet in 1 ml E1-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Es folgten 3-5 weitere Waschschrte, bis der Überstand vollkommen klar war. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet gewogen und in der 10-fachen Menge E1-Lösung aufgenommen, um eine 10 %-ige Erythrozytensuspension (w/v) zu erhalten.

2.4.2 Versuchsansatz

Das Reaktionsvolumen jedes Ansatzes betrug 200 µl. Dieses setzte sich aus 170 µl E1-Lösung, 20 µl Erythrozytensuspension und 10 µl Listeriolysin (gelöst in E1-Lösung und 0,5 % FAF-BSA) zusammen. Folglich ergaben sich Endkonzentrationen von 0,025 %

FAF-BSA (w/v) und 1 % Erythrozyten (w/v). Dies entsprach ca. 2×10^5 Erythrozyten pro 200 μl Versuchsansatz. Die Toxinlösung wurde immer zuletzt zugegeben und in Endkonzentrationen zwischen 1 ng/ml und 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (gereinigtes LLO) bzw. in Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:2.000 (Überstände) eingesetzt.

Um den Einfluss bestimmter Substanzen auf die hämolytische Wirkung von LLO zu untersuchen, wurden diese in 20-facher Endkonzentration in E1-Lösung gelöst (Stocklösung). In den entsprechenden Ansätzen wurden statt 170 μl E1-Lösung nur 160 μl vorgelegt und die verbleibenden 10 μl durch die Stocklösung des zu untersuchenden Pharmakons ersetzt.

Bei allen Versuchen wurden Kontrollen ohne Toxin durchgeführt, um das Maß der spontanen Hämolyse festzustellen. Hier wurde statt der 10 μl LLO-Toxinlösung dasselbe Volumen E1-Lösung mit 0,5 % FAF-BSA eingesetzt. Zur Feststellung der maximal möglichen Hämolyse wurden Ansätze mit aqua bidest anstelle von E1-Lösung hergestellt, um durch eine stark hypoosmotische Umgebung alle Erythrozyten zum Platzen zu bringen.

Die so beschickten Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden für 30 min bei 37 °C in einem Thermoschüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 200 μl E1-Lösung zupipettiert. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 300 rpm. Aus jedem Reaktionsgefäß wurden dann vorsichtig 3 x 100 μl des Überstands entnommen und in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte überführt (Dreifachbestimmungen).

2.4.3 Auswertung

Im Photometer (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) wurde die Absorption des durch Hämolyse freigesetzten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Zur Auswertung wurden von allen Ansätzen die jeweiligen Kontrollwerte abgezogen und die prozentuale Hämolyse, bezogen auf die maximale Hämolyse mit aqua bidest berechnet.

2.5 Invasionsversuche

Durch ihre Befähigung zur Invasion in verschiedenste Zelltypen ist *L. monocytogenes* in der Lage, sich der extrazellulären Immunabwehr des Wirts zu entziehen und zelluläre Barrieren im Wirt zu überwinden. Die Invasion in die Wirtszelle stellt also einen essentiellen Vorgang bei der Entwicklung einer Listeriose dar. Um zu untersuchen, inwiefern sich dieser Schritt pharmakologisch beeinflussen lässt, wurden die hier beschriebenen Invasionsversuche durchgeführt. Prof. Domann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) stellte uns hierfür im Rahmen einer Zusammenarbeit sowohl HEp2-Zellen (humane Larynxkarzinomzellen) als auch einen automatischen Plattierer und einen Scanner zum automatischen Zählen von Bakterienkolonien zur Verfügung.

2.5.1 Vorbereitung der Zellen

Zur Durchführung von Invasionsversuchen wurden die HEp2-Zellen 3-4 Tage vor dem Versuch in 24-Well-Platten ausgesät. Hierfür wurde eine dicht bewachsene Petrischale (94 mm Durchmesser) zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin (0,5 % w/v) für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden zusätzlich 7 ml HEp-2-Medium zugesetzt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Noch am Boden haftende Zellen wurden dabei mit der Pipettenspitze vom Boden abgeschabt. Nach Überführen der Suspension in ein 15 ml-Teströhrchen, wurden die Zellen für 5 min bei 1300 rpm (= 290 g) zentrifugiert (Labofuge 400e Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml HEp2-Zellkulturmedium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 400-500 µl zu 30 ml HEp2-Zellkulturmedium hinzugefügt und vermischt. Anschließend wurde jedes Well mit 1 ml Zellsuspension beschickt und 3-4 Tage im Brutschrank inkubiert, bis sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte. Die Zellzahl betrug dann ca. 1×10^6 Zellen pro Well (1,5 cm Durchmesser).

2.5.2 Herstellen des Inoculums

Zur Herstellung des Listerien-Inoculums, das zur Infektion der Zellen eingesetzt wurde, wurde zunächst eine „Übernacht-Kultur“ angelegt. Dazu wurde eine Bakterienkolonie mit einer ausgeglühten Impföse in einen sterilen, mit 20 ml BHI-Medium beschickten

100 ml-Erlenmeyerkolben mit Papierstopfen überimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C in einem Aerotron-Schüttelinkubator HT (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 800 µl der „Übernacht-Kultur“ in 20 ml frisches BHI-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₅₀ zwischen 0,85 und 1,0 angezogen (Schichtdicke = 1 cm). Diese war nach ca. drei Stunden erreicht. Die Zellen befanden sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase, in der besonders viel LLO sezerniert wird.

Im nächsten Schritt wurde 1 ml der Bakterienkultur geerntet und für zwei Minuten in einer Labofuge 15 (Heraeus, Hanau) bei 8000 rpm zentrifugiert (= 6153 g). Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml HEp2-Zellkulturmedium, bevor die Bakterien in 1 ml HEp2-Zellkulturmedium aufgenommen wurden. Diese Suspension diente als Inoculum zur Infektion der Zellen. Um später Rückschlüsse auf die Anzahl der Bakterien im Inoculum ziehen zu können, wurde eine 1:100.000-Verdünnung des Inoculums in Ca²⁺-haltigem PBS (PBS_{Ca²⁺}: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂; pH = 7,4) hergestellt und ausplattiert (siehe Abschnitt 5.5).

2.5.3 Infektion

Als Modellzellen wurden HEp2-Zellen (humane Larynxkarzinomzellen) verwendet, die sich in der Arbeitsgruppe Prof. Domann als besonders gut geeignet für diesen Versuchsansatz herausgestellt hatten. HEp2-Zellen sind sehr adhärent und erlauben daher häufiges und gründliches Waschen, wie es bei diesen Versuchen erforderlich ist. Ein weiterer Vorteil ist die relativ hohe Invasionsrate bei der Infektion von HEp2-Zellen mit *L. monocytogenes*.

Vor der Infektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und jedes Well wurde mit 1 ml frischem Medium beschickt. Diesem Medium waren die jeweils zu testenden Pharmaka zugesetzt. Um Schwankungen durch unterschiedliche Zellzahlen auszugleichen, wurden jeweils drei Wells identisch beschickt. Deren Inhalt wurde nach der Gewinnung der invadierten Bakterien zusammengeführt (Abschnitt 2.5.5). Zur Infektion wurde in jedes Well 8 µl des Inoculums zupipettiert und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Dies entspricht einer Verdünnung des Inoculums von 1:125. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank (Typ B6, Heraeus, Hanau) bei 37 °C.

2.5.4 Entfernen nicht-invadiertes Listerien

Um nichtinvadierte Bakterien zu entfernen, wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums fünfmal mit PBS_{Ca²⁺} gewaschen. Um Listerien, die nicht gewaschen wurden und z.B. noch an der Oberfläche von HEp2-Zellen hafteten, zu zerstören, folgte nun eine einstündige Behandlung mit Gentamycin (50 µg/ml in HEp2-Zellkultur-Medium) bei 37 °C. Das Aminoglycosid-Antibiotikum wirkt bakterizid auf proliferierende und auch ruhende Bakterien, sofern diese aerobe Stoffwechselaktivität besitzen (Stahlmann & Lode 2005). Aufgrund seiner hohen Polarität kann es jedoch nicht in die HEp2-Zellen gelangen. Erfolgreich invadierte Bakterien waren daher durch ihre Wirtszellen vor dem Antibiotikum geschützt. Im Anschluss wurden die HEp2-Zellen nach Absaugen des Zellkulturmediums dreimal mit PBS_{Ca²⁺} gewaschen.

2.5.5 Gewinnung der invadierten Listerien

Zur Gewinnung der invadierten Listerien wurden die HEp2-Zellen mit Triton[®] X-100 aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen mit je 1 ml TRITON[®] X-100 (0,2 % v/v in kaltem aqua bidest) pro Well versetzt und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Detergens zerstört die Zellmembran der HEp2-Zellen, jedoch nicht die der Listerien. Im Anschluss wurden die Zellen durch kräftiges Auf- und Abpipettieren und Kratzen am Boden der Vertiefungen abgelöst. Die Suspensionen der drei gleich behandelten Ansätze (Abschnitt 2.5.3) wurden jeweils zusammengeführt und gemischt. Von jeder Suspension wurde eine 1:100-Verdünnung in PBS_{Ca²⁺} hergestellt, die dann ausplattiert wurde.

2.5.6 Bestimmung der Bakterienzahl

Zur Bestimmung der Anzahl der zur Infektion eingesetzten Listerien (Inoculum) und der invadierten Listerien wurden die angefertigten Verdünnungen mit Hilfe eines automatischen Plattierers (BIO-SYS GmbH, Karben) gleichmäßig auf BHI-Platten verteilt. Jede Verdünnung wurde dreimal ausplattiert (Dreifachbestimmung). Anschließend wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden danach zwei Tage in den Kühlschrank gestellt (4 °C), um ein Zusammenziehen der entstandenen Bakterienkolonien zu erzielen. Dies ermöglichte ein genaueres Zählen der Kolonien im Scanner (CASBA[®] 4, BIO-SYS GmbH, Karben).

2.5.7 Auswertung

Jede auf den BHI-Platten entstandene Listerienkolonie steht als sogenannte „colony forming unit“ (CFU) für ein Bakterium in der ausplattierten Verdünnung. Zur Auswertung wurde zunächst die absolute Invasionsrate A [%] berechnet. Sie gibt an, wieviel Prozent der eingesetzten Bakterien in die HEp2-Zellen invadiert waren. Unter Berücksichtigung der genannten Verdünnungsschritte im Versuchsverlauf errechnete sich A wie folgt:

$$A_x [\%] = (CFU_x \times 12,5) / CFU_{\text{Inoculum}}$$

A_x = Absolute Invasionsrate im Ansatz x

CFU_x = gezählte CFUs pro Platte im Ansatz x

CFU_{Inoculum} = gezählte CFUs pro Platte im Inoculum-Ansatz

Um den Effekt der eingesetzten Pharmaka auf die Invasionsrate zu beschreiben, wurde die relative Invasionsrate R [%] bestimmt. Sie beschreibt das prozentuale Verhältnis der Invasion unter Einfluss des Pharmakons zur Invasion im Kontrollansatz und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$R_x [\%] = (A_x \times 100) / A_{\text{Kontrolle}}$$

R_x = Relative Invasionsrate im Ansatz x

A_x = Absolute Invasionsrate im Ansatz x

$A_{\text{Kontrolle}}$ = Absolute Invasionsrate im Kontrollansatz

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme „Excel 2000“ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und „Graph Pad Prism“ (v. 3.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Die angegebenen Werte sind, sofern nicht anders beschrieben, arithmetische Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean). Die Anzahl der Versuche bzw. der ausgewerteten Poren wurde als „ n “ angegeben und in den Abbildungen in Klammern dargestellt. Nullhypothesen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Die Auswertung der Porenschlüsse erfolgte in einer Mehrfeldertafel mit dem χ^2 -Test und die Verteilung der Porenstromamplituden wurde im Kolmogoroff-Smirnoff-Test verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet mit „*“, signifikant) bzw. $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet mit „**“ und „***“, hochsignifikant). Eine Korrektur des Signifikanzniveaus bei multiplen Tests wurde nicht vorgenommen, da es sich um Studien explorativen Charakters handelte.

Die Konzentrations-Wirkungskurven der Patch-Clamp-Experimente und Hämolyseversuche wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung an die Messdaten angepasst (s.u.)

$$y = \frac{y_{\max}}{1 + (EC_{50}/c)^{n_H}}$$

y = Wirkung

y_{max} = maximale Wirkung

n_H = Hill-Koeffizient

c = eingesetzte Konzentration

EC₅₀ = Konzentration, bei der 50 % der maximalen Wirkung erreicht wird.

Bei inhibitorischen Vorgängen wurde der EC₅₀-Werte durch den IC₅₀-Wert ersetzt

Für die Anpassung wurde das Statistikprogramm „Graph Pad Prism“ herangezogen, wobei das Least-Squares-Fit Verfahren zur Anwendung kam. Die Verteilungsmerkmale der gemessenen Porenstromamplituden in Abschnitt 3.5.1 wurden über kumulative Häufigkeitsverteilungen bestimmt. Dazu wurde die Summe mehrerer kumulativer Normalverteilungen an die kumulative Häufigkeitsverteilung der diversen Versuchsansätze angepasst. Auch hierbei wurde das Least-Squares-Fit Verfahren verwendet. Aus den angepassten kumulativen Normalverteilungen wurden Dichtefunktionen – die einzelnen Normalverteilungen – abgeleitet, die in den Abbildungen zusammen mit den Amplitudenhistogrammen dargestellt sind.

2.7 Bezugsquellen der Lösungen und Chemikalien

Zellkultur

MEM-Medium

mit Earle's-Salzen und 2 mM L-Glutamin Invitrogen Karlsruhe

DMEM-Medium Sigma-Aldrich GmbH Taufkirchen

Ham's F12-Medium Sigma-Aldrich GmbH Taufkirchen

BHI-Medium Beckton Dickinson Heidelberg

FKS PAA Laboratories GmbH Cölbe

NKS PAA Laboratories GmbH Cölbe

Pharmaka und Sonstiges

FAF-BSA Sigma-Aldrich GmbH Taufkirchen

L-Cystein Sigma-Aldrich GmbH Taufkirchen

N-Acetyl-Cystein (NAC) Sigma-Aldrich-GmbH Taufkirchen

Protamin Grade IV Sigma-Aldrich-GmbH Taufkirchen

Protaminsulfat Sigma-Aldrich-GmbH Taufkirchen

TRITON® X-100 Sigma-Aldrich-GmbH Taufkirchen

Cytochalasin D Sigma-Aldrich GmbH Taufkirchen

Charybdotoxin Latoxan Valence,
Frankreich

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Zellmembran

3.1.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Membran von HEK293-Zellen

Zunächst wurden die verwendeten HEK293-Zellen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert. Abbildung 8a zeigt die Membranströme einer Zelle bei schrittweiser Erhöhung des Membranpotentials (U_m) von -130 auf +70 mV in 20 mV-Schritten. Hierbei wurde das jeweilige Membranpotential für 400 ms gehalten und dazwischen für 100 ms auf das Haltepotential von -50 mV gesetzt. In Abbildung 8b sind die mittleren Membranströme (I_m) von 10 Zellen in Abhängigkeit vom Membranpotential aufgetragen.

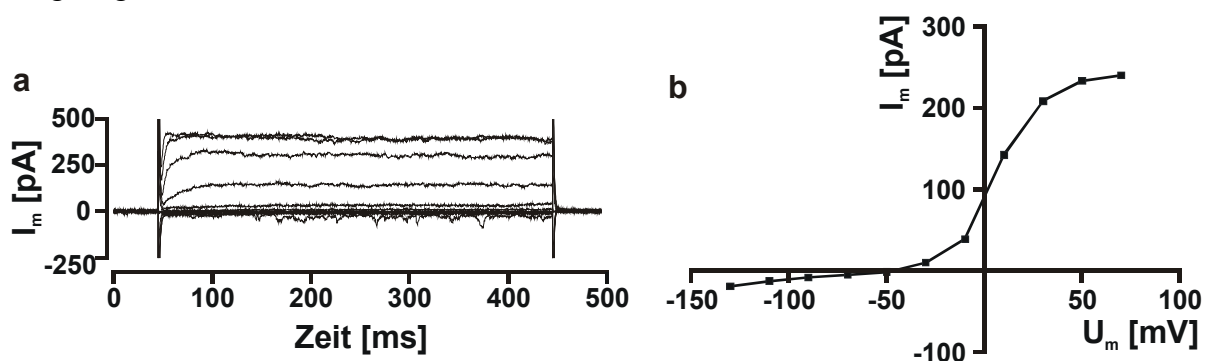


Abb. 8: Membranströme einer HEK293-Zelle in Abhängigkeit vom Membranpotential bei Verwendung von E1- und I_{standard}-Lösung. **(a)** Zeitverlauf der Membranströme einer HEK293-Zelle bei Membranpotentialen von -130 bis +70 mV. **(b)** Mittelwerte der Membranströme von zehn Zellen in Abhängigkeit vom Membranpotential. Berücksichtigt wurden hierbei die Ströme in der Zeit von der 280-ten bis zur 380-ten ms des Spannungspulses. (Die Fehlerbalken werden von den Datenpunkten verdeckt.)

Bei negativen Membranpotentialen bis zu -30 mV war ein unspezifischer Membranstrom zu messen, der sich proportional zum Membranpotential verhielt. Ab etwa -30 mV Membranpotential wurde dieser unspezifische Strom von einem verzögert aktivierenden K^+ -Auswärtsstrom überlagert, der im Zeitraum von 400 ms nicht inaktivierte und auf spannungsabhängige K^+ -Kanäle (delayed outward rectifier) zurückzuführen ist (Yu & Kerchner 1998). Um bei der Untersuchung der LLO-Porenbildung Störungen durch diese K^+ -Kanäle zu umgehen, wurde ein Haltepotential von -50 mV gewählt, welches dem Membranpotential der Zellen entspricht (Umkehrpotential: -50 ± 2 mV, $n = 48$). Bei diesem Membranpotential waren keine endogenen Ionenkanalaktivitäten zu beobachten.

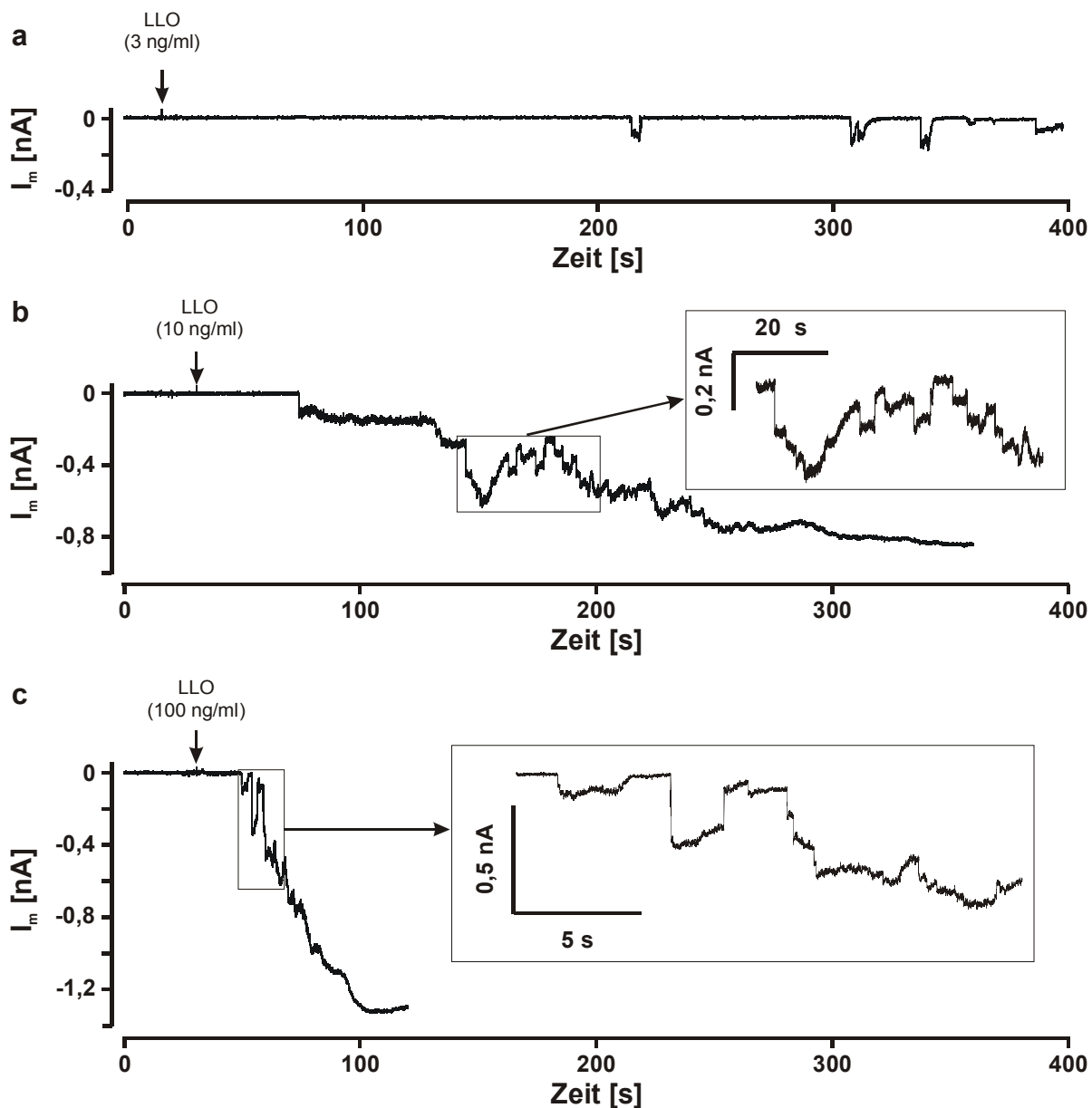


Abb. 9: Membranströme (I_m) von HEK293-Zellen nach Applikation von Listeriolysin O (LLO) in Konzentrationen von 3 ng/ml (a), 10 ng/ml (b) und 100 ng/ml (c). Die Messungen wurden bei -50 mV unter Verwendung von E1- und I_{standard} -Lösung durchgeführt. In den Insets sind die Stromverläufe ausschnittsweise vergrößert dargestellt.

Abbildung 9 zeigt Membranstromregistrierungen von drei HEK293-Zellen nach Applikation von LLO in verschiedenen Konzentrationen. Bei einer LLO-Konzentration von 3 ng/ml (54 pM) öffnete sich nach einer Latenzzeit (Δt) von ca. 200 s die erste LLO-Pore, was sich als sprunghafte negative Zunahme des Membranstroms zeigte. Nach etwa 3 s nahm der Membranstrom wieder ab. Weitere Porenöffnungen und -schließungen folgten. Bei höheren LLO-Konzentrationen war die Latenzzeit bis zur Öffnung der ersten Pore kürzer und die Porenöffnungen folgten rascher aufeinander, so dass ihre Anzahl die der Porenschlüsse und

der Gesamtstrom stetig anstieg. Unter dem Mikroskop waren auch visuell konzentrationsabhängige Effekte an den Zellen zu erkennen: Während die Zellen bei Konzentrationen bis 3 ng/ml über 30 min unverändert aussahen, konnte man ab Konzentrationen von 10 ng/ml zum Teil nach Minuten die Ausbildung von Membranausstülpungen, sogenannten „Membrane Blebs“, beobachten.

Zur Quantifizierung der LLO-Wirkung in Abhängigkeit von der LLO-Konzentration wurde die **Nettoladung** (q_m) ermittelt, die innerhalb der ersten Minute nach Bildung der ersten LLO-Pore die Zellmembran passierte. Diese dient als Maß für den Effekt von LLO auf die Zelle und ist direkt proportional zur Fläche, die zwischen der aufgezeichneten Stromspur und der Null-Linie liegt. Der Nettoladungsfluss wird von der Häufigkeit der Porenöffnungen, ihren Offenzeiten und von den Porenstromamplituden bestimmt.

Die Membranströme verliefen vor der LLO-Applikation fast auf der Null-Linie. Die Nettoladung, die innerhalb von einer Minute nach der ersten Porenöffnung die Membran passierte, nahm in Abhängigkeit von der LLO-Konzentration zu (Abb. 10).

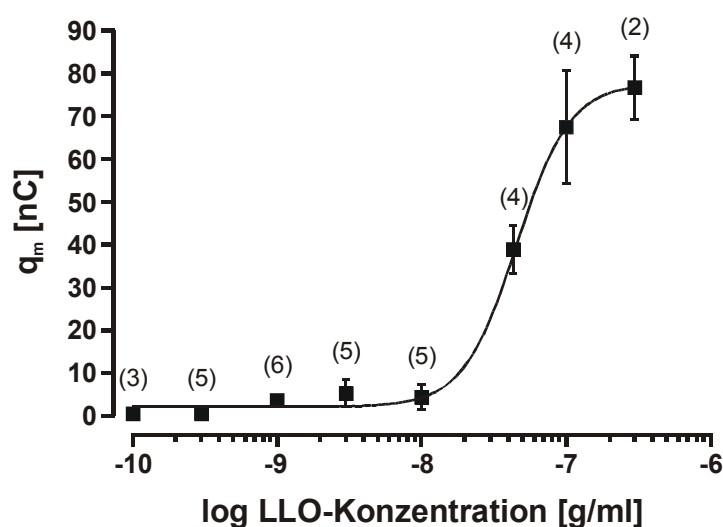


Abb. 10: Abhängigkeit des durch LLO-Poren induzierten Ladungsflusses von der LLO-Konzentration. Die Ordinate zeigt die Nettoladung, welche die Membran bei einem Membranpotential von -50 mV innerhalb einer Minute nach Bildung der ersten Pore passierte. Die jeweilige Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben. Die Anpassung der Kurve an die Messdaten erfolgte mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26).

Die Anpassung der Hill-Gleichung an die Messdaten ergab einen maximalen Nettoladungsfluss von 78 ± 2 nC, der bei einer LLO-Konzentration von etwa 300 ng/ml erreicht wurde. Der halbmaximale Nettoladungsfluss wurde bei einer LLO-Konzentration von 46 ± 3 ng/ml (821 pM) induziert. Der Hill-Koeffizient n_H von $2,3 \pm 0,2$ weist darauf hin, dass mindestens drei LLO-Monomere an der Bildung einer LLO-Pore beteiligt sind.

Eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung der LLO-Wirkung ist die Bestimmung der **Latenzzeit** (Δt), die zwischen LLO-Applikation und dem Auftreten der ersten Pore liegt.

Die Abhängigkeit der Latenzzeit von der LLO-Konzentration ist in Abbildung 11 dargestellt.

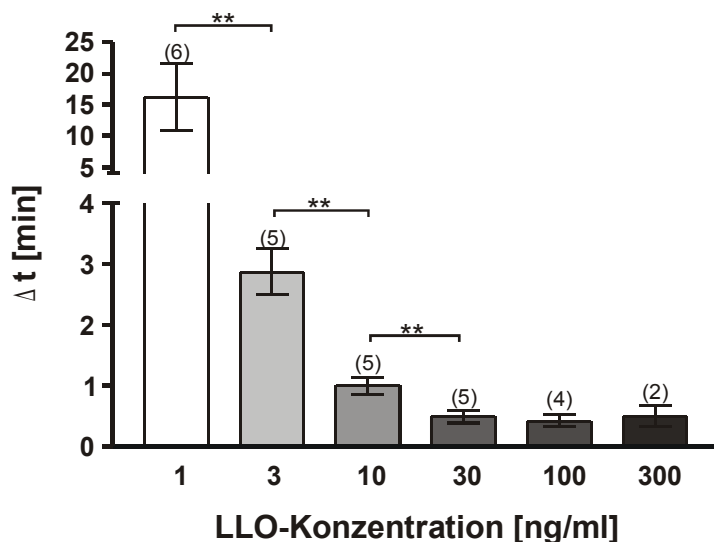


Abb. 11: Latenzzeit Δt zwischen LLO-Applikation und dem Auftreten der ersten Pore bei verschiedenen LLO-Konzentrationen. Die Anzahl der Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Bei LLO-Konzentrationen unter 1 ng/ml (0,1 und 0,3 ng/ml) konnte innerhalb einer Stunde nach Applikation nicht in allen Versuchen Öffnungen von Membranporen beobachtet werden. Die Latenzzeit war vor allem bei niedrigen LLO-Konzentrationen großen Schwankungen unterworfen und betrug bei 1 ng/ml 16 ± 5 min. Mit steigender LLO-Konzentration war eine signifikante Abnahme der Latenzzeit zu beobachten. Ab einer Konzentration von 30 ng/ml konnte die Latenzzeit von 29 ± 6 s jedoch nicht weiter verkürzt werden. Diese Minimaldauer wird durch die Diffusionsgeschwindigkeit der LLO-Moleküle an die Zellmembran nach Toxinapplikation und durch die Prozesse der Bindung, Oligomerisierung der LLO-Monomere zur Vorläuferpore und der vollständigen Insertion in die Membran zur Bildung funktionsfähiger Poren bestimmt (vgl. S. 5).

3.1.2 Wirkung von Listeriolysin O auf die Membran von Immunzellen

Aufgrund ihrer guten Eignung für die Untersuchung von Toxinporen wurden in den Patch-Clamp-Experimenten in erster Linie HEK293-Zellen verwendet. Listerien treten nach ihrem Eindringen in den Wirtsorganismus zunächst jedoch vor allem mit Zellen der Immunabwehr in Kontakt. Daher wurden zusätzlich Patch-Clamp-Experimente mit Maus-Mikroglia-Zellen, sogenannten BV-2-Zellen, durchgeführt. Mikroglia sind Zielzellen bei zerebralen Listerieninfektionen (Schluter et al. 1999) und werden stärker infiziert als Astrozyten und Oligodendrozyten (Dramsi et al. 1998). BV-2-Zellen exprimieren Ca^{2+} -abhängige, spannungsunabhängige K^{+} -Kanäle (Eder 1998). Um die Aktivierung dieser K^{+} -Kanäle vor der LLO-Porenbildung zu verhindern, wurde eine Ca^{2+} -freie Intrazellulärlösung verwendet.

Diese enthielt zum Abpuffern zytoplasmatischer Ca^{2+} -Ionen 0,1 mM BAPTA (I_0 -Lösung, Tab. 2). Diese BAPTA-Konzentration reicht jedoch nicht zum Abpuffern von Ca^{2+} -Ionen, die von außen durch die LLO-Poren in die Zelle eindringen. Abbildung 12 zeigt im Vergleich Membranstromregistrierungen einer HEK293-Zelle und einer BV-2-Zelle nach Applikation von *L. monocytogenes*-Überstand.

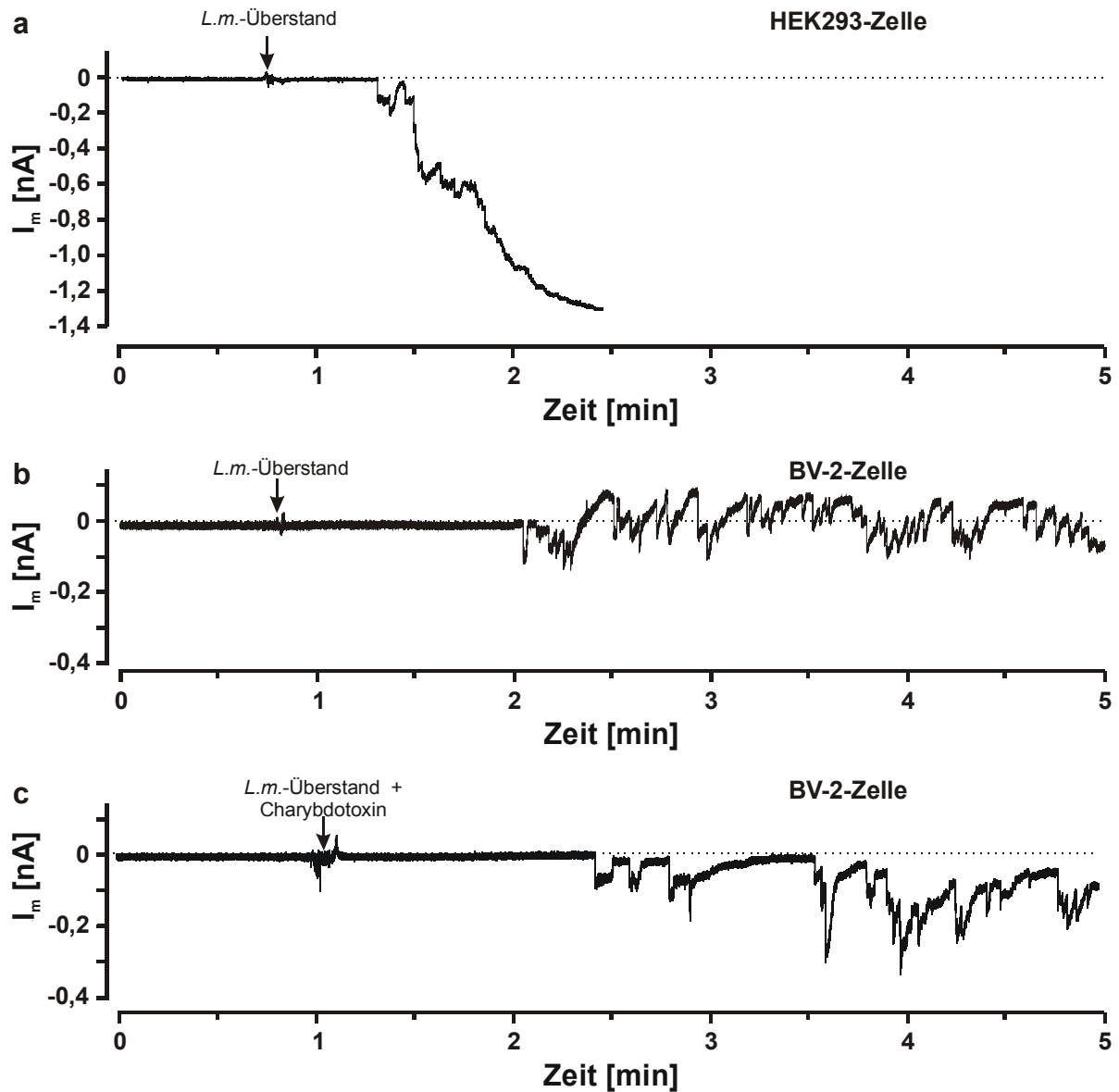


Abb. 12: Wirkung von *L.m.*-Überstand (Verdünnung 1:40) auf die Membranströme einer HEK293-Zelle (a) und zweier BV-2-Zellen (b, c). Bei der BV-2-Zelle in (c) wurde mit dem *L.m.*-Überstand gleichzeitig 300 nM Charybdotoxin appliziert, um die endogenen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle zu blockieren. Alle Experimente wurden bei einem Membranpotential von -50 mV unter Verwendung Ca^{2+} -freier I_0 -Lösung mit 0,1 mM BAPTA und E1-Lösung durchgeführt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten in (b) und (c) aufgrund des geringen Nettomembranstroms im Vergleich zu (a).

Die Toxinapplikation führte bei beiden Zelltypen zur Bildung von LLO-Poren. Während bei einem Membranpotential von -50 mV bei HEK293-Zellen nur Nettoeinwärtsströme zu beobachten waren (Abb. 12a), kam es bei BV-2-Zellen auch zu positiven Nettomembranströmen (Abb. 12b). Diese positiven Membranströme wurden durch die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle verursacht und ließen sich durch deren Blockade mit dem Skorpiongift Charybdotoxin verhindern (Abb. 12c).

Die in Abbildung 12 gezeigten Membranströme lassen vermuten, dass sich LLO-Poren bei BV-2-Zellen später bilden als bei HEK293-Zellen. Diesem Eindruck nachgehend, wurden für beide Zelltypen die Latenzzeiten (Δt) zwischen *L.m.*-Überstandsapplikation und Auftreten der ersten Pore bei verschiedenen *L.m.*-Überstandskonzentrationen ermittelt (Abb. 13).

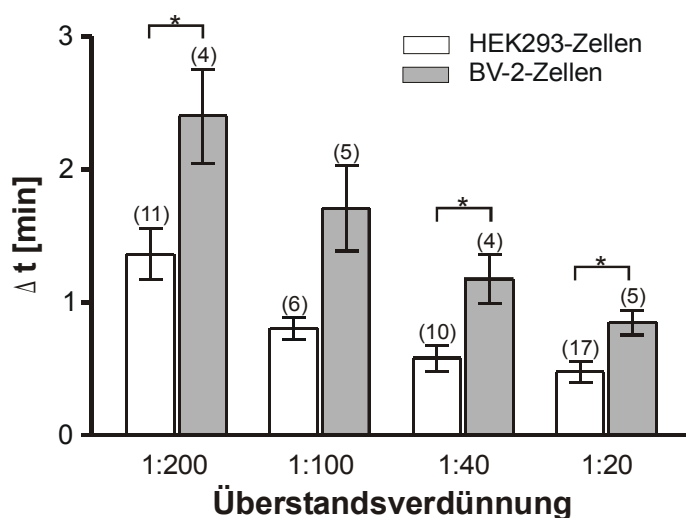


Abb. 13: Latenzzeiten Δt zwischen der Applikation von *L.m.*-Überstand und dem Auftreten der ersten Membranpore bei HEK293-Zellen und BV-2-Zellen. Die Anzahl der Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Bei allen untersuchten Überstandskonzentrationen dauerte die Bildung der ersten Pore bei BV-2-Zellen etwa doppelt so lange wie bei HEK293-Zellen. Diese Verzögerung war signifikant bei Überstandsverdünnungen von 1:20, 1:40 und 1:200 ($p \leq 0,05$). Da die Diffusionsgeschwindigkeit der LLO-Moleküle zu den beiden Zelltypen gleich ist, muss die Porenbildung an den BV-2-Zellen bei der Oligomerisierung der LLO-Monomere zur Vorläuferpore und/ oder bei der vollständigen Insertion zur Bildung der funktionellen Pore langsamer ablaufen.

Um zu überprüfen, ob der Zelltyp auch einen Einfluss auf die Porenstromamplituden hat, wurden diese bei den jeweils zehn ersten Poren von 14 HEK293-Zellen und 7 BV-2-Zellen bestimmt. Die Porenbildung wurde hierbei durch die Applikation von *L.m.*-Überstand (1:20 verdünnt) induziert. Die Porenstromamplituden lagen bei beiden Zelltypen im Bereich zwischen 8 und 280 pA mit Mittelwerten bei 63 ± 4 (HEK293-Zellen) und 65 ± 5 pA (BV-2-Zellen) und unterschieden sich nicht signifikant.

Der Vergleich der LLO-Wirkung an HEK293- und BV-2-Zellen zeigt, dass es zwar bei beiden Zelltypen zur Porenbildung kommt, die Wirkung jedoch zelltypabhängig ist.

3.2 Hämolytische Wirkung von Listeriolysin O

Vor der elektronenmikroskopischen Darstellung von LLO-Ringstrukturen in Zellmembranen (Jacobs et al. 1998) und dem ersten direkten Nachweis von LLO-Poren mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Repp et al. 2002) wurde LLO einzig aufgrund seiner hämolytischen Eigenschaften als porenbildendes Toxin eingestuft. Um zu untersuchen, inwiefern die hämolytische Wirkung mit der elektrophysiologisch gemessenen Porenbildung gekoppelt ist, wurden Hämolyseversuche mit Human- und Schafserythrozyten durchgeführt. Abbildung 14 zeigt den hämolytischen Effekt von LLO an Human- und Schafserythrozyten in Abhängigkeit von der LLO-Konzentration.

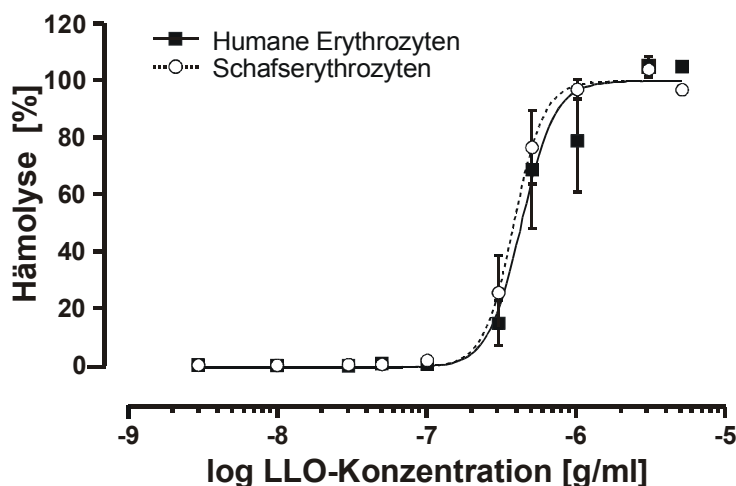


Abb. 14: LLO-induzierte Hämolyse von Human- und Schafserythrozyten in Abhängigkeit von der LLO-Konzentration. 100 % entsprechen dem durch aqua bidest erzielten hämolytischen Effekt. Die Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26) an die Messdaten angepasst. Diese wurden in jeweils drei unabhängigen Versuchen bestimmt, wobei die Erythrozyten von verschiedenen Blutentnahmen stammten. In jedem Experiment wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Man sieht, dass die Konzentrations-Wirkungskurven für Human- und Schafserythrozyten identisch verlaufen. Nach 30-minütiger Inkubation mit LLO konnte ab einer LLO-Konzentration von ca. 300 ng/ml eine Hämolyse beobachtet werden. Um die Hälfte der Erythrozyten zu lysieren, wurden bei beiden Zelltypen LLO-Konzentrationen von etwa 380 ng/ml (6,8 nM) benötigt, eine vollständige Hämolyse (wie sie auch durch Inkubation der Erythrozyten in aqua bidest erzielt wurde) war jeweils ab LLO-Konzentrationen von 3 µg/ml zu beobachten. Die Hill-Koeffizienten von $3,9 \pm 1,0$ (humane Erythrozyten) bzw. $4,3 \pm 0,4$ (Schafserythrozyten) waren nicht signifikant verschieden und weisen darauf hin, dass für

hämolytische Effekte Poren aus mindestens vier LLO-Monomeren gebildet werden müssen. Da der hämolytische Effekt von LLO an Schafserythrozyten mit dem an humanen Erythrozyten identisch ist, wurden für alle weiteren Hämolyseversuche Erythrozyten aus Schafsblut verwendet.

Die ermittelten Parameter zur Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung und Hämolyse durch LLO sind nochmals in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Konzentrationsabhängigkeit des LLO-induzierten Nettoladungsflusses und der LLO-induzierten Hämolyse

LLO-Effekt	Zelltyp	EC ₅₀ [ng LLO/ml]	Hill-Koeffizient (n _H)
Membranporen (Nettoladungsfluss)	HEK293-Zellen	46	2,3 ± 0,2
Hämolyse	Schafserythrozyten	380	4,3 ± 0,4
	Humanerythrozyten	426	3,9 ± 1,0

Auffällig ist, dass zum Erreichen einer 50 %-igen Hämolyse eine etwa zehnfach höhere Toxinkonzentration benötigt wurde als zum Erreichen des halbmaximalen Nettoladungsflusses. Dass die unterschiedlich starken Toxinwirkungen alleine auf zellspezifischen Unterschieden beruhen, konnte später in Patch-Clamp-Versuchen mit humanen Erythrozyten ausgeschlossen werden. Bei diesen traten bereits ab LLO-Konzentrationen von 1 ng/ml Poren auf (vgl. Abschnitt 3.3.2), was zeigt, dass die Patch-Clamp-Methode im Vergleich zur Hämolyse deutlich sensitiver gegenüber der Wirkung von LLO an Zellmembranen ist.

Die Hill-Koeffizienten (n_H) der Konzentrations-Wirkungskurven waren bei den Patch-Clamp-Messungen und den Hämolyseversuchen größer als 1, was auf eine Oligomerbildung der LLO-Moleküle sowohl bei der Porenbildung als auch bei der Hämolyse schließen lässt. Aufgrund von n_H = 2,3 ± 0,2 bei der Porenbildung kann davon ausgegangen werden, dass an einer Pore mindestens drei Monomere beteiligt sind. Die etwas höher liegenden Hill-Koeffizienten aus den Hämolyseversuchen implizieren, dass eher vier oder fünf LLO-Moleküle erforderlich sind.

3.3 Porenschlüsse

Bei den Messungen des Membranstroms zeigte sich, dass nach Applikation von LLO nicht nur Porenöffnungen zu beobachten sind, sondern dass sich ein Teil dieser Poren auch wieder schließt (Abb. 9 und 15). Hierbei geht der Membranstrom wieder auf das vor der jeweiligen Porenöffnung bestehende Stromniveau zurück. Dies war vor allem bei niedrigen LLO-Konzentrationen deutlich zu sehen. Während die Porenöffnungen grundsätzlich sprunghaft innerhalb von weniger als 3 ms erfolgten (Digitalisierungsfrequenz des Membranstroms), konnten bei den Porenschlüssen verschiedene Porenschlusskinetiken unterschieden werden. Diese sind in Abb. 15 an dem Beispiel des Membranstromverlaufs einer einzelnen Zelle gezeigt und in den Ausschnitten zur Verdeutlichung vergrößert dargestellt.

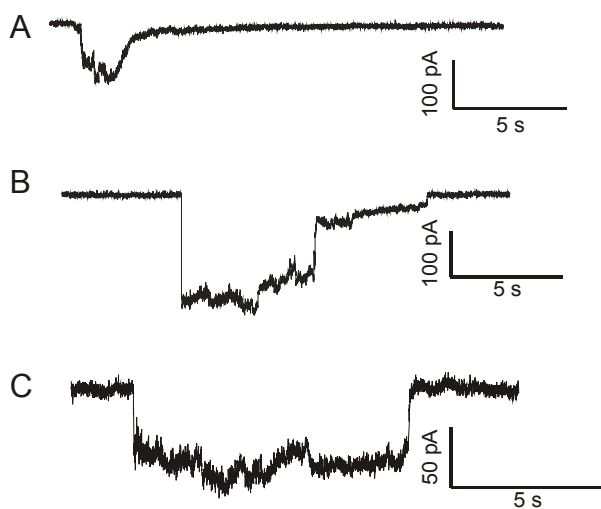
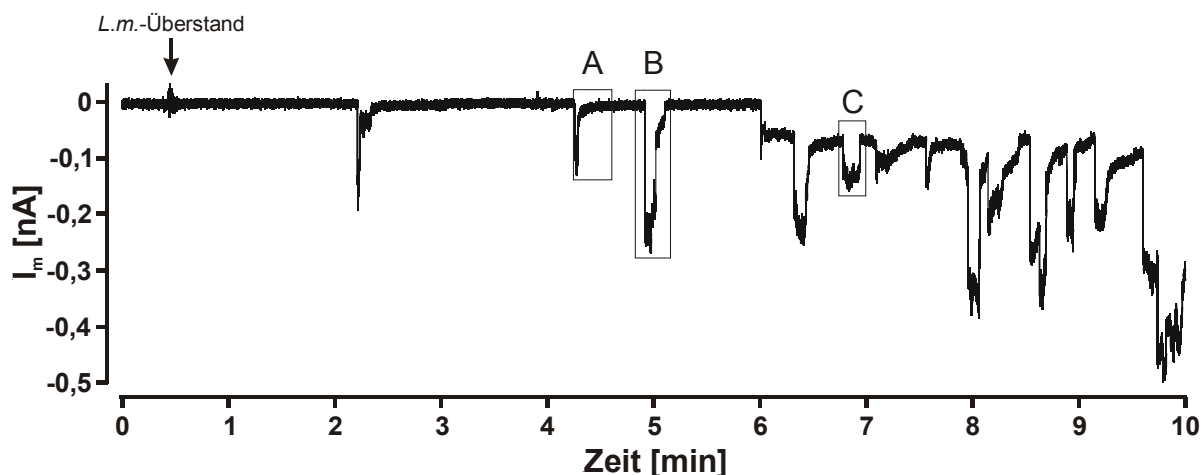


Abb. 15: Verschiedene Porenschlusskinetiken bei einer HEK293-Zelle nach Porenbildung durch *L.m.*-Überstand (Verdünnung 1:10.000) bei einem Membranpotential von -50 mV. Links eine Darstellung aller drei Kinetiken in vergrößerter zeitlicher Auflösung. (A) zeigt einen langsamen Porenschluss, bei dem der Porenstrom kontinuierlich bis hin zum Ausgangsniveau abnimmt. In (C) ist ein schneller Porenschluss dargestellt, (B) zeigt eine Mischform aus langsamer und schneller Stromkinetik.

Die Poren schließen sich entweder langsam durch eine kontinuierliche Stromabnahme (Abb. 15A), oder sprunghaft (Abb. 15C), wie es für endogene Ionenkanäle typisch ist. Dazu kommen Mischformen aus langsamer und schneller Stromkinetik (Abb. 15B).

Bei allen folgenden Auszählungen von Porenschlüssen wurden von jeder Membranstromregistrierung jeweils maximal die ersten vier Poren ausgewertet. Zu späteren Zeitpunkten überlappten sich die einzelnen Porenströme mehr und mehr, was eine exakte Zuordnung unmöglich machte. Abbildung 16 zeigt die relativen Häufigkeiten der Porenschlüsse nach Applikation von gereinigtem LLO bzw. von *L.m.*-Überstand. Die gewählte *L.m.*-Überstandsverdünnung von 1:10.000 rief hierbei gleich viele LLO-Poren hervor wie das gereinigte LLO in einer Konzentration von 2 ng/ml. Links ist die Gesamthäufigkeit der Porenschlüsse dargestellt, die rechte Seite zeigt die einzelnen Häufigkeiten der drei verschiedenen Stromkinetiken. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Porenöffnungen. Bei 100 % würden sich demnach alle geöffneten Poren wieder schließen.

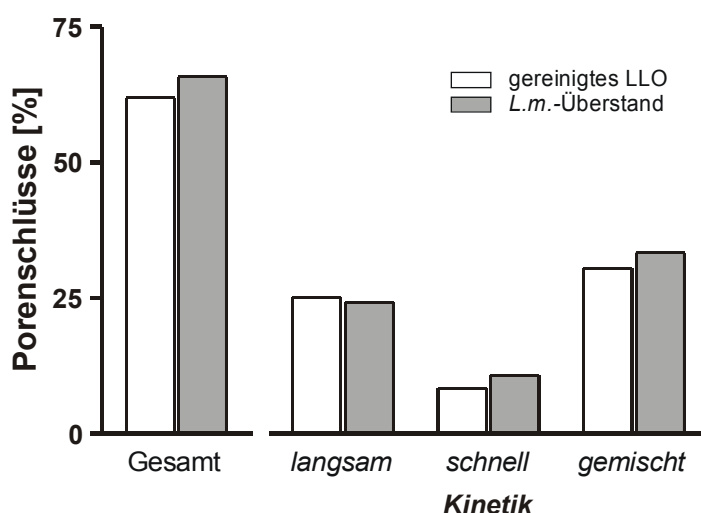


Abb. 16: Relative Häufigkeit der Porenschlüsse nach Applikation von gereinigtem LLO (2 ng/ml) und *L.m.*-Überstand (Verdünnung 1:10.000). Ausgewertet wurden 9 Experimente mit gereinigtem LLO (32 Porenöffnungen) und 18 Experimente mit *L.m.*-Überstand (51 Porenöffnungen).

Bei Applikation von gereinigtem LLO an neun verschiedenen Zellen kam es bei 64 % aller 32 registrierten Porenöffnungen wieder zu einem Verschluss. Dabei waren die Schlüsse mit gemischter Stromkinetik mit 31 % aller offenen Poren am häufigsten, gefolgt von den langsamen Schlüssen mit 25 %. Die schnellen Schlüsse waren mit 8 % selten. Bei der Verwendung von *L.m.*-Überstand waren in 18 Experimenten bei 68 % aller 51 offenen Poren Schlüsse zu beobachten. Es schlossen sich 33 % der offenen Poren mit gemischter, 24 % mit langsamer und 11 % mit schneller Kinetik.

Andere, neben LLO von den Bakterien in den *L.m.*-Überstand sezernierte Komponenten beeinflussen demnach weder die Häufigkeit der Porenschlüsse noch deren Kinetik.

3.3.1 Beteiligung zellulärer Komponenten

Für das Auftreten von Porenschlüssen kommen grundsätzlich folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

- eine Dissoziation von LLO-Molekülen von der LLO-Pore
- ein Konformationswechsel der LLO-Moleküle selbst
- ein zellulärer Mechanismus als Reaktion auf die Porenbildung

Um zu untersuchen, ob ein zellulärer Mechanismus bei den Porenschlüssen involviert ist, wurde zunächst der Einfluss intrazellulärer Komponenten verhindert, indem die Messungen in der zellfreien Outside-Out-Konfiguration durchgeführt wurden. Im Gegensatz zur Whole-Cell-Konfiguration, bei der Ströme über die gesamte Zellmembran gemessen werden, werden in der Outside-Out-Konfiguration nur Ströme über einen kleinen Membranausschnitt, den sogenannten „Patch“, gemessen, der von der restlichen Zelle isoliert wurde. Um hierbei trotz der geringeren gemessenen Membranfläche etwa gleich viele Porenöffnungen zu beobachten wie in der Whole-Cell-Konfiguration, wurden die eingesetzten *L.m.*-Überstände bei Outside-Out-Experimenten weniger stark verdünnt (1:10.000 in der Whole-Cell-Konfiguration, 1:400 in der Outside-Out-Konfiguration). Abbildung 17 zeigt typische Membranströme von HEK293-Zellen nach Bildung der ersten LLO-Pore in der Whole-Cell- (Abb. 17a) und der Outside-Out-Konfiguration (Abb. 17b).

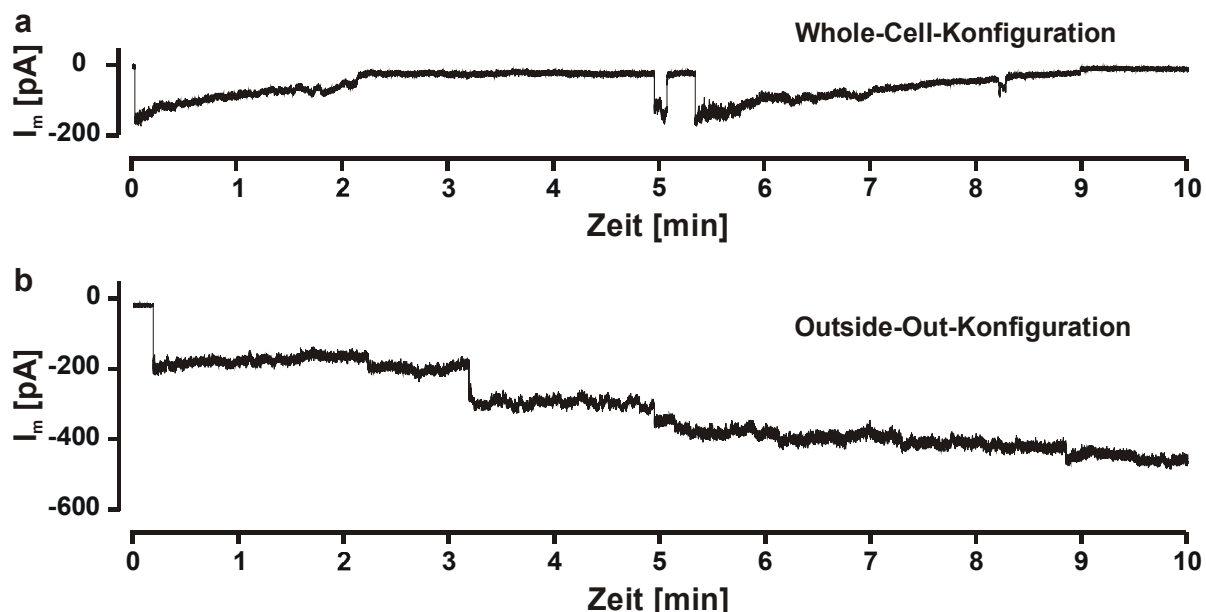


Abb. 17: Typische Membranstromregistrierungen von HEK293-Zellen in der Whole-Cell- (a) und der Outside-Out-Konfiguration (b) über zehn Minuten nach Bildung der ersten Pore. Das Membranpotential betrug -50 mV. Zur Porenbildung wurde *L.m.*-Überstand in einer Verdünnung von 1:10.000 (Whole-Cell-Konfiguration) bzw. 1:400 (Outside-Out-Konfiguration) eingesetzt.

Bei Applikation der 25-fachen Konzentration *L.m.*-Überstand bildeten sich in der Outside-Out-Konfiguration etwa gleich viele Poren wie in der Whole-Cell-Konfiguration. Während es jedoch in der Whole-Cell-Konfiguration zu zahlreichen Porenschlüssen kam, waren diese Ereignisse in der Outside-Out-Konfiguration erheblich weniger häufig zu beobachten. Die relativen Häufigkeiten der Porenschlüsse in beiden Messkonfigurationen zeigt Abb. 18.

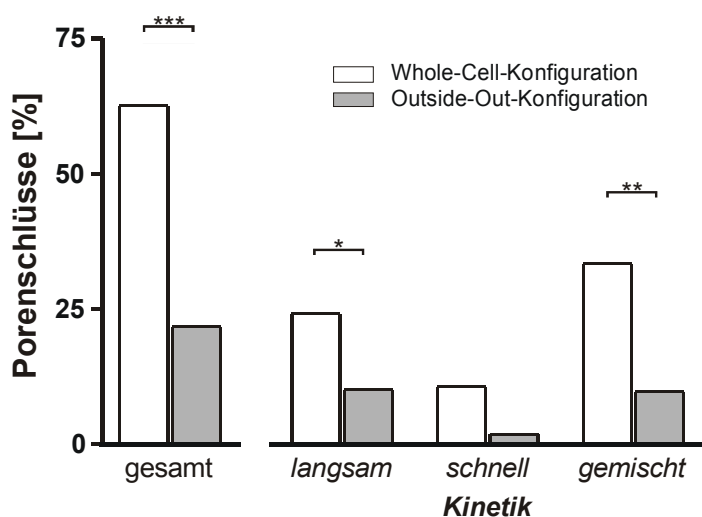


Abb. 18: Relative Häufigkeiten der Porenschlüsse in der Whole-Cell- und der Outside-Out-Konfiguration. Die Porenbildung wurde durch Applikation von *L.m.*-Überstand induziert. Um eine vergleichbare Porenbildung zu erzielen, wurde in der Whole-Cell-Konfiguration eine Verdünnung von 1:10.000 und in der Outside-Out-Konfiguration eine Verdünnung von 1:400 eingesetzt. In der Whole-Cell-Konfiguration wurden 50 Poren, in der Outside-Out-Konfiguration 51 Poren ausgewertet (jeweils an 18 verschiedenen Zellen).

Der Anteil der Porenschlüsse war in der Outside-Out-Konfiguration mit 22 % deutlich geringer als bei den Whole-Cell-Experimenten, in deren Verlauf sich 63 % der Poren schlossen ($p \leq 0,001$). Die gemischten Schlüsse nahmen dabei von 33 % auf 10 % ($p \leq 0,01$), die langsamen Schlüsse von 24 % auf 10 % ($p \leq 0,05$) und die schnellen Schlüsse von 11 % auf 2 % ab. Bei letzteren war die Ereigniszahl zu gering, um auf Signifikanz zu prüfen.

Die geringere Häufigkeit von Porenschlüssen bei Outside-Out-Messungen zeigt, dass die intakte Zelle offenbar eine wichtige Rolle beim Verschließen der durch LLO gebildeten Poren spielt und alle Formen der Verschlusskinetiken beeinflusst.

3.3.2 Membranverlagernder Transport

Die Ergebnisse der Experimente in der zellfreien Outside-Out-Konfiguration deuteten auf eine Beteiligung zellulärer Komponenten bei den Porenschlüssen hin. Um zu untersuchen, ob hierfür membranverlagernde Transportvorgänge verantwortlich sind, wurden in der Whole-Cell-Konfiguration Experimente an Erythrozyten durchgeführt, da diese kaum endo- und exozytotische Aktivität aufweisen.

Die Verwendung von Erythrozyten bei Patch-Clamp-Messungen ist schwierig, was vor allem

auf ihre geringe Größe und starke elastische Deformierbarkeit zurückzuführen ist. Sie werden daher leicht in die Patchpipette eingesogen. Um dies möglichst zu verhindern, wurden humane Erythrozyten eingesetzt, die mit etwa $7,5 \mu\text{m}$ einen größeren Durchmesser besitzen als Schafserythrozyten mit ca. $4,5 \mu\text{m}$. Zudem wurden Patchpipetten mit verengter Spitze verwendet, die dadurch auch einen höheren elektrischen Widerstand von $20\text{-}50 \text{ M}\Omega$ besaßen. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurde zunächst die Strom-/ Spannungsbeziehung der Membran humaner Erythrozyten bestimmt (Abb. 19).

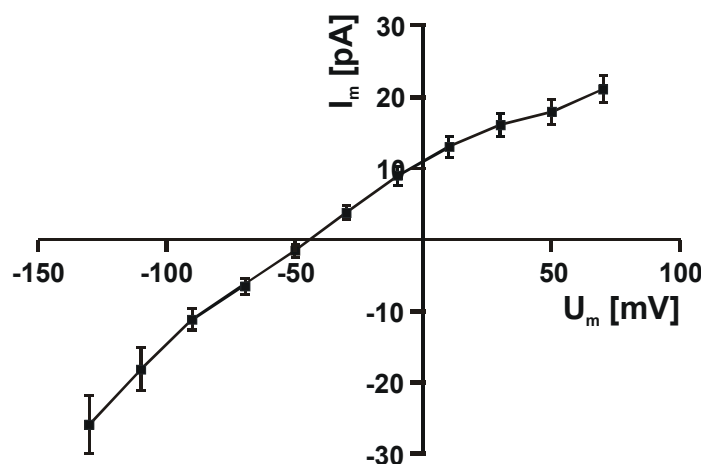


Abb. 19: Strom-/Spannungsbeziehung in der Whole-Cell-Konfiguration bei humanen Erythrozyten. Das Membranpotential wurde in 20 mV -Schritten für jeweils 400 ms von -130 auf $+70 \text{ mV}$ erhöht. Zwischen den einzelnen Spannungspulsen wurde das Membranpotential für 100 ms auf ein Haltepotential von -50 mV geklemmt. Als Extrazellulärlösung wurde E1-Lösung und als Intrazellulärlösung Istandard-Lösung verwendet ($n = 30$).

Die Membranströme der Erythrozyten zeigten in Abhängigkeit vom Membranpotential ein nahezu ohmsches Verhalten. Das Umkehrpotential lag im Mittel bei $-47 \pm 4 \text{ mV}$. Etwa 85% aller Erythrozyten zeigten bei einem Membranpotential von -50 mV endogene Ionenkanalaktivitäten. Die Stromamplituden dieser Ereignisse variierten stark und reichten von 4 pA bis zu etwa 40 pA . Die Offenzeiten dieser endogenen Ionenkanäle lagen üblicherweise unter 500 ms . Nur bei etwa 10% der gemessenen Erythrozyten waren längere Offenzeiten von mehreren Sekunden zu beobachten (Abb. 20).

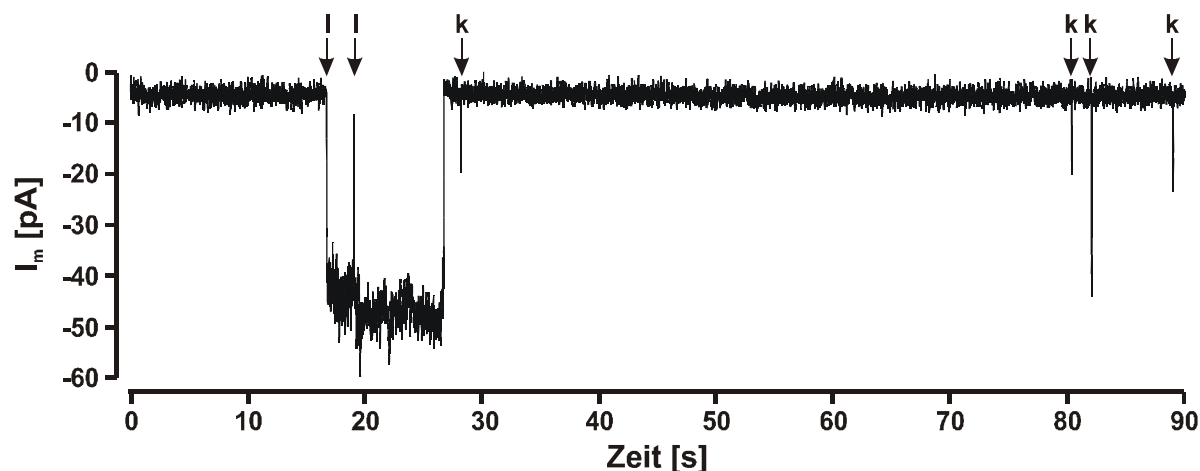


Abb. 20: Typischer Membranstrom eines humanen Erythrozyten in der Whole-Cell-Konfiguration bei -50 mV Membranpotential. Es zeigen sich endogene Ionenkanalaktivitäten mit langen Offenzeiten von mehreren Sekunden, hier mit „I“ gekennzeichnet und mit kurzen Offenzeiten unter 500 ms („k“).

Um Verwechslungen von endogenen Ionenkanalereignissen und LLO-Poren zu vermeiden, wurden zur Untersuchung von LLO-Poren nur solche Erythrozyten verwendet, die keine oder nur seltene Ionenkanalaktivitäten mit Offenzeiten unter 500 ms aufwiesen. Abbildung 21 zeigt nun Ausschnitte der Membranstromregistrierungen humaner Erythrozyten nach Applikation von LLO in zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

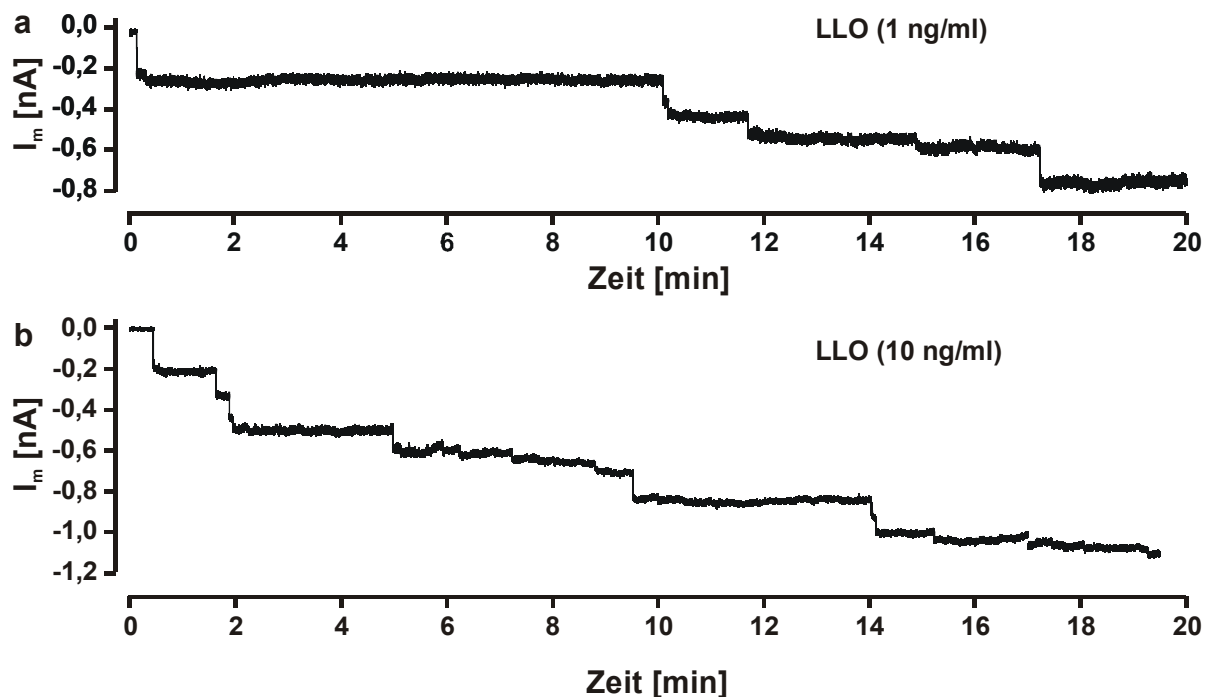


Abb. 21: Ausschnitte aus Membranstromregistrierungen von humanen Erythrozyten nach Applikation von 1 ng/ml (a) und 10 ng/ml (b) LLO. Die Messungen wurden in der Whole-Cell-Konfiguration bei einem Membranpotential von -50 mV unter Verwendung von E1- und Istandard-Lösung durchgeführt. Dargestellt ist der Stromverlauf innerhalb von 20 min nach Bildung der ersten Pore.

Im Vergleich mit Experimenten an HEK293-Zellen (Abb. 16) fällt das nahezu vollständige Fehlen von Porenschlüssen auf. Die Membranstrome verliefen bei einem Membranpotential von -50 mV treppenförmig ausschließlich in Richtung einer negativen Stromzunahme. Selbst bei einer LLO-Konzentration von 1 ng/ml (Abb. 21a), bei der sich nur wenige Poren öffneten, waren keine Porenschlüsse zu beobachten. Bei insgesamt 186 LLO-Poren an 17 verschiedenen Erythrozyten traten nur zwei langsame und zwei schnelle Porenschlüsse auf. Zusammen mit den Ergebnissen der Outside-Out-Messungen an HEK293-Zellen implizieren diese Beobachtungen, dass sich die Porenschlüsse nicht durch Eigenschaften der LLO-Moleküle selber erklären lassen. Die Zelle ist offenbar alleine für das Verschließen der LLO-Poren verantwortlich und eliminiert die Poren vermutlich durch Endo- oder Exozytosevorgänge aus der Zellmembran.

3.3.3 Caveolae-vermittelte Endozytose

Aufgrund der bisher vorgestellten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich bei den Porenschlüssen um einen membranverlagernden Transport handelt, bei dem die Poren von der Zelloberfläche eliminiert werden. Eine Unterform der Endozytose ist die Caveolae-vermittelte Endozytose. Caveolae sind cholesterolreiche, flaschenförmig eingestülpte Membranmikrodomänen, die in die Endozytose von Membrankomponenten und extrazellulären Liganden, aber auch von bestimmten Viren und bakteriellen Toxinen involviert sind (Pelkmans & Helenius 2002, Nabi & Le 2003).

Da für LLO eine Anreicherung in diesen Mikrodomänen nachgewiesen und eine Caveolae-vermittelte Internalisierung postuliert wurde (Coconnier et al. 2000), wurde nun untersucht, ob die Porenschlüsse auf Caveolae-vermittelter Endozytose beruhen könnten. Dazu wurden Patch-Clamp-Experimente mit murinen Neuroblastom-Zellen (Neuro-2a-Zellen) durchgeführt, da diese keine Caveolae besitzen. Abbildung 22 zeigt eine typische Membranstromregistrierung einer Neuro-2a-Zelle nach Applikation von LLO.

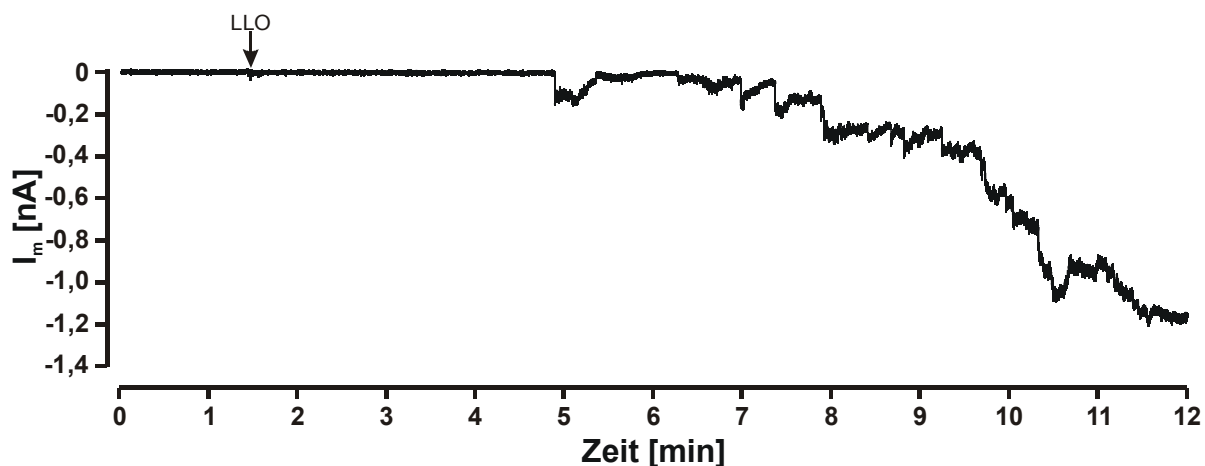


Abb. 22: Membranstromregistrierung einer Neuro-2a-Zelle nach Applikation von LLO (10 ng/ml) in der Whole-Cell-Konfiguration. Die Messung wurde bei einem Membranpotential von -50 mV unter Verwendung von E1-Lösung und I_{standard} -Lösung durchgeführt.

Trotz des Fehlens von Cavolae in Neuro-2a-Zellen waren bei diesem Zelltyp zahlreiche Schlüsse von LLO-Poren zu beobachten, die mit denen bei HEK293-Zellen vergleichbar waren (drei unabhängige Experimente an drei verschiedenen Zellen). Demnach ist die Caveolae-vermittelte Endozytose zumindest nicht essentiell bzw. hauptverantwortlich für die Elimination von LLO-Poren aus der Zellmembran.

3.3.4 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts

Das Aktin-Zytoskelett kann vesikuläre Transportvorgänge wie die Endo- und die Exozytose sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (McNeil 2002, Pelkmans 2002, Thomsen 2002). Um den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Porenschlüsse von LLO-Poren zu untersuchen, wurde Cytochalasin D eingesetzt. Dieses membrangängige Pilzgift lagert sich an die freien F-Aktin-Enden und verhindert die Assoziation und Dissoziation von Aktin-Monomeren (Cooper 1987).

HEK293-Zellen wurden vier Stunden vor Beginn der Messung bei 37 °C in E1-Lösung mit 20 µM Cytochalasin D und 0,2 % DMSO inkubiert. Um mögliche Effekte durch DMSO zu berücksichtigen, wurden Kontrollzellen für vier Stunden in E1-Lösung mit 0,2 % DMSO inkubiert. Abbildung 23 zeigt Ausschnitte aus den Membranstromregistrierungen einer Kontrollzelle und einer mit Cytochalasin D vorbehandelten Zelle nach Bildung der ersten LLO-Pore.

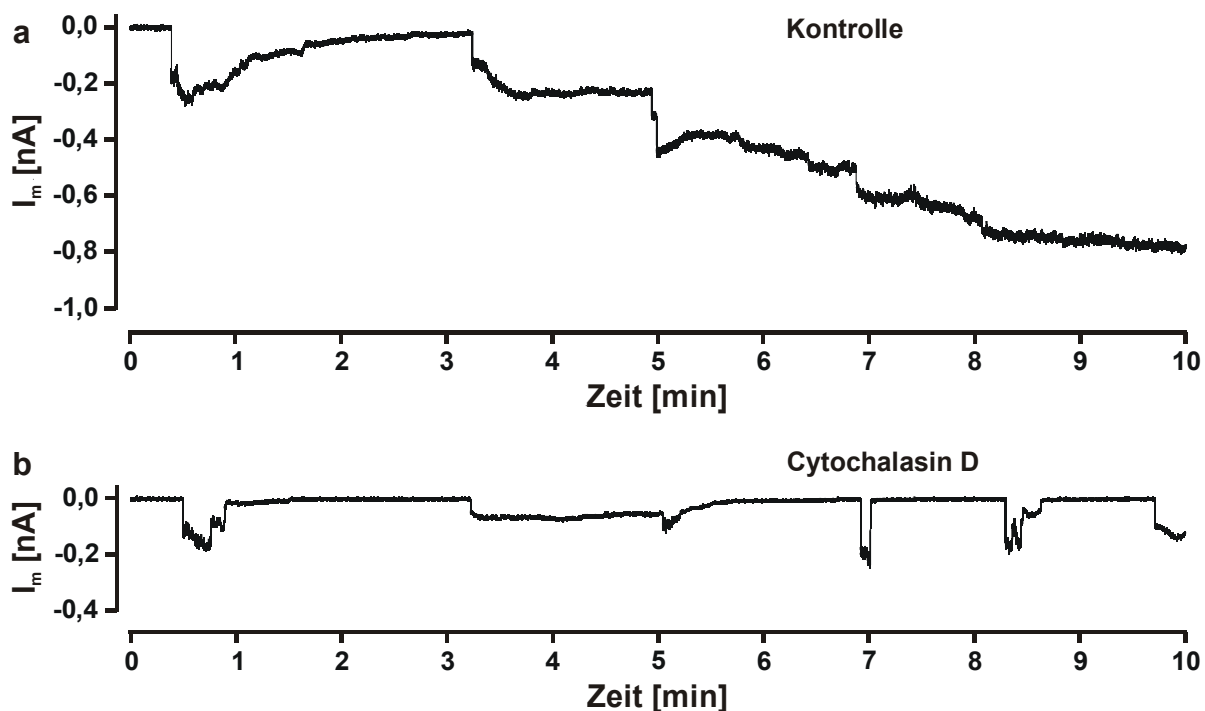


Abb. 23: Membranstromregistrierungen einer Kontrollzelle (a) und einer mit Cytochalasin D vorbehandelten HEK293-Zelle (b) nach Applikation von *L.m.*-Überstand (Verdünnung 1:10.000). Dargestellt ist jeweils ein 10-minütiger Ausschnitt des Membranstroms nach Bildung der ersten Pore bei einem Membranpotential von -50 mV. Die Cytochalasin D-Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C in E1-Lösung mit 0,2 % DMSO und 20 µM Cytochalasin D. Die Inkubation der Kontrollzellen wurde in E1-Lösung mit 0,2 % DMSO durchgeführt. Die Inkubationslösungen dienten auch als Badlösungen während der Messungen, intrazellulär wurde I_{standard}-Lösung verwendet.

Cytochalasin D hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Latenzzeit bis zur Bildung der ersten Pore und die Anzahl der Porenöffnungen (18 mit Cytochalasin D behandelte Zellen und 30 Kontrollzellen). Bei den mit Cytochalasin D vorbehandelten Zellen (Abb. 23b) kam es jedoch zu weitaus mehr Porenschlüssen als bei den Zellen in Kontrollversuchen (Abb. 23a). Der Einfluss von Cytochalasin D auf die Häufigkeiten der Porenschlüsse ist in Abb. 24 dargestellt.

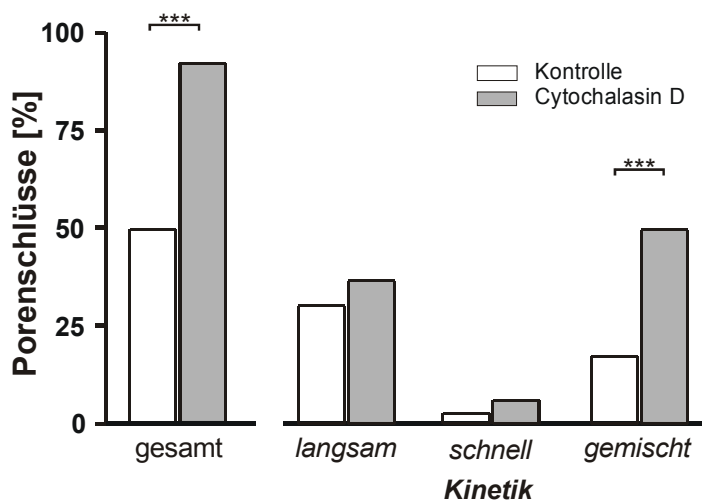


Abb. 24: Der Einfluss von Cytochalasin D auf die relative Häufigkeit der LLO-Porenschlüsse nach Applikation von *L.m.*-Überstand (1:10.000 verdünnt) an HEK293-Zellen. Die Zellen wurden für 4 h mit 20 μ M Cytochalasin D und 0,2 % DMSO vorbehandelt (52 Porenöffnungen bei 18 Zellen). Die Kontrollzellen wurden lediglich mit 0,2 % DMSO inkubiert (100 Porenöffnungen bei 30 Zellen).

Der Anteil von Porenschlüssen stieg von 50 % (Kontrollzellen) hochsignifikant auf 92 % bei mit Cytochalasin D vorbehandelten Zellen. Besonders deutlich war die Zunahme der gemischten Schlüsse von 17 auf 50 %. Die Zunahmen der langsamen Schlüsse von 30 % auf 37 % und der schnellen Porenschlüsse von 3 % auf 6 % waren nicht signifikant. Die Ergebnisse implizieren, dass ein intaktes Aktin-Zytoskelett für das Schließen der LLO-Poren hinderlich ist.

3.3.5 Einfluss von Ca^{2+} -Ionen

Exo- und Endozytose, die auch als membranverlagernde Transportvorgänge zusammengefasst werden, sind häufig mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration assoziiert (Porat & Elazar 2000). Da LLO-Poren für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind (Repp et al. 2002), liegt die Vermutung nahe, dass die Porenschlüsse durch einströmendes Ca^{2+} vermittelt werden, indem es die exozytotische oder endozytotische Aktivität der Zelle erhöht.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Messungen an HEK293-Zellen unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde $\text{E}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung als Badlösung verwendet. Dieser war im Gegensatz zur E1-Lösung kein CaCl_2 zugesetzt. Um

eventuell vorhandene Spuren von Ca^{2+} zu chelatieren, enthielt die $E_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung 1 mM EGTA. Als Intrazellulärlösung wurde weiterhin I_{standard} -Lösung verwendet. Um zu testen, ob ein zusätzlich intrazellulär Ca^{2+} -freies Milieu einen anderen Effekt erzielt, wurden außerdem Versuche mit $E_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung und $I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung verwendet.

Abbildung 25 zeigt Membranstromregistrierungen von HEK293-Zellen nach Applikation von LLO bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 25a), unter nur extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen (Abb. 25b) und unter extra- und intrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen.

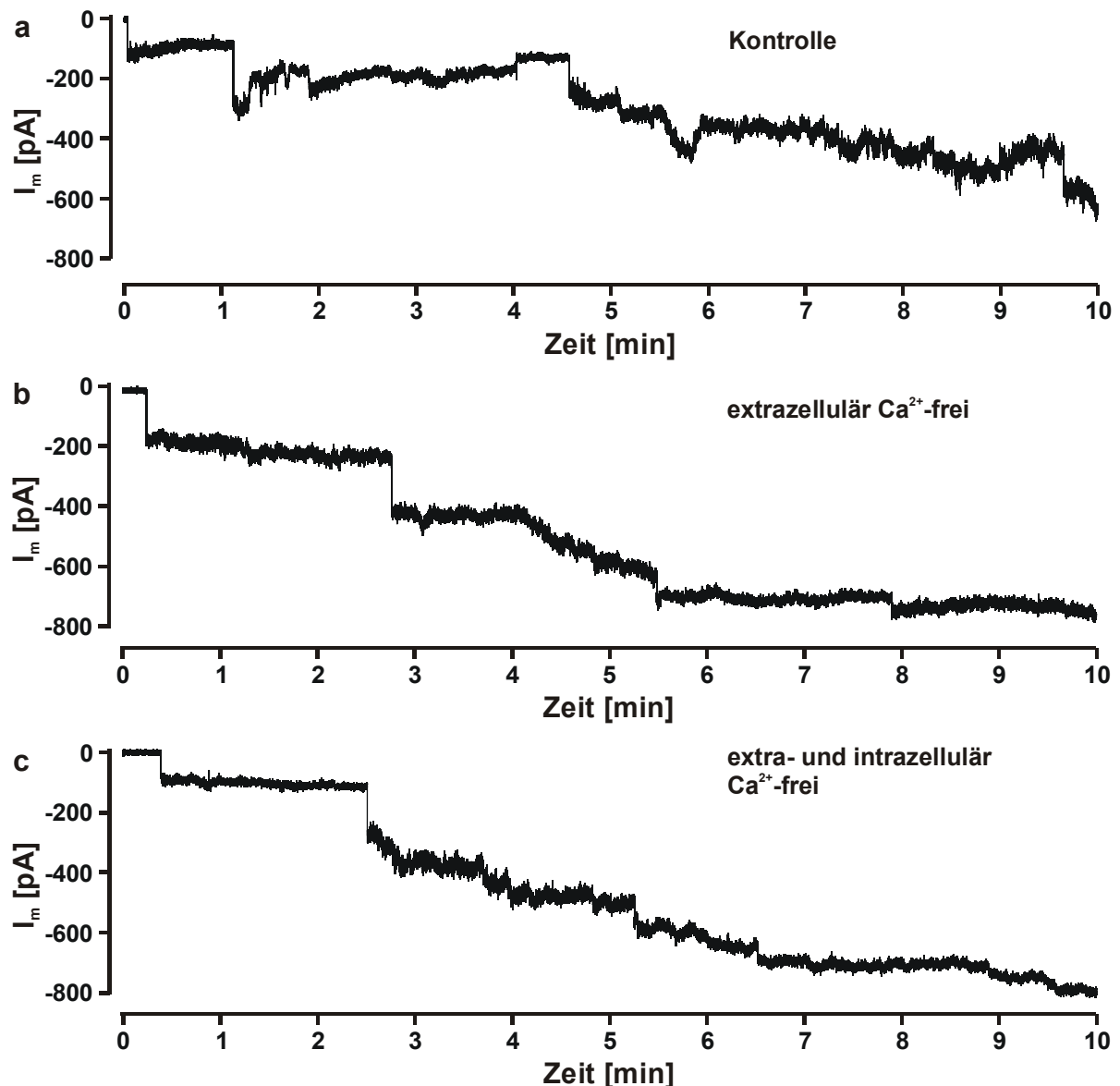


Abb. 25: Membranstromregistrierungen von drei HEK293-Zellen nach Applikation von Listeriolysin O (2 ng/ml) bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration (a), unter nur extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen (b) und unter extra- und intrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen (c). Gemessen wurde bei einem Membranpotential von -50 mV unter Verwendung von E_1 - und I_{standard} -Lösung (a), $E_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ - und I_{standard} -Lösung (b) bzw. $E_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ - und $I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung (c)

Auch in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen führte die Applikation von LLO zur Bildung von Membranporen, und die Latenzzeit bis zur Bildung der ersten Pore wurde durch das extra- und/oder intrazelluläre Fehlen von Ca^{2+} nicht beeinflusst (jeweils $n = 8$). Unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen (Abb. 25b) waren jedoch deutlich weniger Porenschlüsse zu beobachten als bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 25a). Das zusätzliche Schaffen intrazellulär Ca^{2+} -freier Bedingungen brachte gegenüber nur extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 25c). Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden die relativen Häufigkeiten der Porenschlüsse berechnet (Abb. 26).

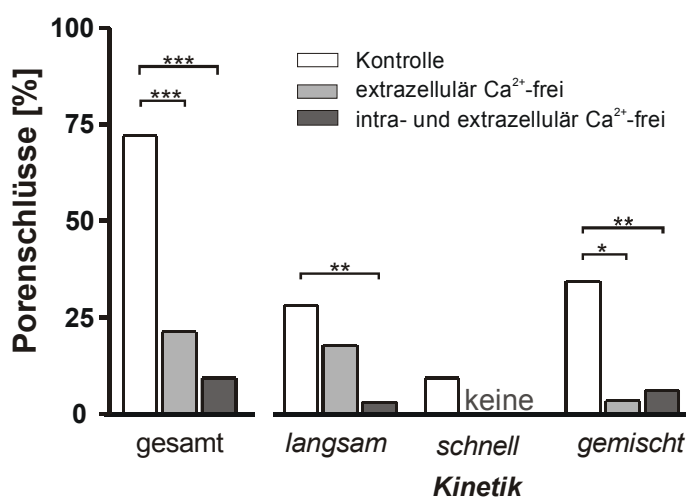


Abb. 26: Häufigkeit der Porenschlüsse bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration ($n = 32$ an 8 Zellen), unter nur extrazellulär ($n = 28$ an 7 Zellen) und unter intra- und extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen ($n = 32$ an 8 Zellen). Die Porenbildung wurde durch Applikation von LLO (2 ng/ml) induziert. Für Ca^{2+} -freie Bedingungen wurde extrazellulär $\text{E}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung und intrazellulär $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ -Lösung verwendet. Für physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen kamen E1 -Lösung und $\text{I}_{\text{standard}}$ -Lösung zum Einsatz.

Unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen war die Häufigkeit der Porenschlüsse hochsignifikant von 72 % (Kontrolle) auf 21 % reduziert ($p \leq 0,001$). Im Einzelnen verringerte sich die Häufigkeit der gemischten Schlüsse von 34 % auf 4 % ($p \leq 0,05$) und der langsamen Schlüsse von 28 % auf 18 % ($p \leq 0,01$). Schnelle Porenschlüsse, wie sie bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration bei 9 % der offenen Poren beobachtet wurden, traten unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen nicht auf. Bei zusätzlicher Verwendung von Ca^{2+} -freier Intrazellulärlösung wurden die Häufigkeiten der einzelnen Porenschlüsse nicht mehr signifikant weiter verringert (9 % Schlüsse insgesamt, davon 6 % gemischte, 3 % langsame und keine schnellen Schlüsse). Demnach spielen durch die LLO-Poren von außen in die Zelle einströmende Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Porenschlüsse, unabhängig davon, welcher Stromkinetik diese Schlüsse folgen.

3.4 Rolle der Phospholipasen C bei der Porenbildung

L. monocytogenes produziert zwei Enzyme mit Phospholipase C- (PLC-)Aktivität, die als PlcA und PlcB bezeichnet werden. Mutanten, denen diese Phospholipasen fehlen (*L.m.* Δ *plcAplcB*), können sich schlechter aus dem Primärphagosom befreien und von Zelle zu Zelle verbreiten und sind weniger virulent. Daher wird eine LLO-unterstützende Funktion dieser Enzyme diskutiert (Vazquez-Boland et al. 2001). Daher wurde die porenbildende Wirkung des *L.m.*-Überstands und des Δ *plcAplcB*-Überstands verglichen (Abb. 27).

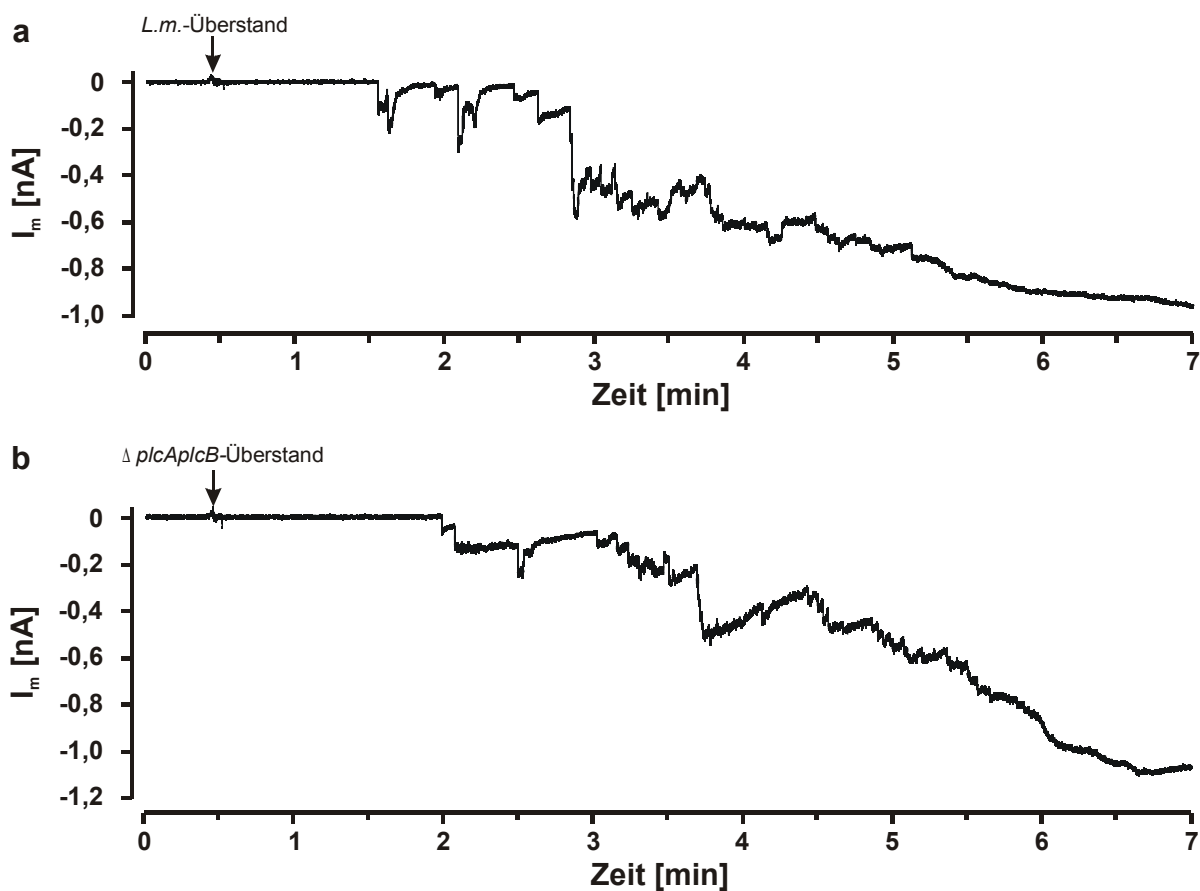


Abb. 27: Membranströme zweier HEK293-Zellen nach Applikation von *L.m.*-Überstand mit (a) und ohne die listeriellen Phospholipasen C (Δ *plcAplcB*-Überstand) (b). Das Membranpotential betrug -50 mV und die Überstände wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Die Applikation der beiden Überstände in einer Verdünnung von 1:200 induzierte bei HEK293-Zellen jeweils innerhalb von 1-2 Minuten die erste Porenöffnung, und bezüglich des Verlaufs der porenbildenden Wirkung waren keine Unterschiede zu erkennen.

Um genauer zu untersuchen, ob die listeriellen Phospholipasen PlcA und PlcB Einfluss auf die LLO-Porenbildung haben, wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Hierbei wurde für den *L.m.*-Überstand und den Δ *plcAplcB*-Überstand in Verdünnungen von 1:20 bis

1:20.000 die Nettoladung q_m bestimmt, die nach Bildung der ersten Pore innerhalb einer Minute die Membran passierte (Abb. 30).

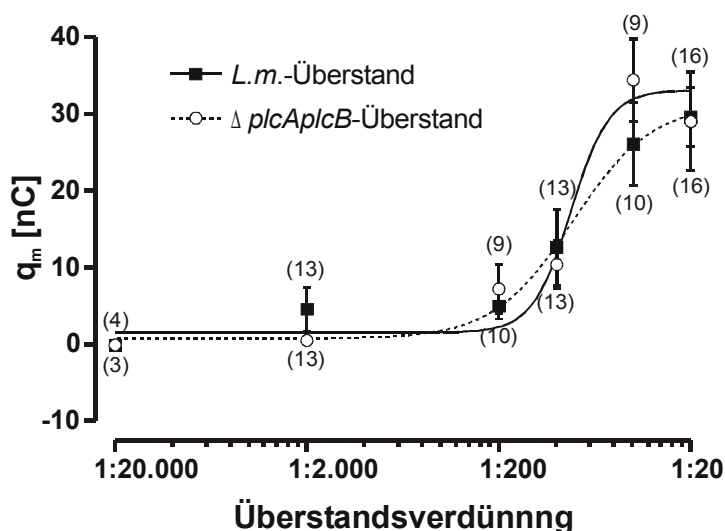


Abb. 28: Konzentrations-Wirkungskurven zur porenbildenden Wirkung von *L.m.*-Überstand mit und ohne die Phospholipasen PlcA und PlcB ($\Delta plcAplcB$ -Überstand). Als Parameter für die Porenbildung diente die Ladung q_m , die nach Bildung der ersten Pore während einer Minute die Zellmembran passierte. Die Anzahl der Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. Das Membranpotential betrug -50 mV. Die Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26) an die Messdaten angepasst.

Bei keiner der eingesetzten Verdünnungen gab es signifikante Unterschiede hinsichtlich der q_m -Werte. Mit Hilfe der Hill-Gleichung wurde jeweils ein maximaler Nettoladungsfluss von ca. 30 nC ermittelt, wobei der EC_{50} -Wert bei einer Überstandsverdünnung von ca. 1:80 lag. Die Phospholipasen PlcA und PlcB haben demnach keine unterstützende Funktion bei der Porenbildung durch LLO von der extrazellulären Seite.

3.5 Thiol-Aktivierung von Listeriolysin O

Cholesterolabhängige Zytolysine (CDC = cholesterol deendent cytolysins), zu denen LLO gehört, wurden früher als „thiol-activated cytolysins“ bezeichnet, da ihre hämolytische Wirkung durch Thiole und andere reduzierende Stoffe verstärkt wird (Billington et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die aktivierende Wirkung von Thiolen auf der Ebene der LLO-Porenbildung, der Hämolyse und der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen untersucht.

3.5.1 Thiol-Aktivierung der porenbildenden Wirkung

Exemplarisch wurden aufgrund seiner physiologischen Relevanz L-Cystein und wegen seiner verbreiteten pharmakologischen Anwendung N-Acetyl-Cystein (NAC) verwendet. Die jeweils angegebenen Thiol-Konzentrationen waren von Beginn der Experimente an in der

Badlösung enthalten und wurden unmittelbar vor der Applikation auch der Toxinlösung zugegeben. In Vorversuchen wurde ein Eigeneffekt der Thiole auf die Membranströme von HEK293-Zellen bis zu einer Konzentration von 10 mM ausgeschlossen. Abbildung 29 zeigt Membranstromregistrierungen von HEK293-Zellen nach Applikation von LLO (10 ng/ml) ohne Anwesenheit von Thiolen (Abb. 29a) und in Anwesenheit von 1 mM L-Cystein (Abb. 29b) bzw. 1 mM NAC (Abb. 29c).

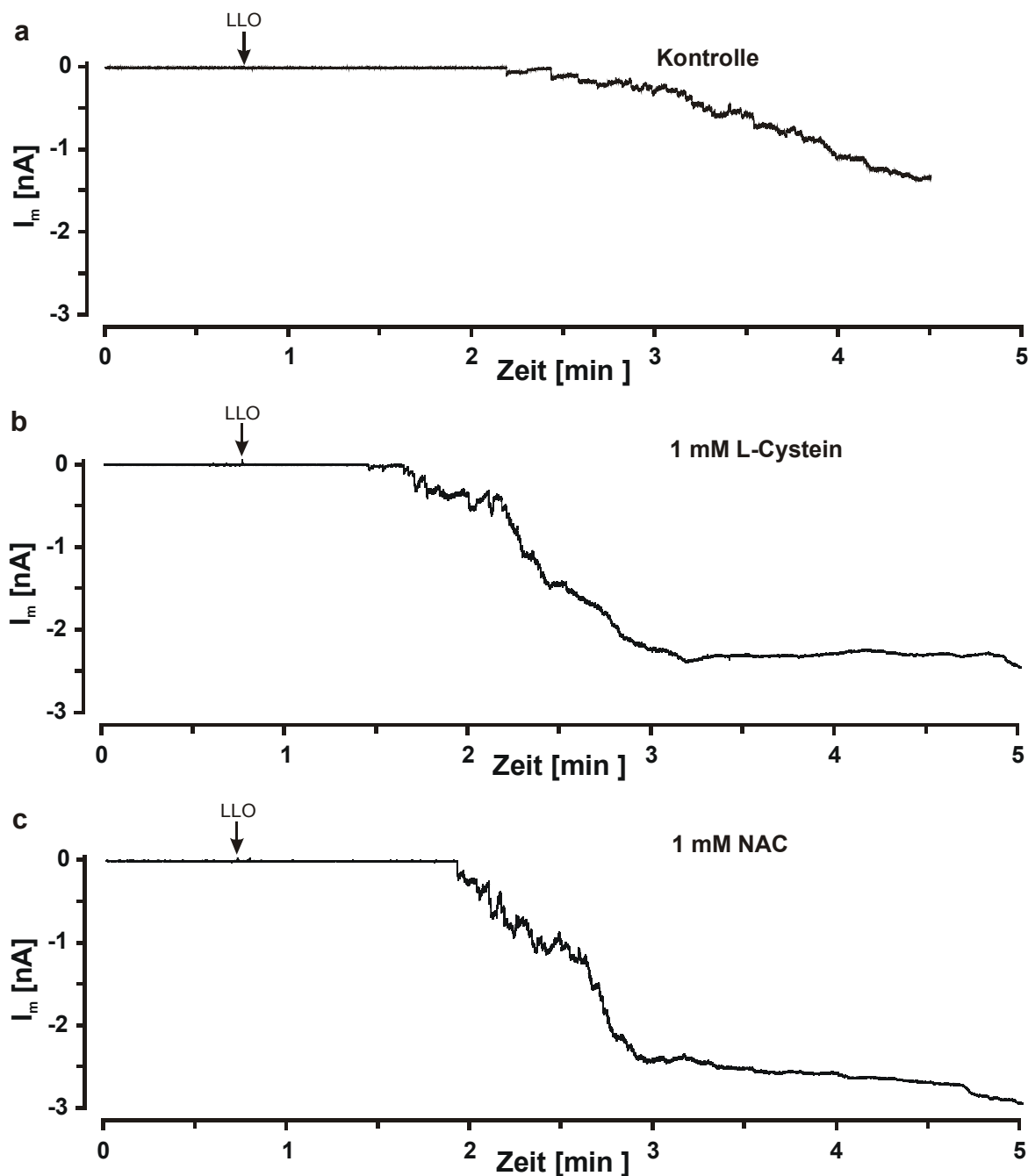


Abb. 29: Membranströme von HEK293-Zellen nach Applikation von LLO (10 ng/ml) ohne (a) und unter Einfluss von (b) 1 mM L-Cystein und (c) 1 mM NAC. Die Messungen wurden bei einem Membranpotential von -50 mV durchgeführt.

In Anwesenheit der Thiole war eine stärkere Zunahme des Membranstroms zu beobachten als unter Kontrollbedingungen. Wurden Thiole erst nach Bildung der ersten Poren appliziert, so war keine stärkere Zunahme des Membranstroms zu erkennen als ohne Thiole (ohne Abbildung). Abbildung 30 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven für die Verstärkung der porenbildenden Wirkung von LLO (10 ng/ml; 180 pM).

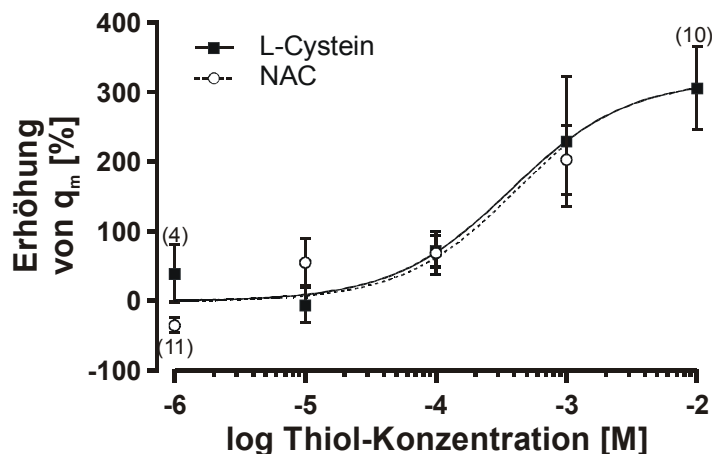


Abb. 30: Erhöhung der porenbildenden Wirkung von LLO (10 ng/ml) in Abhängigkeit von der Thiol-Konzentration. Als Mess-parameter diente die Nettoladung q_m , die bei einem Membranpotential von -50 mV innerhalb einer Minute nach Bildung der ersten Pore über die Membran floss ($n = 15$, sofern nicht anders angegeben). Die Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26) an die Messdaten angepasst. Die Nettoladung q_m , die bei alleiniger LLO-Applikation floss, entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate)

Die porenbildende Wirkung von LLO wurde sowohl durch L-Cystein als auch durch NAC in mikromolaren Konzentrationen erhöht und erreichte ihr Maximum bei millimolaren Thiol-Konzentrationen. Bis zu einer Konzentration von 1 mM war die Wirkung beider Thiole identisch. Überraschend war, dass es bei NAC-Konzentrationen von 10 mM in einem Beobachtungszeitraum von mindestens 20 und maximal 60 min in 7 von 9 Experimenten zu keiner Porenbildung kam. Diese Konzentration wurde beim Erstellen der Konzentrations-Wirkungskurve nicht berücksichtigt. Zur Anpassung der Konzentrations-Wirkungskurve für NAC wurde der Maximalwert von 418 % angenommen, der sich aus der Kurve für L-Cystein ergab. Damit ergaben sich EC_{50} -Werte von $374 \pm 156 \mu\text{M}$ L-Cystein und $416 \pm 164 \mu\text{M}$ NAC und Hillkoeffizienten von $1,0 \pm 0,4$ für beide Thiole. L-Cystein und NAC haben demnach die gleiche verstärkende Wirkung auf die LLO-Porenbildung. Die Hill-Koeffizienten deuten darauf hin, dass es sich bei der Thiol-Aktivierung um eine 1:1-Reaktion handeln könnte.

Da es bei NAC-Konzentrationen von 10 mM teilweise zu keiner Porenbildung kam, wurde in weiteren Experimenten überprüft, ob NAC als Porenblocker wirken kann. Dazu wurde NAC nach der Bildung von LLO-Poren in einer Konzentration von 10 mM in die Badlösung appliziert. Der LLO-induzierte Membranstrom wurde dadurch jedoch nicht inhibiert.

Um festzustellen, Thiole die Geschwindigkeit der Porenbildung beeinflussen, wurden die Latenzzeiten zwischen LLO-Applikation und dem Auftreten der ersten Porenöffnung bestimmt (Abb. 31).

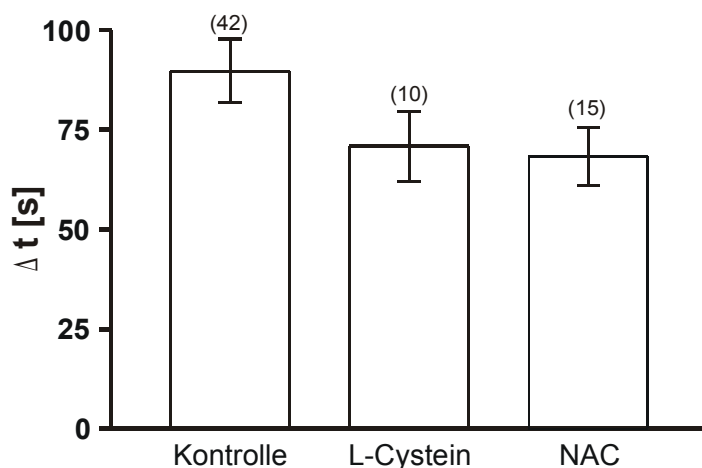


Abb. 31: Latenzzeiten Δt zwischen Applikation von LLO (10 ng/ml) und Auftreten der ersten Pore ohne Thiole und in Gegenwart von 1 mM L-Cystein bzw. NAC.

Die Zeit zwischen LLO-Applikation (10 ng/ml) und Auftreten der ersten Pore betrug unter Kontrollbedingungen 90 ± 8 s, in Anwesenheit von 1 mM L-Cystein 71 ± 9 s und unter 1 mM NAC 68 ± 7 s. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Demnach beeinflussen Thiole nicht die Geschwindigkeit der ersten Porenbildung.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich unter dem Einfluss der Thiole die Stromamplituden der LLO-Poren veränderten und der Nettoladungsfluss auf diese Weise erhöht wurde. Hierfür wurden jeweils die Stromamplituden der maximal zehn ersten gebildeten Poren jeder Messung bestimmt. Abbildung 32 zeigt die kumulativen Häufigkeiten der Porenstromamplituden unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Thiolen.

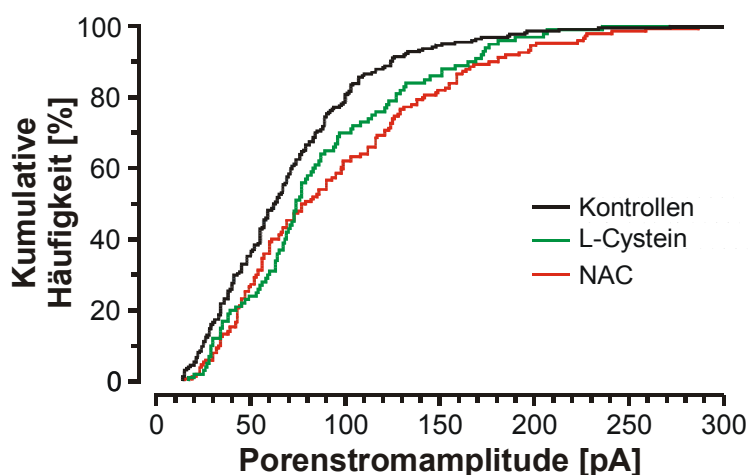


Abb. 32: Kumulative Häufigkeiten der Porenstromamplituden unter Kontrollbedingungen ($n = 224$ an 23 Zellen) und unter Einfluss von 1 mM L-Cystein ($n = 100$ an 10 Zellen) und NAC ($n = 150$ an 15 Zellen). Die Porenbildung wurde durch Applikation von LLO (10 ng/ml) induziert. Das Membranpotential betrug -50 mV.

Die Darstellung der kumulativen Häufigkeiten zeigt bereits, dass sich die Porenstromamplituden in Anwesenheit von Thiolen anders verteilen als unter Kontrollbedingungen. Um zu verdeutlichen, wie diese kumulativen Häufigkeiten zustandekommen, sind die Verteilungen der einzelnen Porenstromamplituden in Abb. 33 nochmals für jede Bedingung in einem klassischen Amplitudenhistogramm dargestellt.

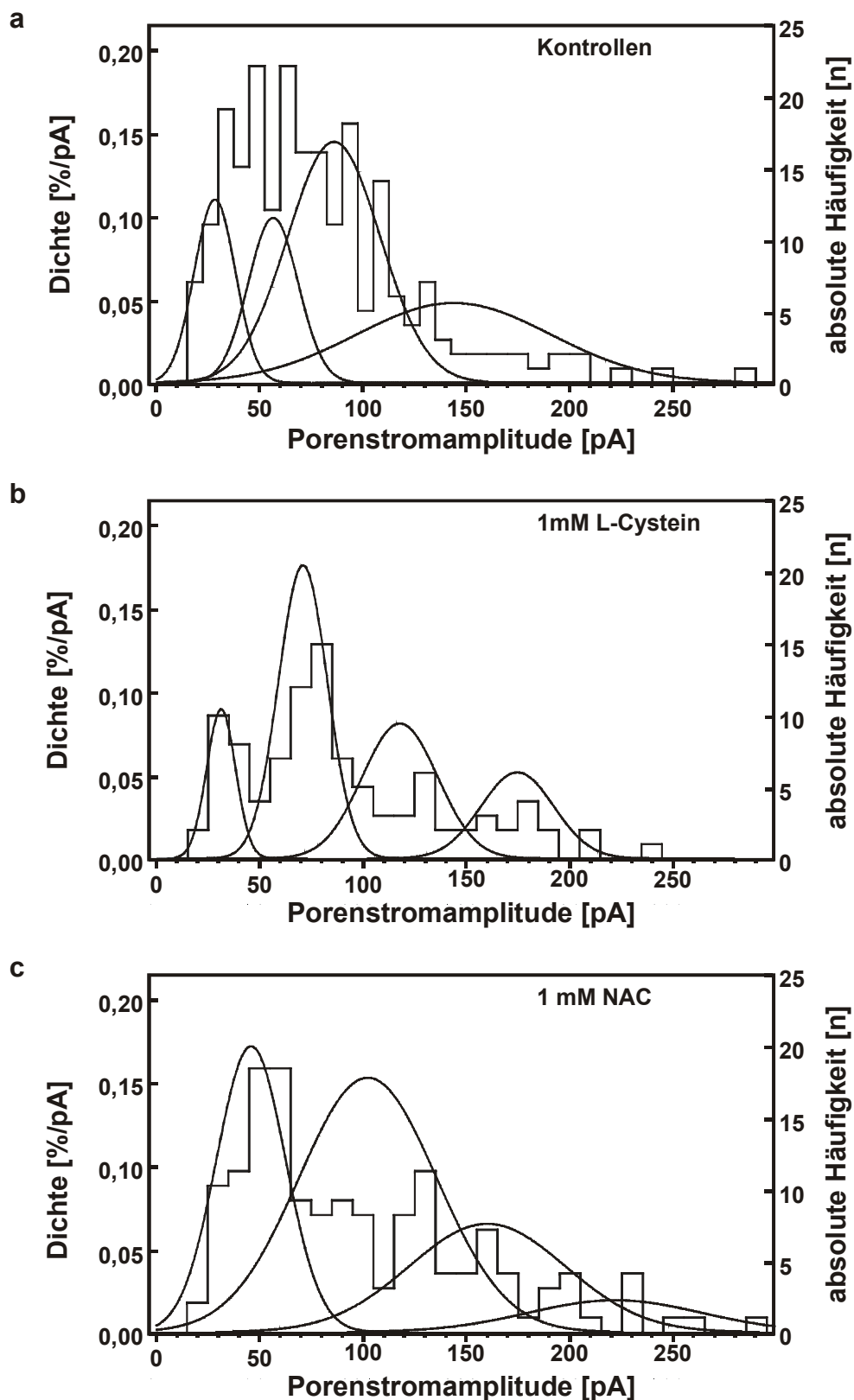


Abb. 33 Amplitudenhistogramm der Porenströme nach Applikation von LLO (10 ng/ml) unter Kontrollbedingungen (a, $n = 224$), in Anwesenheit von 1 mM L-Cystein (b, $n = 100$) und in Anwesenheit von 1 mM NAC (c, $n = 150$). Die Abszisse zeigt die Porenstromamplituden, die rechte Ordinate deren absolute Häufigkeit bei einer Klassenbreite von 10 pA. Die linke Ordinate zeigt die Dichte der angepassten Normalverteilungen. Das Membranpotential betrug -50 mV.

Die rechten Ordinaten zeigen die absolute Häufigkeit für die vorgegebenen Klassen von Porenstromamplituden. Die Klassenbreite wurde auf 10 pA festgelegt. Die linken Ordinaten beziehen sich auf die Dichtefunktionen, die aus der Anpassung einer Summe von kumulativen Normalverteilungen an die kumulativen Häufigkeitsverteilungen angepasst wurden. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Einfluss von Thiolen lagen die beobachteten Porenstromamplituden im Bereich zwischen 14 und 290 pA. Unter allen drei Bedingungen wurden je vier Häufigkeitsgipfel ermittelt. Diese lagen für die Kontrollmessungen bei 28 ± 1 pA, 57 ± 2 pA, 86 ± 2 pA und 144 ± 9 pA. Da die letzten drei Werte jeweils Vielfache des ersten Wertes von 28 ± 1 pA darstellen, scheint es sich hierbei um das gleichzeitige Öffnen mehrerer Grundporen zu handeln. In Anwesenheit von 1 mM L-Cystein bzw. 1 mM NAC waren Häufigkeitsmaxima zu höheren Amplituden hin verschoben. Für L-Cystein ergaben sich maximale Dichten bei 31 ± 1 pA, 71 ± 2 pA, 118 ± 4 pA und 175 ± 5 pA und für NAC bei 46 ± 2 pA, 102 ± 4 pA, 160 ± 8 pA und 222 ± 16 pA. Der über alle Poren gemessene Mittelwert der Stromamplituden erhöhte sich dabei von 71 ± 3 pA (Kontrollen) auf 86 ± 5 pA (1 mM L-Cystein) bzw. 94 ± 5 pA (1 mM NAC).

Die Verteilungen der Porenstromamplituden bei 1 mM L-Cystein und 1 mM NAC erwiesen sich im Kolmogoroff-Smirnoff-Omnibus-Test jeweils als signifikant verschieden von der Verteilung unter Kontrollbedingungen. Untereinander waren sie jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Thiole scheinen demnach das Auftreten von höheren Porenstromamplituden zu begünstigen.

Die Erhöhung der Porenstromamplituden würde bei Thiol-Konzentrationen von 1 mM eine Verstärkung des LLO-induzierten Ladungsflusses um ca. 30 % erklären. Allerdings wurde der Ladungsfluss durch diese Thiol-Konzentration (1 mM) tatsächlich um ca. 200 % verstärkt (Abb. 30). Daher wurde nach weiteren Parametern gesucht, die durch Thiole beeinflusst werden könnten. Es konnte jedoch weder ein signifikanter Einfluss auf die Häufigkeit von Porenöffnungen noch auf die Häufigkeit von Porenschlüssen festgestellt werden. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass die Thiole die Offenzeiten der Poren verlängern könnten. Da bei den Messungen jedoch ein Großteil der offenen Poren von mehreren nachfolgenden Porenströmen überlagert wird, ist die Zuordnung von Porenschlüssen zu den zugehörigen Porenöffnungen und damit eine Bestimmung der Porenoffenzeiten oft nicht möglich.

3.5.2 Thiol-Aktivierung der hämolytischen Wirkung

Mithilfe der nächsten Experimente sollte geklärt werden, inwiefern die Thiol-Aktivierbarkeit von LLO bei der Porenbildung und bei der Hämolyse miteinander korrelieren. Dafür wurde die hämolytische Wirkung von LLO (300 ng/ml; 5,4 nM) bei steigenden Thiol-Konzentrationen ermittelt. Die Thiole wiesen in den verwendeten Konzentrationen in Abwesenheit von LLO keine hämolytische Wirkung auf. Abbildung 34 zeigt die Verstärkung der LLO-induzierten Hämolyse bei Thiol-Konzentrationen zwischen 1 μ M und 10 mM.

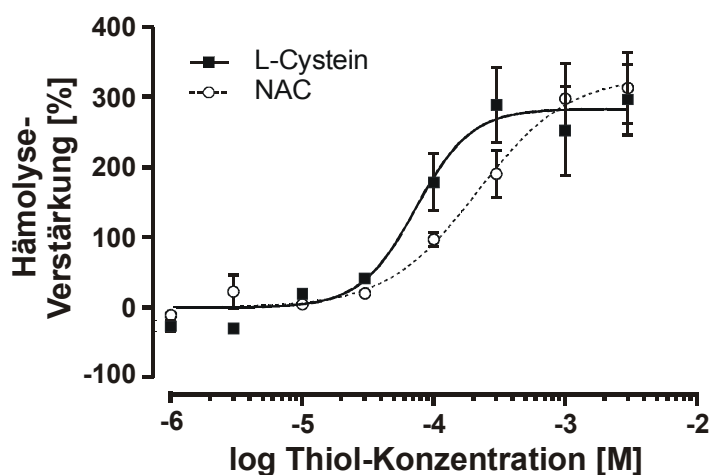


Abb. 34: Verstärkung der hämolytischen Wirkung von LLO (300 ng/ml) in Abhängigkeit der Konzentrationen von L-Cystein und NAC (3 unabhängige Messungen mit jeweils Dreifachbestimmung). Mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26) wurden die Konzentrations-Wirkungskurven an die Messdaten angepasst. Die hämolytische Wirkung von LLO (300 ng/ml) in Abwesenheit entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate.

Die Hämolyse wurde durch L-Cystein und NAC in ähnlicher Weise verstärkt, wobei NAC jedoch eine höhere Potenz aufwies. Die Maximaleffekte lagen bei $283 \pm 17\%$ (L-Cystein) bzw. $330 \pm 17\%$ (NAC) Verstärkung gegenüber der LLO-induzierten Hämolyse ohne exogene Thiole. Der halbmaximale Effekt wurde bei Thiol-Konzentrationen von $73 \pm 18\ \mu\text{M}$ L-Cystein bzw. $216 \pm 43\ \mu\text{M}$ NAC erreicht, wobei sich die 95 %-Konfidenzintervalle der beiden EC_{50} -Werte nicht überschneiden. Die Hill-Koeffizienten der Konzentrations-Wirkungskurven betragen $2,1 \pm 0,7$ (L-Cystein) und $1,3 \pm 0,2$ (NAC).

Da bei Patch-Clamp-Experimenten beobachtet wurde, dass NAC-Konzentrationen von 10 mM eine Porenbildung verhindern, wurde der Hämolyseversuch einmalig mit 10 mM NAC durchgeführt. Hierbei wurde etwa dieselbe hämolytische Wirkung von LLO beobachtet wie bei Kontrollexperimenten ohne Thiole. Diese Konzentrationen wurden jedoch bei der in Abb. 33 gezeigten Konzentrations-Wirkungskurve nicht berücksichtigt. Dass die Aktivierbarkeit der LLO-Wirkung sowohl bei Hämolyseversuchen als auch bei Patch-Clamp-Versuchen nur bei Konzentrationen unter 10 mM NAC zu beobachten war, unterstreicht nochmals den direkten Zusammenhang zwischen der porenbildenden und hämolytischen Wirkung von LLO.

3.5.3 Einfluss von Thiolen auf die Invasionsfähigkeit von *Listeria monocytogenes*

LLO spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen und ihrer anschließenden Befreiung aus den Phagosomen (Bielecki et al. 1990). Um zu untersuchen, ob die Thiol-Aktivierbarkeit von LLO hierbei von Bedeutung ist, wurde in Invasionsexperimenten überprüft, ob Thiole einen Einfluss auf die Invasionsrate von Listerien haben. Dazu wurde unmittelbar vor der Infektion von HEp-2-Zellen dem Zellkultur-Medium L-Cystein bzw. NAC zugesetzt. Abbildung 35 zeigt die Verstärkung der Invasionsraten bei verschiedenen Thiol-Konzentrationen.

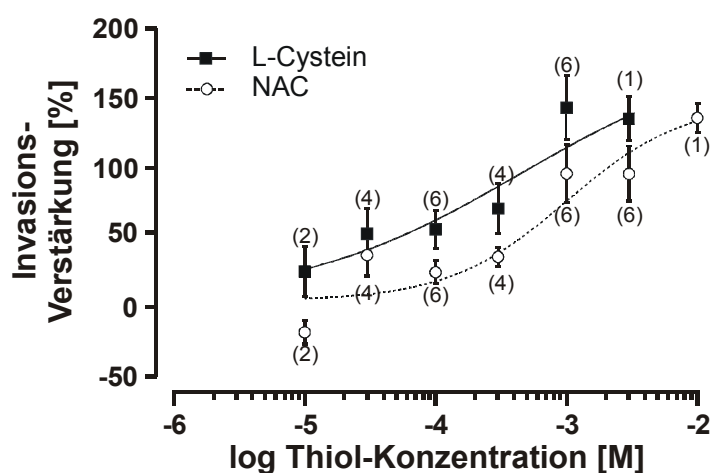


Abb. 35: Verstärkung der Invasionsrate von *L. monocytogenes* in HEp2-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von L-Cystein und NAC. Die Zellen wurden bei verschiedenen Thiol-Konzentrationen mit einem Listerien-Inoculum inkubiert. Die Anzahl der Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. Die Invasion, die ohne den Einfluss exogener Thiole erzielt wurde, entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate.

Die Invasionsrate wurde bereits durch mikromolare Thiol-Konzentrationen verstärkt und ließ sich durch millimolare Konzentrationen mehr als verdoppeln. Thiole haben demnach einen maßgeblichen Einfluss auf den Invasionserfolg von *L. monocytogenes* und könnten daher eine relevante Rolle bei der Entstehung oder Prognose einer Listeriose spielen. Die Verstärkungswirkung von L-Cystein und NAC war bei keiner der untersuchten Thiol-Konzentrationen signifikant verschieden.

Tabelle 4 fasst die Parameter der Thiol-Aktivierung von LLO bei der Porenbildung, Hämolyse und Invasion nochmals zusammen.

Tab. 4: Verstärkung verschiedener LLO-Effekte durch Thiole

LLO-Effekt	Maximale Verstärkung [%]		EC ₅₀ [µM]	
	L-Cystein	NAC	L-Cystein	NAC
Membranporen (Nettoladungsfluss)	318 ± 41	Festgesetzt auf 318 (vgl. Abschnitt 3.5.2)	374 ± 154	416 ± 164
Hämolyse	283 ± 17	330 ± 17	73 ± 18	216 ± 43
Invasion	≈ 180	≈ 140	≈ 450	≈ 1002

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Wirkung von LLO nicht nur auf der Ebene der Hämolyse, sondern auch auf der Ebene der bei sublytischen LLO-Konzentrationen gebildeten LLO-Poren, die in den Patch-Clamp-Versuchen bestimmt wurden, durch Thiole etwa vervierfachen lässt. Während die EC_{50} -Werte bei Patch-Clamp-Experimenten bei $374 \pm 154 \mu\text{M}$ (L-Cystein) und $416 \pm 164 \mu\text{M}$ (NAC) lagen, betragen sie bei der Hämolyse $73 \pm 18 \mu\text{M}$ bzw. $216 \pm 43 \mu\text{M}$. Die höhere Potenz der Thiole bei der Hämolyse könnte durch das Fehlen von Reparaturmechanismen bei den Erythrozyten zu erklären sein oder sich auf die höheren LLO-Konzentrationen in den Hämolyseversuchen zurückführen lassen. Es ist zu beachten, dass sich die EC_{50} -Werte von L-Cystein und NAC in Hämolyseversuchen signifikant unterschieden, in den Patch-Clamp-Experimenten jedoch nicht. Die Hill-Koeffizienten lagen bei Patch-Clamp-Experimenten bei $1,0 \pm 0,4$ und bei der Hämolyse mit $2,1 \pm 0,7$ (L-Cystein) bzw. $1,3 \pm 0,2$ (NAC) wenig höher.

Auch die Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen, bei der LLO eine wichtige Rolle spielt, konnte durch Thiole beeinflusst werden. Die maximale Verstärkung (ca. 160 %) war jedoch geringer als bei der Porenbildung und Hämolyse und die EC_{50} -Werte (ca. 600 μM) lagen höher. Dies ist vermutlich durch die Komplexität des Invasionsprozesses zu erklären, der nicht nur durch LLO beeinflusst wird.

3.6 Einfluss von Protamin auf die Wirkung von Listeriolysin O

Protamin ist ein besonders argininreiches, basisches Protein, das aus Lachs-Sperma gewonnen wird. Es besitzt in millimolaren Konzentrationen eine antimikrobielle Wirkung, die vor allem auf seine lytische Wirkung zurückgeführt wird und bei grampositiven Bakterien stärker ausprägt ist als bei gramnegativen (Johansen et al. 1997). Hierbei scheint die Wirksamkeit stark auf einer elektrostatischen Wechselwirkung des Polykations mit der Bakterienoberfläche zu beruhen (Potter et al. 2004). Daher wäre denkbar, dass Protamin auch mit eukaryontischen Zellen wechselwirken kann und in der Lage ist, in der Membran befindliche LLO-Poren zu blockieren oder die Porenbildung ansich zu verhindern. Auch eine direkte Wechselwirkung mit freien LLO-Molekülen wäre denkbar.

3.6.1 Einfluss von Protamin auf die porenbildende Wirkung

In Patch-Clamp-Experimenten wurde untersucht, ob Protamin offene LLO-Poren hemmen kann. Vorversuche zeigten, dass Protamin in Konzentrationen bis zu 100 nM keine Eigeneffekte auf den Membranstrom von HEK293-Zellen hat. Bei höheren Konzentrationen

kam es jedoch teilweise zu porenähnlichen Einwärtsströmen, die die bekannte lytische Wirkung von Protamin (Becker 1961) erklären könnten. Da dieser Eigeneffekt von Protamin bei der Untersuchung von LLO-Poren nicht erwünscht war, wurde Protamin standardmäßig in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde das Protamin in E1-Lösung mit 0,5 % FAF-BSA angesetzt, so dass sich bei 100 μ l Applikationsvolumen eine Endkonzentration von 0,025 % FAF-BSA ergab. Abbildung 36 zeigt die Wirkung von 100 nM Protamin auf LLO-induzierte Poren an zwei HEK293-Zellen.

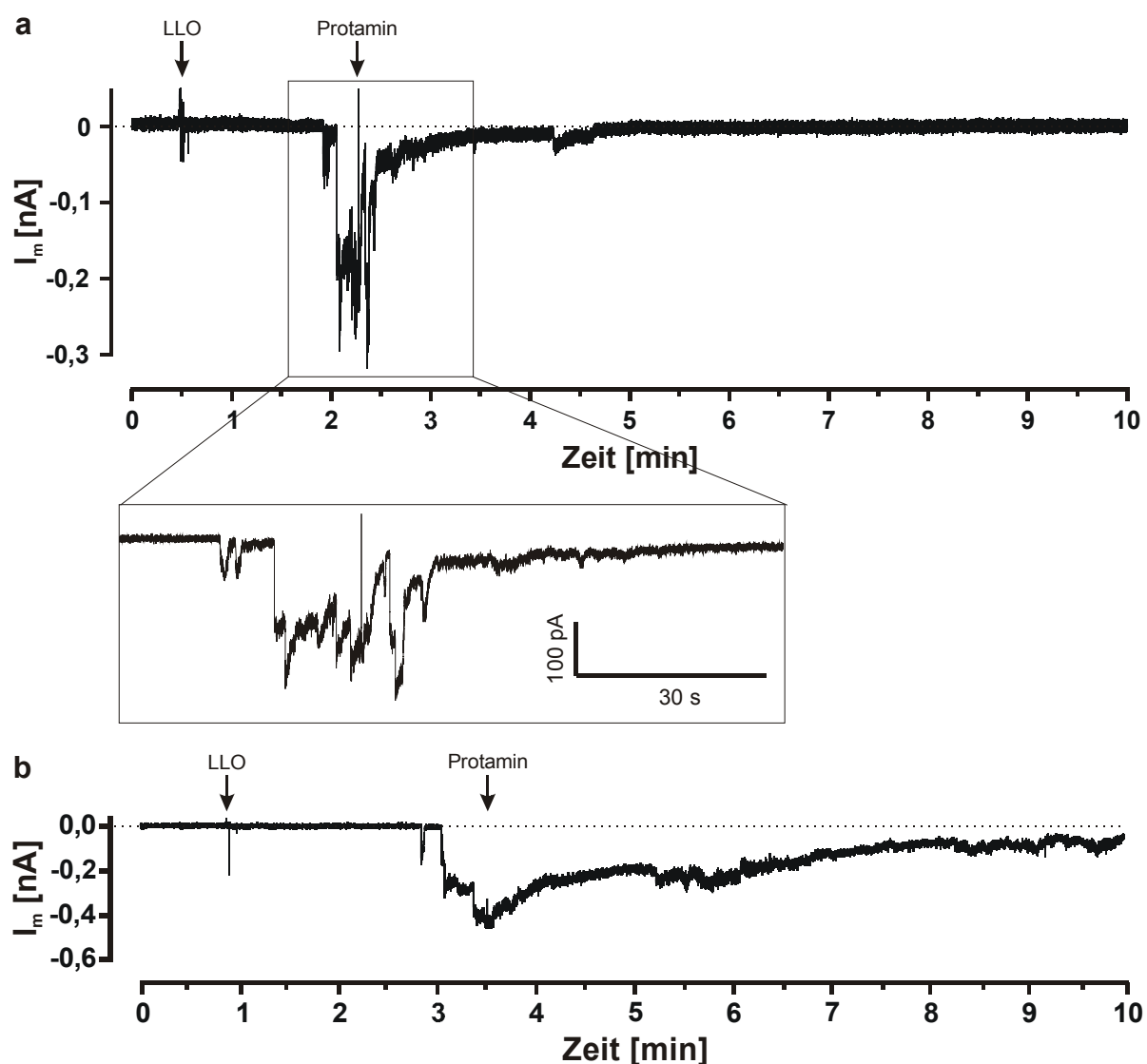


Abb. 36: Wirkung von Protamin auf die LLO-induzierte Porenbildung an zwei HEK293-Zellen (a, b). Kurz nach Bildung der ersten Membranporen durch LLO (10 ng/ml) wurde Protamin (100 nM) appliziert. Der Ausschnitt in (a) zeigt die Veränderung des Membranstroms zum Zeitpunkt der Protaminapplikation in vergrößerter zeitlicher Auflösung. Die Messungen wurden bei einem Membranpotential von -50 mV unter Verwendung von E1-Lösung und I_{standard} -Lösung durchgeführt.

In drei von neun Experimenten führte die Protaminapplikation zur vollständigen Blockade des LLO-induzierten Membranstromes (Abb. 36a). In den restlichen sechs Experimenten bewirkte Protamin unterschiedliche Abnahmen des Membranstroms (Abb. 36b). Protamin schien vor allem dann einen dauerhaften Rückgang des Membranstroms auf die Ausgangsamplitude zu bewirken, wenn es sehr früh nach Bildung der ersten Pore appliziert wurde. Dies könnte bedeuten, dass Protamin nicht an bereits gebildeten LLO-Poren wirkt, sondern mit freiem LLO in der Extrazellulärlösung oder mit der Zellmembran selbst interagiert und die Bildung von LLO-Poren verhindert. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen vor der LLO-Applikation mit Protamin vorinkubiert (Abb. 37). Abbildung 37c zeigt, dass eine 10-minütige Vorinkubation mit FAF-BSA selber keinen Einfluss auf die Porenbildung hat. Abbildung 36a zeigt die Wirkung von 10 min, Abbildung 36b von 30 s Vorinkubation der HEK293-Zellen mit Protamin auf die LLO-Porenbildung.

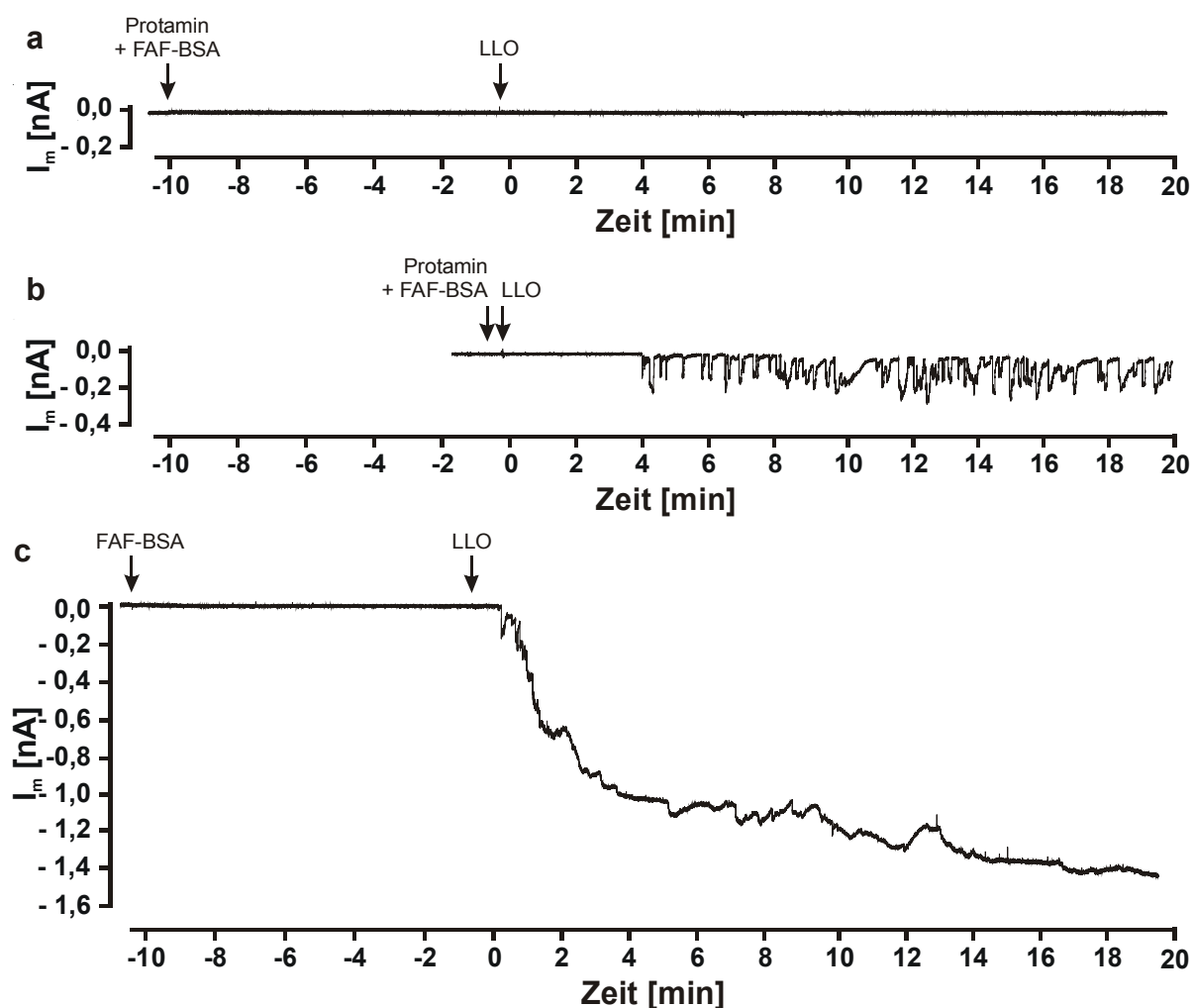


Abb. 37: Einfluss von Protamin auf die porenbildende Wirkung von LLO (10 ng/ml) bei HEK293-Zellen. (a) zeigt den Membranstrom nach 10 min (b) nach 30 s Vorinkubation mit 100 nM Protamin und 0,025 % FAF-BSA und (c) nach 10 min Vorinkubation nur mit 0,025 % FAF-BSA (Kontrolle). Das Membranpotential betrug -50 mV.

Man sieht, dass es bei der für 10 min mit Protamin vorinkubierten Zelle nicht zur Porenbildung kam (Abb. 37a). Die in Abb. 37b verwendete Zelle wurde 30 s lang mit Protamin vorinkubiert. Bei ihr bildeten sich nach etwa vier Minuten LLO-Poren, die jedoch größtenteils Offenzeiten unter 30 s hatten. Bei der Kontrollzelle (Abb. 37c) kam es hingegen bereits eine Minute nach LLO-Applikation zur Porenbildung.

Abbildung 38 zeigt die Inhibition des Nettoladungsflusses bei Inkubationszeiten zwischen 30 s und 10 min.

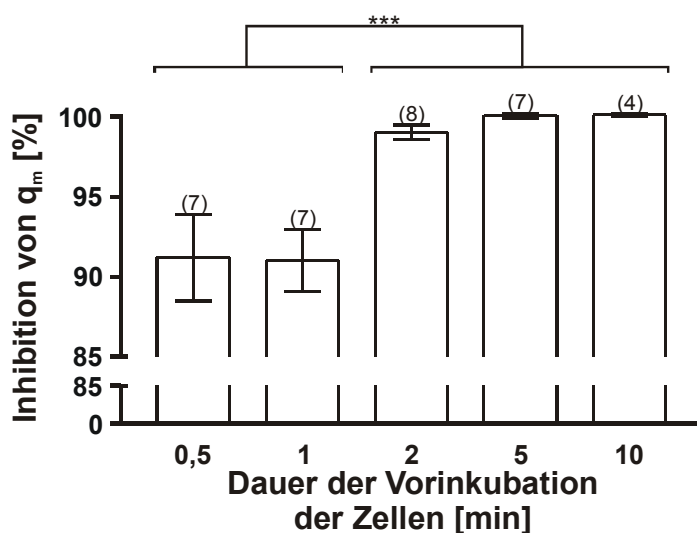


Abb. 38: Inhibition der LLO-induzierten Porenbildung in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit der HEK293-Zellen mit 100 nM Protamin. Als Maß für die Porenbildung diente der Ladungsfluss innerhalb von 10 min nach Applikation von LLO (10 ng/ml).

Auch bei einer nur 30 s langen Vorinkubation der Zellen war eine signifikante Hemmung des Nettoladungsflusses um 91 ± 3 % gegenüber den Kontrollmessungen zu beobachten. Die inhibitorische Wirkung von Protamin auf die LLO-Porenbildung betrug bereits bei einer Inkubationsdauer von 5 min 100 %.

Die bisherigen Experimente zeigten, dass HEK293-Zellen offenbar durch Wechselwirkung mit Protamin vor der porenbildenden Wirkung von LLO geschützt werden können. Im Folgenden wurde die Konzentrationsabhängigkeit dieses protektiven Protamin-Effektes untersucht (Abb. 39). Dazu wurden die Zellen vor der LLO-Applikation 10 min mit Protamin in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Als Maß für die porenbildende Wirkung diente wieder die Nettoladung, die nach LLO-Applikation (10 ng/ml) innerhalb von 10 min die Membran passierte. Aus der an die Messdaten angepassten Konzentrations-Wirkungskurve ergab sich ein IC_{50} -Wert für von 18 ± 2 nM Protamin, wobei der Hill-Koeffizient $1,5 \pm 0,3$ betrug

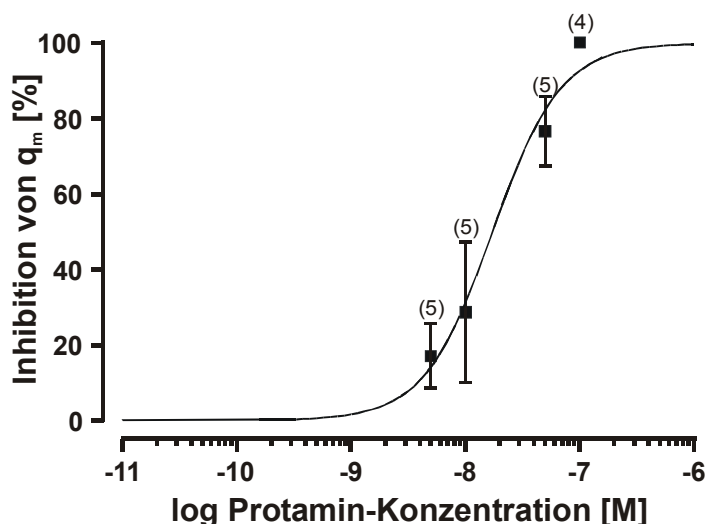


Abb. 39: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition des LLO-induzierten Nettoladungsflusses durch Vorinkubation (10 min) mit Protamin. Gemessen wurde die Ladung, die bei einem Membranpotential von -50 mV nach Applikation von LLO (10 ng/ml) innerhalb von 10 min die Membran passierte. Eine Inhibition von 100 % entspricht einer vollständigen Hemmung der Porenbildung. Die Anpassung der Kurve an die Messdaten erfolgte mit Hilfe der Hill-Gleichung (S. 26). Die Anzahl der Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Abbildung 40 zeigt die Latenzzeiten von der LLO-Applikation (10 ng/ml) bis zum Auftreten der ersten Pore in Abhängigkeit von der zur Vorinkubation verwendeten Protamin-Konzentration. Da bei einer Protamin-Konzentration von 100 nM aufgrund fehlender Porenbildung keine Latenzzeiten ausgewertet werden konnten, blieb diese Konzentration unberücksichtigt.

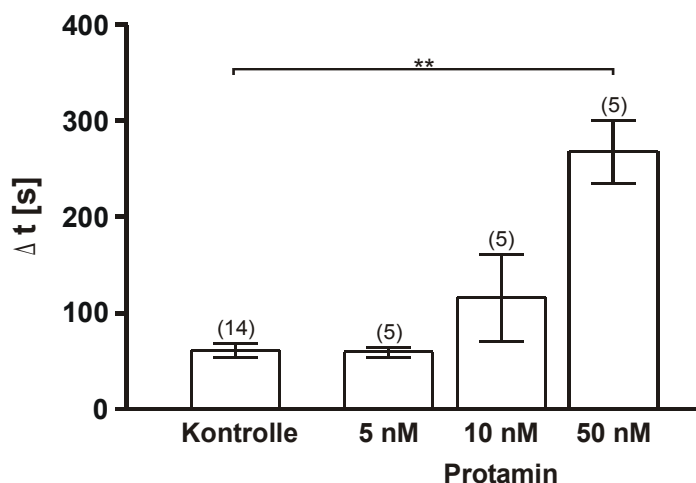


Abb. 40: Latenzzeit Δt zwischen Applikation von LLO (10 ng/ml) bis zur Bildung der ersten Membranpore nach 10 min Vorinkubation mit Protamin in verschiedenen Konzentrationen.

Je höher die Protamin-Konzentration bei der Vorinkubation war, desto mehr wurde die Latenzzeit verlängert. Eine Konzentration von 50 nM Protamin bewirkte eine hochsignifikante Verzögerung der Porenbildung von 61 ± 7 s (Kontrollen, $n = 15$) auf 268 ± 33 s ($n = 5$, $p \leq 0,01$). Die Veränderungen der Latenzzeiten geben einen weiteren Hinweis darauf, dass durch Protamin die Bildung der LLO-Poren gehemmt wird.

Da die inhibitorische Wirkung von Protamin offenbar größtenteils auf einer Wechselwirkung zwischen Protamin und Zelle beruht (vgl. Abb. 37), wäre auch eine hemmende Wirkung auf andere porenbildende Toxine denkbar. Daher wurde nun die Wirkung von Protamin auf die

Porenbildung durch α -Hämolsin (α -Hly), dem Prototypen der sogenannten RTX-Toxine (repeats in toxin) getestet. HEK293-Zellen wurden hierbei ebenfalls mit 100 nM Protamin und 0,025 % FAF-BSA vorinkubiert. Da bei 10-minütiger Inkubationszeit mit Protamin durch Applikation von α -Hly (50 ng/ml) eine von den Kontrollmessungen nicht zu unterscheidende Porenbildung zu beobachten war, wurde die Inkubationszeit auf 20 min verlängert, um gegebenenfalls eine schwache Schutzwirkung zu verstärken. Die Latenzzeiten bis zur Bildung der ersten Pore war jedoch bei Protamin-behandelten Zellen und Kontrollzellen (Vorinkubation mit 0,025 % FAF-BSA) gleich ($n = 6$). Auch die Nettoladungen, die innerhalb von 5 min nach Einsetzen der Porenbildung über die Membran flossen, wurden durch Vorinkubation mit Protamin nicht beeinflusst ($n = 6$). Protamin bietet somit keinen Schutz vor der Porenbildung durch α -Hly. Mit diesem Ergebnis ist die Vermutung auszuschließen, dass die protektive Wirkung von Protamin bei der LLO-Porenbildung auf einem völlig unspezifischen Mechanismus beruhen könnte.

3.6.2 Einfluss von Protamin auf die hämolytische Wirkung

Da zur Charakterisierung von LLO üblicherweise seine hämolytische Wirksamkeit bestimmt wird, wurde nun untersucht, ob sich die Schutzwirkung von Protamin auch auf Ebene der Hämolyse nachweisen lässt. Wie in den elektrophysiologischen Experimenten an HEK293-Zellen wurden die Erythrozyten hier vor Zugabe des LLO (400 ng/ml; 7 nM) 10 min lang mit verschiedenen Protamin-Konzentrationen vorinkubiert. Abbildung 41 zeigt, dass in der Tat eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung auf die LLO-induzierte Hämolyse besteht.

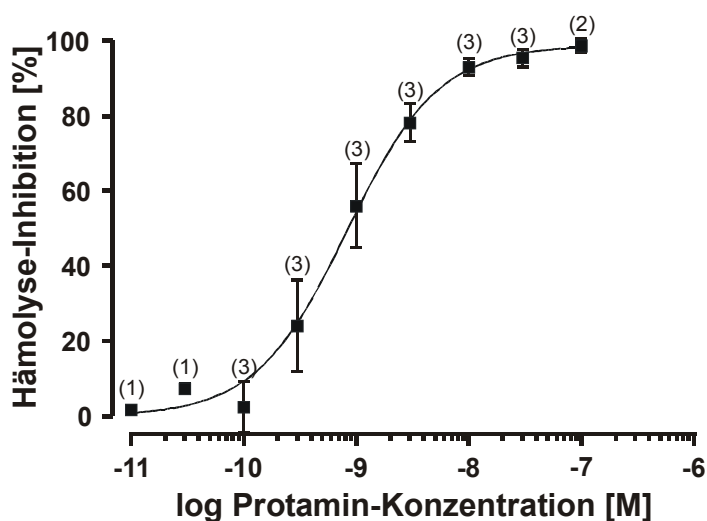


Abb. 41: Inhibition der LLO-induzierten Hämolyse von Schafserythrozyten in Abhängigkeit von der Protamin-Konzentration. Die Erythrozyten wurden 10 min vor der Zugabe von LLO (400 ng/ml) mit Protamin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Ordinate zeigt die prozentuale Hemmung der LLO-induzierten Hämolyse. Die ohne Protamin erreichte Hämolyse entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate. Die Anzahl der unabhängigen Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei in jedem Experiment Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Anpassung der Kurve an die Messdaten erfolgte mit der Hill-Gleichung (S. 26).

Aus den Messdaten ergab sich eine maximale Hemmwirkung auf die LLO-induzierte Hämolyse von $99 \pm 3 \%$ bei 100 nM Protamin und eine 50 %-ige Inhibition bei einer Protamin-Konzentration von $0,8 \pm 0,1$ nM ($n = 3$). Der Hill-Koeffizient von $1,1 \pm 0,1$ lässt vermuten, dass es dabei zu einer 1:1-Reaktion von Protamin mit einem unbekanntem Reaktionspartner kommt.

3.6.3 Einfluss von Protamin auf die Invasionsfähigkeit von *Listeria monocytogenes*

Zu den vielfältigen Funktionen von LLO, die auf seine porenbildende Wirkung zurückgehen, zählt auch die Vermittlung der Invasion von Listerien in ihre Zielzellen (Bielecki et al. 1990). Es wurde nun untersucht, ob Protamin auch die Invasion von Listerien in Zielzellen vermindern und auf diese Weise ihre Verbreitung unterbinden könnte. In den Invasionsversuchen wurden die verwendeten HEP2-Zellen mit verschiedenen Protamin-Konzentrationen 10 min vorinkubiert, bevor das Listerien-Inoculum appliziert wurde ($n = 6$, jeweils Dreifachbestimmung). Abbildung 42 zeigt, dass die Invasion in HEP2-Zellen durch Protamin gehemmt werden kann.

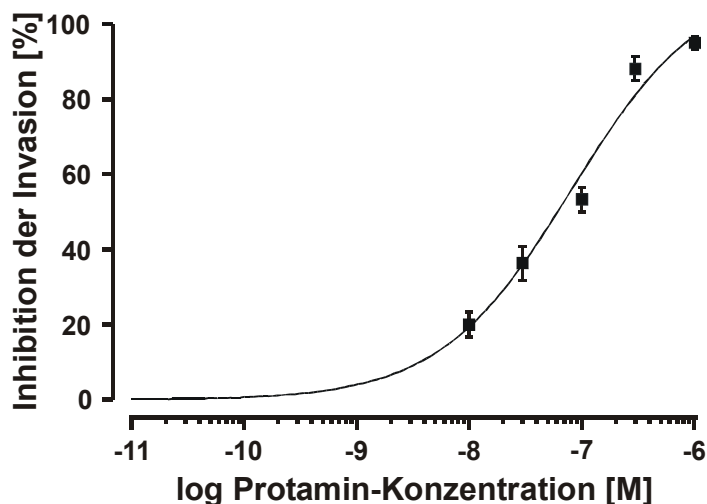


Abb. 42: Konzentrationsabhängige Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* in HEP2-Zellen durch Protamin. Vor der Infektion mit *L. monocytogenes* wurden die HEP2-Zellen für 10 min mit Protamin-Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 μ M vorinkubiert. ($n = 6$, jeweils Dreifachbestimmung). Die Invasionsrate in Abwesenheit von Protamin entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate.

Bereits 10 nM Protamin reduzierte die relative Invasionsrate um $20 \pm 3 \%$ und bei einer Konzentration von 1 μ M wurde die Invasion nahezu vollständig verhindert. Eine 50 %-ige Hemmung wurde bei einem IC_{50} -Wert von etwa 80 nM Protamin erreicht.

Tab. 5: Inhibition verschiedener LLO-Effekte durch Protamin

LLO-Effekt	Maximale Inhibition [%]	IC ₅₀ Protamin [nM]
Membranporen (Nettoladungsfluss)	100 ± 3	18 ± 2
Hämolyse	99 ± 3	1 ± 0
Invasion	≈ 100	≈ 80

Die wichtigsten Parameter der Konzentrations-Wirkungskurven für die Inhibition der porenbildenden und hämolytischen Wirkung von LLO und der Invasion von *L. monocytogenes* in HEp2-Zellen sind in Tabelle 5 nochmals zusammengefasst. Wie sie zeigt, ist Protamin in der Lage, Zellen vollständig vor LLO-induzierter Porenbildung und Hämolyse sowie vor der Invasion von *L. monocytogenes* zu schützen. Die IC₅₀-Werte lagen bei allen Effekten im nanomolaren Bereich, wobei sie bei Hämolyseversuchen am niedrigsten und bei Invasionsversuchen am höchsten waren. Vermutlich wurde die schützende Wirkung von Protamin bei Patch-Clamp-Experimenten erst bei höheren Konzentrationen messbar als bei Hämolyseversuchen, weil die HEK293-Zellen bereits über einen eigenen Schutzmechanismus, die Porenschlüsse, verfügen. Der viel höhere IC₅₀-Wert in Invasionsversuchen ist vermutlich auf die Komplexität des Invasionsprozesses zurückzuführen.

Der Vorgang der Invasion wird nicht nur von LLO, sondern auch von zahlreichen weiteren Faktoren beeinflusst. Um zu überprüfen, ob Protamin die Zellen ausschließlich durch eine Beeinträchtigung der LLO-Wirkung vor der Invasion von Listerien schützt, wurde der Invasionsversuch auch mit dem mutagenisierten Listerienstamm *L.m.Δhly* durchgeführt. Dieser Stamm exprimiert kein LLO und kann Wirtszellen zwar invadieren, sich jedoch intrazellulär nicht vermehren (Portnoy et al.1988). Die Invasionsrate der Listerien wird offensichtlich stark vom Passagezustand der HEp2-Zellen beeinflusst. Um durch diesen Faktor verursachte Unterschiede auszuschließen, wurden die Versuche mit *L.m.*-Wildtyp und *L.m.Δhly* jeweils zeitgleich mit Zellen derselben Passage durchgeführt.

Die absolute Invasionsrate, also der Anteil der aus dem Inoculum in die Kontrollzellen invadierten Listerien, war für *L.m.Δhly* mit 5 ± 2 % gegenüber der des Wildtyps (14 ± 4 %) deutlich reduziert (n = 4, jeweils Dreifachbestimmung, ohne Abbildung). Abbildung 43 zeigt die relative Invasionsrate der beiden Listerien-Stämme bei verschiedenen Protamin-Konzentrationen. Hierbei entspricht eine Inhibition von Null der Invasionsrate des jeweiligen Stammes ohne Protamin.

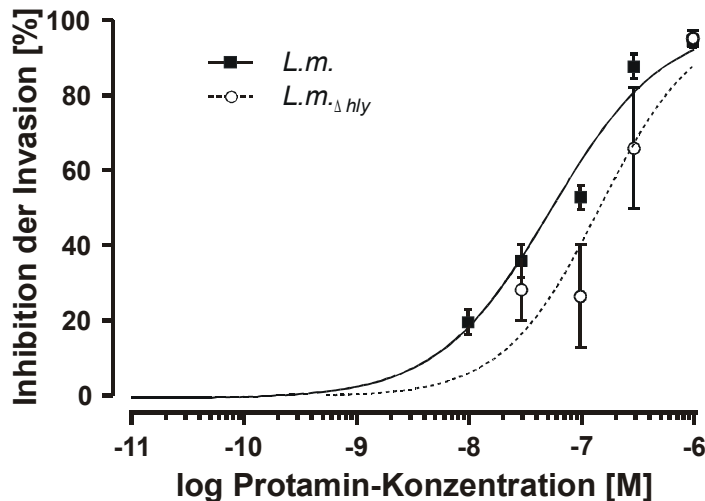


Abb. 43: Inhibitorische Wirkung von Protamin auf die Invasion von *L.m.* und *L.m.* Δ *hly* in HEp2-Zellen. Vor der Infektion wurden die HEp2-Zellen 10 min lang mit verschiedenen Protamin-Konzentrationen inkubiert. Die Invasionsrate des jeweiligen Stammes ohne Protamin entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate. (jeweils $n = 4$ mit Dreifachbestimmung.)

Die Vorinkubation der Zellen mit Protamin führte auch bei *L.m.* Δ *hly* zu einer Hemmung der Invasion bis hin zur vollständigen Blockade. Hierbei zeigte sich jedoch, dass Protamin beim Wildtyp mit einem IC_{50} -Wert von 100 nM etwas potenter wirkte als bei *L.m.* Δ *hly* mit einem IC_{50} -Wert von 200 nM. Da der für *L.m.* Δ *hly* ermittelte EC_{50} -Wert außerhalb des für den IC_{50} -Wert des Wildtyps ermittelten 95 %-Konfidenzintervalls liegt, implizieren die Ergebnisse, dass Protamin die Invasion auf zwei verschiedenen Wegen hemmt: Zum einen über eine Inhibition der Porenbildung und zum anderen über einen LLO-unabhängigen Mechanismus.

Der erfolgreiche Nachweis einer inhibitorischen Wirkung von Protamin auf die Invasion von *L. monocytogenes* in HEp2-Zellen lässt einen klinischen Nutzen von Protamin möglich erscheinen. Da bisher jedoch nur klinische Erfahrungen mit Protaminsulfat vorliegen, wurde untersucht, ob sich die Invasion in Zielzellen auch durch diese Substanz verringern lässt (Abb. 44).

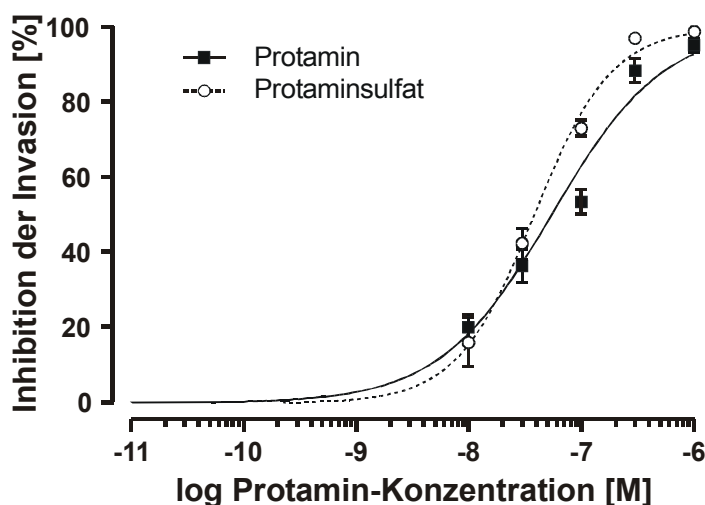


Abb. 44: Inhibitorische Wirkung von Protamin und Protaminsulfat auf die Invasion von *L.m.* in HEp2-Zellen im Vergleich. Vor der Infektion wurden die HEp2-Zellen 10 min mit verschiedenen Protamin- bzw. Protaminsulfat-Konzentrationen inkubiert. Die Ordinate zeigt die Hemmung der Invasionsraten (Protamin: $n = 6$, Protaminsulfat: $n = 4$, jeweils Dreifachbestimmung). Der Wert 0 auf der Ordinate entspricht der jeweiligen Invasionsrate in Abwesenheit von Protamin.

Auch mit Protaminsulfat konnte die Invasion der Listerien vollkommen inhibiert werden. Die Daten ergaben eine 50 %-ige Hemmung bei einer Protaminsulfat-Konzentration von ca. 40 nM, wobei dieser Wert innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls des für Protamin ermittelten IC_{50} -Wertes liegt. Protaminsulfat hat demnach denselben inhibitorischen Effekt wie Protamin.

4 Diskussion

4.1 Wirkung von Listeriolysin O auf die Zellmembran

Listeriolysin O (LLO) ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes*, der bereits vor der Invasion der fakultativ intrazellulär lebenden Listerien in Wirtszellen verschiedene biologische Prozesse in Gang setzen kann. So induziert er z.B. die Expression von Zytokinen (Nishibori et al. 1996) und Adhäsionsfaktoren (Kayal et al. 1999), aktiviert die Mucin-Sekretion von Intestinalzellen (Coconnier et al. 2000) sowie die Apoptose bestimmter Zelltypen (Guzmann et al. 1996, Carrero et al. 2004) und besitzt eine immunmodulatorische Wirkung (Berche et al. 1990). Viele dieser Effekte sind offensichtlich auf die Aktivierung von Second Messenger-Systemen durch den von LLO-Poren vermittelten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle zurückzuführen (Khelef et al. 2005). Der direkte Nachweis der porenbildenden Wirkung von LLO gelang erstmals im Jahr 2002 mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Repp et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von LLO hinsichtlich seiner porenbildenden Wirkung an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) untersucht. Einzelne Porenöffnungen und -schlüsse waren in einigen Experimenten bereits bei LLO-Konzentrationen von 0,1 ng/ml (1,8 pM) zu beobachten und traten ab einer Konzentration von 1 ng/ml (18 pM) in allen Experimenten auf. Konzentrationserhöhungen führten zum einen zur schnelleren Bildung von LLO-Poren und zum anderen zu einem höheren Nettoladungsfluss durch die offenen LLO-Poren in der Membran. Der halbmaximale Ladungsfluss wurde bei einer LLO-Konzentration von 46 ng/ml (821 pM) LLO erreicht.

Vergleichende Messungen an HEK293-Zellen und Maus-Mikroglia-Zellen (BV-2-Zellen) zeigten, dass die Charakteristik der porenbildenden Wirkung von LLO zelltypabhängig variiert. Die Latenzzeit zwischen LLO-Applikation und Bildung der ersten Pore war bei BV-2-Zellen etwa doppelt so lang wie bei HEK293-Zellen. Dieser Effekt könnte auf unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei der Oligomerisierung der LLO-Moleküle und/ oder der vollständigen Insertion zur Bildung einer funktionellen Pore beruhen. Es ist auch denkbar, dass die verzögerte Porenbildung auf einer höheren endozytotischen Aktivität von BV-2-Zellen beruht, die zur schnelleren Elimination der gebundenen LLO-Moleküle von der Zelloberfläche führt. Die an HEK293-Zellen und BV-2-Zellen gebildeten LLO-Poren unterschieden sich nicht in der Höhe ihrer Stromamplituden. Jedoch zeigten die Experimente, dass die Porenbildung unterschiedliche Sekundärwirkungen haben kann: BV-2-Zellen

exprimieren im Gegensatz zu HEK293-Zellen Ca^{2+} -abhängige, spannungsunabhängige K^+ -Kanäle, welche infolge des durch LLO-Poren vermittelten Ca^{2+} -Einstroms aktiviert werden. Diese Ca^{2+} -abhängigen, spannungsunabhängigen K^+ -Kanäle spielen in BV-2-Zellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials (Eder 1998). Bei der Porenbildung durch LLO könnte eine Aktivierung dieser K^+ -Kanäle die Immunzellen vor einer Depolarisation schützen.

4.2 Hämolytische Wirkung von Listeriolysin O

Die lytische Wirkung von LLO spielt eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes*. Unmittelbar nach der Invasion in eine Wirtszelle befinden sich die Listerien im sogenannten Primärphagosom. Um sich dem Angriff durch phagosomale Komponenten zu entziehen, müssen die Bakterien die Phagosomenmembran innerhalb von 30 Minuten lysieren und in das Zytoplasma der Wirtszelle vordringen (Gaillard et al. 1987, Tilney & Portnoy 1989). Im Zytoplasma können sich die Listerien vermehren und in einem sogenannten „Cell-to-cell-spread“, also ohne den Umweg über den Extrazellulärraum, in die Nachbarzelle gelangen. Dort befinden sie sich dann im sogenannten Sekundärphagosom, d.h. sie werden von der phagozytierten Oberflächenmembran ihrer Ursprungszelle und der Phagosomenmembran der neuen Zelle umgeben. Auch aus dem Sekundärphagosom müssen sich die Listerien innerhalb kurzer Zeit befreien (Dramsi et al. 1998, Gedde et al. 2000). Die Lyse des Primärphagosoms wird in erster Linie durch LLO vermittelt, kann in bestimmten Zelltypen jedoch in reduziertem Maße auch ohne LLO stattfinden (Marquis et al. 1995, Grundling et al. 2003). Für die Lyse des Sekundärphagosoms ist LLO essentiell (Gedde et al. 2000).

Die lytische Wirkung von LLO wurde in Hämolyseexperimenten untersucht. Interessanterweise konnte ein hämolytischer Effekt sowohl bei Schafs- als auch bei menschlichen Erythrozyten erst ab ca. 300 ng/ml (5,4 nM) detektiert werden, während elektrophysiologisch bereits bei LLO-Konzentrationen von 1 ng/ml (18 pM) einzelne LLO-Poren an HEK293-Zellen beobachtet worden waren. Der EC_{50} -Wert für die halbmaximale Hämolyse lag um fast eine Zehnerpotenz höher als der bei Patch-Clamp-Experimenten an HEK293-Zellen ermittelte EC_{50} -Wert für den halbmaximalen Ladungsfluss (380 ng/ml vs. 46 ng/ml). Da auch bei Patch-Clamp-Versuchen mit menschlichen Erythrozyten schon bei LLO-Konzentrationen von 1 ng/ml eine Porenbildung beobachtet werden konnte, ist auszuschließen, dass diese Konzentrationsunterschiede allein auf verschiedenen LLO-

Sensitivitäten der beiden Zelltypmembranen beruhen. LLO-Wirkungen an der Zellmembran lassen sich demnach mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik viel sensitiver erfassen als mit Hämolyseversuchen. Offenbar ist zur Hämolyse eine sehr viel häufigere Porenbildung erforderlich. Erste Zytolyse-Experimente in unserer Arbeitsgruppe, bei denen die lytische Wirkung von LLO an IHKE-Zellen (immortalised human kidney epithelial cells) anhand der Freisetzung von ATP untersucht wurde, zeigten kürzlich, dass zur Lyse dieser Zellen annähernd gleiche LLO-Konzentrationen erforderlich sind wie zur Hämolyse (Koschinski, persönliche Information). Dies unterstreicht, dass bei der Untersuchung von LLO-Wirkungen deutlich zwischen LLO-Poren, die bei der Anwendung sublytischer LLO-Konzentrationen gebildet werden, und der Lyse von Zellmembranen unterschieden werden muss. „Sublytische LLO-Poren“ führen zu einer Depolarisation der Zelle und lokal zu einer massiven Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, jedoch offenbar nicht zur Freisetzung intrazellulärer Komponenten wie Hämoglobin oder ATP. Diese werden erst durch eine Zerstörung der Membran bei lytischen LLO-Konzentrationen frei.

Der aus der Konzentrations-Wirkungskurve für die porenbildende LLO-Wirkung in Patch-Clamp-Versuchen ermittelte Hill-Koeffizient von 2,3 deutete darauf hin, dass zumindest drei LLO-Moleküle an der Bildung einer funktionellen Pore beteiligt sind. Der ermittelte Hill-Koeffizient von ca. 4 für die hämolytische Wirkung von LLO an Schafs- und Humanerythrozyten lag etwas höher und weist darauf hin, dass die Poren aus vier oder fünf LLO-Monomeren bestehen. Jedoch könnte diesen Hill-Koeffizienten auch eine positive Kooperativität mehrerer „geclusterter“ Einzelporen zugrundeliegen, die miteinander gekoppelt sind und dann synchron öffnen und schließen. Eine derartige Kopplung ist beispielsweise für endogene Chloridkanäle bekannt (Larsen et al. 1996). Für LLO-Poren wurde ein solcher Mechanismus bereits aufgrund der Beobachtung vermutet, dass die LLO-Porenstromamplituden ganzzahlige Vielfache einer bestimmten Elementarstromamplitude darstellen (Repp et al. 2002, Butler 2005).

Der Vergleich von Hämolyse- und Patch-Clamp-Experimenten zeigt, dass sich mit der Patch-Clamp-Technik die Wirkungen sublytischer LLO-Konzentrationen an Zellmembranen nachweisen lassen, die in Hämolyseversuchen nicht registriert werden können. Des Weiteren ermöglicht diese direkte Methode die Registrierung einzelner Porenaktivitäten in Echtzeit und damit eine genaue Charakterisierung von Porenöffnungen und -schlüssen sowie einzelner Porenstromamplituden. Sie ist daher zu Untersuchung nicht-lytischer LLO-Wirkungen eindeutig besser geeignet als Hämolyseversuche. Letztere eignen sich hingegen gut zur Untersuchung der lytischen Funktion LLOs bei der Befreiung der Listerien aus dem Phagosom. Schafserythrozyten sind hierfür gleich gut geeignet wie humane Erythrozyten.

4.3 Porenschlüsse

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Schlüsse von LLO-Poren nach drei unterschiedlichen Stromkinetiken verlaufen können: In seltenen Fällen erfolgen die Schlüsse schlagartig wie bei endogenen Ionenkanälen. Häufiger sind langsame Porenschlüsse, bei denen der Strom kontinuierlich abnimmt. In den meisten Fällen sind jedoch Mischformen aus langsamer und schneller Kinetik zu beobachten (vgl. Abb. 15 und 16, Abschnitt 3.3). Bisher ist unklar, welcher Mechanismus dem Schließen von LLO-Poren zugrunde liegt.

Für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Listerien und Wirtszellen war es wichtig zu klären, ob Porenschlüsse durch eine Dissoziation von LLO-Molekülen von der LLO-Pore in der Membran, durch Konformationsänderungen der LLO-Moleküle in der Membran selbst oder durch eine Elimination der Poren über membranverlagernde Transportmechanismen der Wirtszelle zu erklären sind. Konformationsänderungen von LLO-Molekülen in der Pore wären vor allem für schnelle Porenschlüsse denkbar, da deren sprunghaften Stromabnahmen an das Verhalten von endogenen Ionenkanälen erinnern. Jedoch legen die Ergebnisse von Outside-Out-Messungen an HEK293-Zellmembranen und von Whole-Cell-Messungen an humanen Erythrozyten den Schluss nahe, dass die Porenschlüsse auf membranverlagernden Transportmechanismen beruhen: In der Outside-Out-Konfiguration, in der der gemessene Membranabschnitt von der restlichen Zelle isoliert wird, waren Porenschlüsse viel seltener als in der Whole-Cell-Konfiguration. Die intakte Zelle spielt demnach offensichtlich eine wichtige Rolle bei Porenschlüssen. Bei den Erythrozyten, die bekanntermaßen kaum endo- und exozytotisch aktiv sind, traten Porenschlüsse nur bei 2 % der gebildeten Poren auf.

Der Endozytoseprozess der Wirtszellen wird von vielen bakteriellen Toxinen als Transportweg zu ihren intrazellulären Zielstrukturen ausgenutzt und daher im Verlauf einer Infektion auch auf verschiedenen Wegen aktiviert (Schiavo & van der Goot 2001). Es ist also denkbar, dass LLO durch einen Ca^{2+} -Einstrom eine Endozytose induziert und damit auch die Invasion des LLO und letztendlich der Listerien fördert. Verschiedene bakterielle Toxine können über Clathrin-abhängige, aber auch Clathrin-unabhängige Mechanismen oder Caveolae-vermittelte Endozytose in die Zielzelle eindringen (Schiavo & van der Goot 2001). Caveolae sind Membranmikrodomänen, die besonders reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind und flaschenförmige Einstülpungen bilden, die intrazellulär von dem charakteristischen Protein Caveolin ummantelt sind. Da bekannt ist, dass sich LLO in Caveolae anreichert und zudem eine Caveolae-vermittelte Internalisierung von LLO postuliert wurde (Coconnier et al. 2000), erschien eine Caveolae-vermittelte Endozytose als Ursache für Porenschlüsse besonders naheliegend. In der Arbeit von Coconnier et al. (2000)

wird jedoch nicht klar, ob es sich bei dem vermutlich über Caveolae internalisierten LLO um funktionelle Poren handelte. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die elektrophysiologisch beobachteten Schlüsse von LLO-Poren auf Caveolae-vermittelte Endozytose zurückzuführen sind. Zur Klärung dieser Frage kamen Neuroblastom-Zellen, sogenannte Neuro-2a-Zellen, zum Einsatz. Bei diesem Zelltyp konnte weder das für Caveolae typische Protein Caveolin nachgewiesen werden, noch gelang eine morphologische Identifikation von Caveolae (Shyng et al. 1994). Trotzdem konnten auch an Neuro-2a-Zellen vergleichbar viele Porenschlüsse beobachtet werden wie an HEK293-Zellen. Folglich werden LLO-Poren zumindest nicht vorrangig über Caveolae, sondern über einen anderen membranverlagernden Transportmechanismus von der Zelloberfläche eliminiert.

Die Vielzahl und Diversität endo- und exozytischer Prozesse und ihre meist unvollständige Aufklärung (Yoneda et al. 2000) erschwert die genaue Bestimmung eines für die Porenschlüsse verantwortlichen Vorgangs. Jedoch sind vielen membranverlagernden Transportmechanismen zwei Eigenschaften gemein: Zum einen sind sie häufig Ca^{2+} -abhängig (Togo et al. 1999, Reddy et al. 2001, Gundelfinger et al. 2003, Mc Neil & Steinhardt 2003, Shen et al. 2005), zum anderen spielt dabei das Zytoskelett eine wichtige Rolle (Qualmann et al. 2000, Pelkmans & Helenius 2002, Mc Neil & Steinhardt 2003, Parton & Richards 2003).

Experimente mit Cytochalasin D sollten Aufschluss über die Rolle von F-Aktin bei Porenschlüssen geben. Das membranpermeable Pilzgift bindet an freie Enden von Aktinfilamenten und hemmt dort sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation von Aktin-Untereinheiten (Cooper 1987). Die Vorinkubation von HEK293-Zellen mit Cytochalasin D führte zu einem deutlich häufigeren Auftreten von Porenschlüssen. Unter dem Gesichtspunkt, dass bestimmte Schritte der Endo- und Exozytose durch Aktin-Polymerisierung gefördert werden (Qualmann et al. 2000, Mc Neil & Steinhardt 2003), mag dieses Ergebnis zunächst überraschen. Jedoch wurden inzwischen auch zahlreiche Endo- und Exozytose-Prozesse beschrieben, die offensichtlich keine Aktin-Polymerisierung erfordern oder durch intakte Aktinfilamente sogar gehemmt werden. Der Aktin-Cortex, der unmittelbar unter der Zellmembran liegt, verursacht eine hohe Steifigkeit und Oberflächenspannung der Membran und behindert die Fusion von Membranrändern, die bei mechanischen Verletzungen der Zellmembran entstehen. In gleicher Weise könnte der Aktin-Cortex die Reparatur LLO-geschädigter Membranabschnitte erschweren. Nach der „Tension Reduction Hypothesis“ zur exozytotischen Membranreparatur (Togo et al. 1999) vermindert die Ca^{2+} -abhängige exozytotische Insertion von Endomembran diese Spannung und erleichtert die Membranreparatur. Derselbe Effekt wird auch durch das Herabsetzen der Oberflächen-

spannung mit Hilfe von Cytochalasin D erzielt (Togo et al. 1999). Liegt den Porenschlüssen ein exozytotischer Reparaturmechanismus zugrunde, könnte die „Tension Reduction Hypothesis“ ihr vermehrtes Auftreten nach Vorinkubation mit Cytochalasin erklären. Auch nach der „Patch Hypothesis“ (Miyake et al. 2001, Mc Neil 2002) behindert der Aktin-Cortex die exozytotische Membranreparatur, weil er ein räumliches Hindernis für den Vesikeltransport zur Zellmembran darstellt. Bei Verletzungen der Zellmembran bricht dieses Hindernis normalerweise durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zusammen. Wird der Wiederaufbau durch Cytochalasin D behindert (Miyake et al. 2001), entspricht dies einer Destabilisierung des F-Aktins. Die „Patch Hypothesis“ bietet somit eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das häufige Auftreten von Porenschlüssen unter Einwirkung von Cytochalasin D. Das bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit teilweise beobachtete „Membrane Blebbing“, das auf einer Ablösung der Plasmamembran vom Zytoskelett beruht, ist ein Hinweis darauf, dass es nach der Bildung von LLO-Poren tatsächlich zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts kommen könnte (Sheetz et al. 2006).

Auch bei der Endozytose gibt es Hinweise darauf, dass das starre Aktin-Zytoskelett die starke Membranbiegung bei der Bildung von Membraneinstülpungen erschwert und somit behindert (Fujimoto et al. 2000, Pelkmans 2002, Thomsen 2002). Diese inhibitorische Wirkung von F-Aktin würde die in der vorliegenden Arbeit gefundene Häufigkeitszunahme der Porenschlüsse unter Einfluss von Cytochalasin D bei einem zugrunde liegenden endozytotischen Reparaturmechanismus erklären.

Die drastische Reduktion der Porenschlüsse unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen belegt, dass die Porenschlüsse durch von außen einströmendes Ca^{2+} vermittelt werden. Porenschlüsse traten hier, statt wie unter Kontrollbedingungen bei 71 %, nur noch bei 21 % der Poren auf. Vermutlich ist die direkt an der Zellmembran lokal stark erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration für die Zelle das Signal, eine Membranreparatur in Gang zu setzen. Die Ergebnisse unterstützen die These, dass die durch LLO-Poren einströmenden Ca^{2+} -Ionen die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts erleichtern. Aufgrund der sehr vielfältigen Wirkungen von Ca^{2+} -Ionen als Second Messenger ist jedoch auch denkbar, dass es die Endo- oder Exozytose über eine andere Signalkaskade beeinflusst.

Bei tierischen Zellen stellt die Exozytose den wichtigsten Prozess bei der Membranreparatur dar (Luzio et al. 2003, Mc Neil & Steinhardt 2003). Bisherige Untersuchungen dazu beziehen sich jedoch auf mechanische Verletzungen der Membran und nicht auf Toxinporen. Da die LLO-Moleküle bei exozytotischen Reparaturmechanismen weiterhin an der Membranoberfläche verbleiben würden, ist fraglich, ob Exozytose tatsächlich zu Porenschlüssen führen kann. Ein solcher Mechanismus ist bisher nicht bekannt.

Als weiterer Porenreparaturmechanismus wäre ein ectozytotischer Prozess denkbar. Bei der Ectozytose werden Membranvesikel von der Oberflächenmembran direkt nach außen abgeschnürt. Auf diese Weise wird zum Beispiel der ebenfalls porenbildende „Membrane Attack Complex“ (MAC) von körpereigenen Zellen aus der Membran abgeschieden. Als Teil des Komplementsystems der Immunabwehr richtet sich der MAC z.B. gegen bakterielle Erreger, die durch die Porenbildung zerstört werden sollen (Pilzer et al. 2005). Dieser Prozess wurde jedoch auch bei humanen Erythrozyten nachgewiesen (Iida et al. 1991). Wäre ein ectozytotischer Mechanismus für die Schlüsse von LLO-Poren verantwortlich, so hätten Porenschlüsse auch bei den Messungen an Erythrozyten auftreten müssen.

Somit erscheint ein Ca^{2+} -abhängiger, Caveolae-unabhängiger Endozytosemechanismus zur Erklärung der Porenschlüsse am wahrscheinlichsten. Da bei allen Experimenten die Häufigkeit aller drei Porenschlusskinetiken in gleicher Weise beeinflusst wurde, basieren diese offensichtlich auf demselben Mechanismus.

Die Elimination von LLO-Poren durch die Zelle ist vermutlich als Abwehr- oder Reparaturversuch der Zelle zu interpretieren. Möglicherweise nutzen die Listerien die induzierten Endozytose-Stellen jedoch als Eintrittsportale in die Wirtszelle. Den Zellen würde damit der eigene endozytotische Abwehrmechanismus zum Verhängnis.

4.4 Rolle der Phospholipasen C bei der Porenbildung

Die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, sich nach der Invasion und Ausbreitung von Zelle zu Zelle aus dem Primär- bzw. Sekundärphagosom zu befreien, wird zwar hauptsächlich von LLO bestimmt, daneben jedoch auch durch zwei listerielle Enzyme mit Phospholipase C-Aktivität beeinflusst (Vazquez-Boland et al. 2001). Während die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) offensichtlich an der Befreiung der Listerien aus dem Primärphagosom beteiligt ist, beeinflusst die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) die Verbreitung von Zelle zu Zelle. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Enzyme entweder selber in der Lage sind, Zellmembranen zu permeabilisieren, oder dass sie LLO bei der Porenbildung und Lyse unterstützen.

In den Patch-Clamp-Experimenten dieser Arbeit zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der porenbildenden Aktivität der bakterienfreien Überstände vom *L.m.*-Wildtyp und einer $\Delta\text{plcAplcB}$ -Doppelmutante, die die beiden Phospholipasen nicht produziert. Demnach ist LLO zumindest extrazellulär alleine für die Porenbildung verantwortlich und wird nicht durch die listeriellen Phospholipasen unterstützt.

4.5 Thiol-Aktivierung von Listeriolysin O

Abgesehen von ihrer Eigenschaft, cholesterolhaltige Membranen zu lysieren, verbindet die Mitglieder der cholesterolabhängigen Zytolysine (CDC = cholesterol dependent cytolysin) ein weiteres Charakteristikum: Ihre hämolytische Wirkung wird durch reduzierende Agenzien wie Thiole verstärkt, weshalb sie früher auch als „thiol-activated cytolysins“ bezeichnet wurden (Billington et al. 1999). Nur zwei Vertretern fehlt diese Eigenschaft, was auf das Fehlen eines ansonsten hochkonservierten Cysteinrests innerhalb der Undecapeptid-Sequenz zurückzuführen ist, der sich bei Listeriolysin an Position 484 befindet. Abgesehen von Ivanovylisin aus *L. ivanovii*, das einen weiteren Cysteinrest außerhalb der Undecapeptid-Sequenz trägt, ist dieses Cystein das einzige im gesamten CDC-Molekül. Wie die Thiol-Aktivierbarkeit zu erklären ist und welche Bedeutung sie im Infektionszyklus hat, ist bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass Thiole nicht nur die hämolytische Aktivität von LLO verstärken, sondern auch einen Einfluss auf die porenbildende Wirkung von LLO haben. Der durch die LLO-Poren vermittelte Nettoladungsfluss konnte mit Hilfe von L-Cystein bzw. N-Acetyl-Cystein (NAC) etwa vervierfacht werden. Die Geschwindigkeit der Porenbildung wurde durch Thiole nicht signifikant beeinflusst. Jedoch zeigte sich, dass sich in Anwesenheit von Thiolen bevorzugt LLO-Poren mit höheren Stromamplituden bildeten. Dies könnte entweder auf höhere Leitfähigkeiten der Poren zurückzuführen sein, oder auf das häufigere gleichzeitige Öffnen mehrerer miteinander gekoppelter („geclusterter“) Einzelporen. Eine mittlere Erhöhung der Porenstromamplituden um ca. 20 pA, wie sie bei Thiolkonzentrationen von 1 mM beobachtet wurde, kann jedoch den Nettoladungsfluss nur um ca. ein Drittel verstärken. Tatsächlich wurde der Nettoladungsfluss bei dieser Konzentration (1 mM) jedoch etwa verdreifacht. Daher müssen die Thiole neben den Porenstromamplituden noch einen weiteren Parameter beeinflussen. Ein Einfluss auf die Häufigkeit der Porenöffnungen oder der Porenschlüsse wurde ausgeschlossen. Vermutlich wurde der Nettoladungsfluss durch verlängerte Offenzeiten der Poren erhöht. Diese These konnte jedoch nicht überprüft werden, da bei den Membranstromregistrierungen ein Großteil der offenen Poren von mehreren nachfolgenden Porenströmen überlagert wurde und somit eine Zuordnung der Porenschlüsse zu bestimmten Porenöffnungen nicht möglich ist. Wie in Abschnitt 4.3 dargelegt, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass es sich bei den Porenschlüssen wahrscheinlich um eine Endozytose der LLO-Poren handelt. Es ist bekannt, dass NAC bestimmte

Endozytoseprozesse inhibieren kann. So setzt es die phagozytotische Aktivität von Knochenmarksmakrophagen herab (Kim et al. 2004) und inhibiert die Endozytose des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (Belleudi et al. 2006). Demnach wäre eine Veränderung der Offenzeiten von LLO-Poren durch eine Beeinflussung der Endozytose durch Thiole möglich. Jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass die Thiole die Offenzeiten durch eine direkte Interaktion mit den LLO-Poren verändern können. Eine Modulation durch Thiole konnte erst kürzlich wieder für einen endogenen Ionenkanal von *Xenopus*-Oocyten (Schnizler et al. 2007) und den „Transient Receptor Potential A1“ Ionenkanal gezeigt werden (Macpherson et al. 2007). Um aufzuklären, ob und gegebenenfalls wie die Offenzeiten von LLO-Poren durch Thiole beeinflusst werden können, müssten Versuche mit extrem niedrigen LLO-Konzentrationen durchgeführt werden, in denen sich die Offenzeiten einzelner LLO-Poren möglichst nicht überlappen.

Die Thiol-Aktivierung könnte neben dem sauren pH-Optimum von LLO (Beauregard et al. 1997) zu seiner kompartimentspezifischen Wirkung beitragen. Folgende Hypothese für die Regulation der Wirkung von LLO im Verlauf des Infektionszyklus könnte aufgestellt werden: Im extrazellulären Stadium der Listerien ist das von ihnen sezernierte LLO im Blutplasma nur einer Konzentration von ca. 30 μM an nicht-proteinischen Thiolen (Ayers et al. 1986) ausgesetzt. In diesem Konzentrationsbereich war in Patch-Clamp-Experimenten noch keine Verstärkung der porenbildenden Wirkung von LLO zu beobachten. Dem entsprechend ist im extrazellulären Stadium der Listerien nur eine sublytische Porenbildung zu erwarten, die z.B. Ca^{2+} -vermittelte Reaktionen induziert und wichtig für die Aufnahme der Listerien in die Zelle ist. Nach der Invasion kommt das von den Bakterien sezernierte LLO jedoch mit weitaus höheren Thiol-Konzentrationen in Kontakt. Die intrazelluläre Konzentration von Glutathion, das mit über 95 % den Hauptanteil intrazellulärer nicht-proteinischer Thiole ausmacht, liegt im millimolaren Bereich (Dickinson & Forman 2002). Im Phagosom sind sogar noch höhere Konzentrationen zu erwarten, da dort generell ein stärker reduzierendes Milieu herrscht (Deneke 2000) und die Spaltung von Disulfidbrücken einen Standardprozess bei der Degradation phagozytierter Proteine darstellt (Bohley & Seglen 1992). In den Patch-Clamp-Versuchen konnte bei einer Thiol-Konzentration von 1 mM bereits eine Verdreifachung der LLO-Wirkung beobachtet werden. Das phagosomale Milieu führt also wahrscheinlich zu einer Verstärkung der LLO-Wirkung vom sublytischen in den lytischen Bereich. Hinzu kommt, dass die sezernierten LLO-Mengen im Phagosom aufgrund der engen räumlichen Begrenzung zu sehr hohen LLO-Konzentrationen führen im Vergleich zu den Konzentrationen im Blutplasma.

Die hämolytische Wirkung von LLO ließ sich durch die Thiole fast genauso stark erhöhen wie der in Patch-Clamp-Experimenten gemessene Ladungsfluss. Gegenüber Patch-Clamp-Versuchen zeigten sich L-Cystein und NAC in Hämolyseversuchen wesentlich potenter: Zum Erreichen der halbmaximalen Verstärkung waren geringere Thiol-Konzentrationen als in den Patch-Clamp-Versuchen erforderlich. Die Ursache hierfür könnte sein, dass bei den Hämolyseversuchen wesentlich höhere LLO-Konzentrationen eingesetzt wurden, was die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung mit den Thiolen erhöht. Die höhere Potenz der Thiole bei der Hämolyse könnte jedoch auch auf das Unvermögen der Erythrozyten zur Membranreparatur zurückzuführen sein, das diese Zellen gegenüber einmal gebildeten LLO-Poren empfindlicher macht als es kernhaltige Zellen sind. Interessanterweise war L-Cystein in Hämolyseversuchen, nicht jedoch in Patch-Clamp-Experimenten signifikant potenter als NAC. Dies könnte auf einen zusätzlichen Effekt der Acetylgruppe von NAC bei der Hämolyse hinweisen.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch die Invasion der Listerien in Zielzellen unter Einfluss der Thiole deutlich erfolgreicher ist und damit tatsächlich relevant für die Virulenz von *L. monocytogenes* sein kann. Die intrazelluläre Glutathion-Konzentration wird normalerweise von verfügbarem Cystein limitiert (Santangelo 2003). Dessen Konzentration kann bei Entzündungen massiv ansteigen (Cotgreave et al. 1988, Santangelo 2003). Auch zelluläre Stressreaktionen sind oftmals mit Änderungen im zellulären Thiolgehalt assoziiert (Dickinson & Forman 2002). Daher könnten Entzündungsreaktionen und andere Stressantworten aufgrund der Thiol-Aktivierbarkeit von LLO zu komplexen Wechselspielen zwischen Bakterien und Wirtszellen führen, die vielleicht maßgeblich über den Erfolg oder Misserfolg der Infektion entscheiden. Dieser Aspekt könnte auch hinsichtlich der Thiol-Aktivierbarkeit anderer CDCs von obligat extrazellulären Bakterien von Interesse sein.

Es ist zu bedenken, dass die Thiol-Homöostase nicht nur durch physiologische Prozesse, sondern auch durch Gabe sogenannter Cystein-Prodrugs beeinflusst werden kann. N-Acetyl-Cystein ist der Prototyp solcher Cystein-Donoren (Santangelo 2003). Intravenös oder oral appliziert wird es überwiegend in der Leber deacetyliert und steht dann als Cystein für die zelluläre Glutathionproduktion zur Verfügung. Die einzige gesicherte klinische Wirkung von NAC besteht in der Vermeidung von Leberschädigungen nach Paracetamol-Überdosierung. Weitaus häufiger ist jedoch die Anwendung als Mukolytikum, obwohl diese Wirkung bisher nicht belegt wurde (Gillissen 2006). Da NAC rezeptfrei erhältlich ist, wird es oft bei allgemeinen Erkältungserscheinungen ohne ärztliche

Rücksprache eingenommen. Übliche Einzeldosen von 400 mg NAC können zu Plasmaspitzenkonzentrationen von bis zu 25 μM führen (Holdiness 1991) und die Konzentration an nicht-proteinischen Thiolen auf über 50 μM erhöhen. Diese Konzentrationen führten in den Invasionsexperimenten der vorliegenden Arbeit bereits zu einer erhöhten Invasionsrate der Listerien in die Zellen und könnten daher die Virulenz von *L. monocytogenes* verstärken. Wenn man bedenkt, dass bei „banalen“, d.h. klinisch kaum auffälligen Listerieninfektionen häufig Erkältungssymptome auftreten, ist eine Selbstmedikation mit NAC vermutlich nicht selten. Auch von ärztlicher Seite wird die Listeriose aufgrund der Erkältungssymptome anfänglich oftmals als Influenza fehldiagnostiziert (Schlech 2000). In diesen Fällen könnte die Gabe von NAC die Prognose verschlechtern, da es die Porenbildung, die lytische Wirkung von LLO und die Invasion der Listerien in die Wirtszellen verstärkt.

4.6 Einfluss von Protamin auf die Wirkung von Listeriolysin O

Schwere Listerieninfektionen sind zwar sehr selten, enden jedoch trotz adäquater medizinischer Behandlung in bis zu 30 % der Fälle tödlich. Da der Pathogenitätsfaktor LLO maßgeblich die Virulenz von *L. monocytogenes* bestimmt, könnte die pharmakologische Hemmung LLO-induzierter Effekte eine Möglichkeit zur besseren Behandlung der Listeriose bieten. Aufgrund seiner vielen positiven Ladungen ist für das Polypeptid Protamin eine gute Wechselwirkung mit der Zellmembran zu erwarten und aufgrund seiner Molmasse von ca. 4,5 kDa ist vorstellbar, dass es in der Lage ist, LLO-Poren zu verschließen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich Protamin zur Inhibition von LLO-Poren eignet. Die Applikation von Protamin (100 nM) nach der Bildung von LLO-Poren hatte nur einen geringen Einfluss auf den durch LLO-Poren vermittelten Membranstrom. Wurden jedoch die HEK293-Zellen vor der LLO-Applikation für 10 min mit 100 nM Protamin vorinkubiert, ließ sich die Porenbildung vollständig verhindern. Die Tatsache, dass die Wirkung von Protamin bei einer Verkürzung der Inkubationszeit von 10 min auf 30 s abnahm, impliziert eine Wechselwirkung von Protamin mit den Zellen. Möglicherweise besetzt Protamin Bindungsstellen an der Zellmembran, die für die Bindung von LLO-Molekülen erforderlich sein könnten. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass Protamin die Bindung von „low density lipoprotein“ (LDL), dem Haupttransportprotein für Cholesterol im menschlichen Plasma, an seinen Rezeptor blockiert. Dabei scheint es sich nicht um einen kompetitiven Verdrängungsmechanismus zu handeln (Brown et al. 1978).

Wirkt Protamin an der Zelle, könnte dies bedeuten, dass Protamin diese Zelle nicht nur vor

LLO, sondern auch vor anderen porenbildenden Toxinen schützen kann. Die Wirkung von Protamin auf die porenbildende Wirkung von Streptolysin, einem weiteren Mitglied der CDCs, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jacobus untersucht. Nach der Vorinkubation mit Protamin war jedoch eine normale Porenbildung durch Streptolysin O zu beobachten und es konnte kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden (Jacobus 2006). Bei Versuchen mit dem porenbildenden α -Hämolysin aus *Escherichia coli*, welches der Familie der RTX-Toxine (repeats in toxins) angehört, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Schutzwirkung festgestellt werden. Diese Ergebnisse schließen eindeutig aus, dass der Wirkmechanismus von Protamin vollkommen unspezifisch sein könnte.

Durch Vorinkubation mit Protamin ließ sich nicht nur die Bildung sublytischer LLO-Poren in Patch-Clamp-Experimenten unterbinden, sondern auch die LLO-induzierte Hämolyse. Für eine 50 %-ige Hemmung waren hierbei mit 0,8 nM niedrigere Protamin-Konzentrationen nötig als bei den Patch-Clamp-Experimenten (18 nM). Vermutlich wird eine Schutzwirkung an HEK293-Zellen erst bei höheren Protaminkonzentrationen messbar, weil dieser Zelltyp der LLO-Wirkung schon selbst entgegenwirken kann. Erythrozyten verfügen dagegen über keine Reparaturmechanismen, weshalb sich der Schutz durch Protamin besonders stark bemerkbar macht: Eine Protamin-Konzentration von 0,8 nM reichte bereits aus, um die Wirkung von 7 nM LLO um 50 % zu senken. Diese Tatsache unterstreicht nochmals die Vermutung, dass die Schutzwirkung von LLO offensichtlich nicht auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Protamin und LLO beruht, zumal der Hill-Koeffizient auf eine 1:1-Reaktion schließen ließ. Der Reaktionspartner von Protamin scheint sich vielmehr in der Zellmembran zu befinden.

Um zu prüfen, ob sich durch die Blockade der porenbildenden LLO-Wirkung tatsächlich die Infektion von Wirtszellen durch *L. monocytogenes* beeinflussen lässt, wurden Invasionsversuche durchgeführt. Die Invasionsrate in HEp2-Zellen ließ sich dabei durch Vorinkubation der Zellen mit Protamin nahezu vollständig unterbinden. Diese Tatsache ließ zunächst vermuten, dass die Inhibition der Invasion alleine auf die durch Protamin reduzierte LLO-Wirkung zurückzuführen ist. Protamin war jedoch überraschenderweise auch in der Lage, die Invasion von von *L.m. Δ hly*, einer Mutante, die kein LLO exprimiert, vollständig zu blockieren. Zur 50 %-igen Inhibition war bei *L.m. Δ hly* im Vergleich zum Wildtyp jedoch etwa die doppelte Protamin-Konzentration erforderlich. Die niedrigere Potenz von Protamin bei *L.m. Δ hly* impliziert, dass die Invasion hier über einen anderen Mechanismus gehemmt wird als beim Wildtyp. Möglicherweise lässt sich die Wirkung auf die Invasion von *L.m. Δ hly* durch die bakterizide Wirkung von Protamin erklären. Diese beruht offensichtlich auf seiner

ebenfalls lytischen Wirkung und ist unter anderem auch für Listerien nachgewiesen (Hansen & Gill 2000, Lopez-Solanilla et al. 2003, Potter et al. 2004). Allerdings lagen die von Potter et al. angegebenen minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) für zwei verschiedene *L. monocytogenes*-Stämme bei etwa 300 und 700 μM . Selbst die in den Arbeiten von Hansen & Gill, Lopez-Solanilla et al. sowie Potter et al. ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen für das Bakterienwachstum (MHK) lagen bei 1 bis 16 μM . Die Invasion der Listerien in HEp2-Zellen ließ sich hingegen schon mit 1 μM Protamin vollständig blockieren und scheint daher von seiner bakteriziden Wirkung unabhängig zu sein.

Auch Protaminsulfat, das in der Medizin als Heparin-Antidot und zur Herstellung von NPH-Verzögerungsinsulin (Neutral-Protamin-Hagedorn-Insulin) verwendet wird, verhinderte wirksam die Invasion von *L. monocytogenes* in HEp2-Zellen.

In einer pharmakokinetischen Studie von Butterworth et al. (2002) mit 17 Probanden führte eine langsame intravenöse Einzeldosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht, wie sie bei Heparin-Neutralisierung üblich ist, zu Spitzen-Plasmakonzentrationen zwischen etwa 0,1 und 1 mM Protamin. In Anbetracht der Tatsache, dass Protaminsulfat bereits für oben genannte Indikationen klinisch erprobt ist und in Invasionsversuchen schon in Konzentrationen Wirksamkeit zeigte, die weit unter den Blutplasma-Konzentrationen nach Heparin-Antagonisierung liegen, lassen diese Ergebnisse auf einen möglichen klinischen Nutzen bei Listerieninfektionen hoffen.

5 Zusammenfassung

Das cholesterolabhängige Zytolysin Listeriolysin O (LLO) ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor des grampositiven Bakteriums *Listeria (L.) monocytogenes* und erfüllt im Verlauf einer Infektion verschiedene wichtige Funktionen. Dazu gehören die Induktion verschiedener Zellreaktionen bei sublytischen LLO-Konzentrationen und die Lyse von zellulären Membranen bei hohen LLO-Konzentrationen. Diese Wirkungen werden größtenteils durch die von LLO gebildeten Membranporen vermittelt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit der Charakterisierung der Eigenschaften dieser Poren. Weitere Schwerpunkte sind die Untersuchung der lytischen Wirkung von LLO und seiner Bedeutung für die Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen.

Ein besonderes Merkmal der LLO-Poren, die mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an HEK293-Zellen untersucht wurden, ist das Auftreten von Porenschlüssen. Diese Schlüsse waren in der zellfreien Outside-Out-Konfiguration seltener und bei menschlichen Erythrozyten fast gar nicht zu beobachten. Sie beruhen demnach vermutlich auf einer endozytotischen Elimination der Poren von der Oberflächenmembran. Dieser Eliminationsprozess ist offensichtlich stark von dem durch die LLO-Poren vermittelten Ca^{2+} -Einstrom abhängig und wird durch eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts erleichtert.

Es ist bekannt, dass bei der Befreiung von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom von Wirtszellen neben LLO zwei von den Listerien sezernierte Phospholipasen C von Bedeutung sind. Mit Hilfe einer Deletionsmutante, die diese Enzyme nicht exprimiert, konnte jedoch gezeigt werden, dass die listeriellen Phospholipasen C zumindest extrazellulär keinen Einfluss auf die Porenbildung haben.

Es zeigte sich, dass zur Hämolyse etwa 10-fach höhere LLO-Konzentrationen erforderlich sind als zur sublytischen Porenbildung. Die hämolytische Wirkung cholesterolabhängiger Zytolysine lässt sich charakteristischerweise durch Thiole und andere reduzierende Agenzien verstärken. Mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten konnte auch eine Aktivierung sublytischer LLO-Poren nachgewiesen werden. Die Verstärkung des LLO-induzierten Ladungsflusses über die Zellmembran in Anwesenheit von Thiolen ist nur teilweise durch das vermehrte Auftreten hoher Porenstromamplituden zu erklären. Als weiterer Faktor ist eine Verlängerung der Porenoffenzeiten in Betracht zu ziehen. Möglicherweise ist die Thiol-Aktivierbarkeit wichtig für die kompartimentspezifische Wirkung von LLO. Am Modell menschlicher Larynxkarzinomzellen konnte die Invasion von *L. monocytogenes* durch

Zugabe von Thiolen erhöht werden. Daher ist denkbar, dass physiologische oder pharmakologische Erhöhungen der Thiol-Konzentration im Plasma die Pathogenität von *L. monocytogenes* verstärken.

Aufgrund der hohen Bedeutung von LLO-Poren für die Pathogenität von Listerien stellt deren Verhinderung oder Blockade einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von Listerieninfektionen dar. In der vorliegenden Arbeit gelang es, die LLO-Porenbildung an HEK293-Zellen durch Vorinkubation mit nanomolaren Konzentrationen des Polypeptids Protamin nahezu vollständig zu blockieren. Auch die hämolytische Aktivität von LLO ließ sich auf diese Weise unterbinden. In Invasionsexperimenten wurde belegt, dass die Hemmung der Porenbildung auch einen wirksamen Schutz vor der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen bietet. Der Wirkmechanismus von Protamin beruht offensichtlich in erster Linie auf einer Wechselwirkung mit der Zelle. Allerdings scheint Protamin die Invasion zusätzlich auch über einen porenunabhängigen Mechanismus zu beeinflussen und hemmt selbst die Invasion LLO-defizienter Mutanten. Da Protaminsulfat die Invasion ebenso eindrucksvoll verhinderte und für diese Substanz bereits pharmakotherapeutische Erfahrungen am Menschen vorliegen, lassen diese Ergebnisse auf einen möglichen klinischen Nutzen bei Listerieninfektionen hoffen.

5 Summary

The cholesterol dependent cytolysin listeriolysin O (LLO) is an essential virulence factor of the gram-positive bacterium *Listeria (L.) monocytogenes* and fulfills various important functions during the infection process. These include induction of multiple cell reactions at sublytic LLO-concentrations and lysis of cellular membranes at high LLO-concentrations. Most effects are mediated by membrane pores that are formed by LLO. A major topic of the present work is the characterization of the properties of these pores. Further central points are the lytic effect and the relevance of LLO for the invasion of *L. monocytogenes* into host cells.

A special feature of LLO-formed pores, which were investigated on HEK293 cells with the patch clamp technique, is the occurrence of pore closings. These closings however were rare in the cell-free outside-out configuration and almost absent in experiments with human red blood cells. Thus they seem to be due to an endocytic elimination of the pores from the cell

membrane. This elimination process obviously depends strongly on Ca^{2+} -influx through the LLO-formed pores and is facilitated by a destabilization of the actin cytoskeleton.

Further to LLO, two phospholipases C secreted by *L. monocytogenes* are known to be involved in the escape of listeria from the phagosome. With a deletion mutant that does not express these enzymes, we were able to show that the listerial phospholipases C do not have an impact on pore formation, at least from the extracellular side of the membrane.

We found that hemolysis requires about 10-fold higher LLO-concentrations compared to those needed for sublytic pore-formation. The hemolytic effect of cholesterol dependent cytolysins can characteristically be enhanced by thiols and other reducing agents. The present work shows that thiol-activation already happens on the level of sublytic pore-formation. The observed enhancement of the LLO-induced transmembrane charge flow in presence of thiols can partly be explained by a more frequent occurrence of high pore current amplitudes. Prolonged open times must be taken into account as a further important factor. Thiol-activation might be important for the specific action of LLO in different compartments. Using human larynx carcinoma cells as an invasion model, we found that the invasion rate of listeria in host cells was enhanced in the presence of thiols. Physiological or pharmacological elevations of the plasma thiol-concentrations might thus lead to a higher pathogenicity of *L. monocytogenes*.

Because of the high relevance of LLO-formed pores for the pathogenicity of listeria, the prevention or blockade of the pores constitutes a promising therapeutical approach for listerial infections. In the present work pore-formation in HEK293 cells by LLO was successfully blocked by preincubation of the cells with nanomolar concentrations of the polypeptide protamine. By this means, hemolysis of sheep red blood cells of LLO was also prevented. Furthermore, the inhibition of pore-formation by protamine provided an effective protection from invasion of *L. monocytogenes* into host cells. Protamine action is obviously due to interaction with the cell. But additionally, protamine seems to influence invasion in a pore-independent way and therefore even inhibits invasion of LLO-deficient mutants. Protamine sulfate prevented invasion just as impressive as protamine itself. Since protamine sulfate is used in humans already in particular therapeutic situations, these results give hope for a possible clinical benefit also in pharmacotherapy of listerial infections.

6 Literaturverzeichnis

- Alouf J E (2001) Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 257:1-14
- Ayers F C, Warner G L, Smith K L & Lawrence D A (1986) Fluorometric quantitation of cellular and nonprotein thiols. *Anal Biochem* 154:186-193
- Barry P H & Lynch J W (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121:101-117
- Beauregard K E, Lee K D, Collier R J & Swanson J A (1997) pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 186:1159-1163
- Becker F F (1961) Studies on the hemolytic properties of protamine. *J Gen Physiol* 44:433-442
- Belleudi F, Leone L, Aimati L, Stirparo M G, Cardinali G, Marchese C, Frati L, Picardo M & Torrisi MR (2006) Endocytic pathway and biological effects induced by UVB-dependent or ligand-dependent activation of the keratinocyte growth factor receptor. *FASEB* 20:395-397
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, Hille B, Kohler K, Kolb H A & MacRobbie E (1992) Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258:873-874
- Bielecki J, Youngman P, Connelly P & Portnoy D A (1990) *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345:175-176
- Billington S J, Jost B H, Cuevas W A, Bright K R & Songer J G (1997) The *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. *J Bacteriol* 179:6100-6106
- Bohley P & Seglen P O (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151-157
- Brown M S, Deuel T F, Basu S K & Goldstein J L (1978) Inhibition of the binding of low-density lipoprotein to its cell surface receptor in human fibroblasts by positively charged proteins. *J Supramol Struct* 8:223-234
- Butler R S (2005) Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* und chromosomaler Punktmutanten induzierten Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen. Dissertationsschrift, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen

- Butterworth J, Lin Y A, Prielipp R, Bennett J & James R (2002) The pharmacokinetics and cardiovascular effects of a single intravenous dose of protamine in normal volunteers. *Anesth Analg* 94:514-522
- Carrero J A, Calderon B & Unanue E R (2004) Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol* 172:4866-4874
- Coconnier M H, Lorrot M, Barbat A, Laboisse C & Servin A L (2000) Listeriolysin O-induced stimulation of mucin exocytosis in polarized intestinal mucin-secreting cells: evidence for toxin recognition of membrane-associated lipids and subsequent toxin internalization through caveolae. *Cell Microbiol* 2:487-504
- Cooper J A (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478
- Cotgreave I A, Johansson U, Moldeus P & Brattsand R (1988) Lung and systemic thiol homeostasis during an acute lung inflammation in the rat. *Toxicology* 50:331-343
- Czajkowsky D M, Hotze E M, Shao Z & Tweten R K (2004) Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *Embo J* 23:3206-3215
- Darji A, Chakraborty T, Niebuhr K, Tsonis N, Wehland J & Weiss S (1995) Hyperexpression of listeriolysin in the non-pathogenic species *Listeria innocua* and high yield purification. *J Biotechnol* 43:205-212
- Deneke S M (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36:151-180
- Dickinson D A & Forman H J (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-1026
- Drams S, Levi S, Triller A & Cossart P (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* 66:4461-4468
- Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 275:C327-342
- Falnes P O & Sandvig K (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 12:407-413
- Gaillard J L, Berche P, Mounier J, Richard S & Sansonetti P (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* 55:2822-2829
- Gaillard J L, Berche P, Frehel C, Gouin E & Cossart P (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127-1141

- Gedde M M, Higgins D E, Tilney L G & Portnoy D A (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68:999-1003
- Giddings K S, Johnson A E & Tweten R K (2003) Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11315-11320
- Gillissen A (2006) N-Acetylcystein (NAC), was wissen wir über seine Wirkung? *Arzneiverordnung in der Praxis*, Juli 2006, 73-75
- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couve E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Dominguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian K D, Fsihi H, Garcia-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gomez-Lopez N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones L M, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente J M, Ng E, Nedjari H, Nordisiek G, Novella S, de Pablos B, Perez-Diaz J C, Purcell R, Rimmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vazquez-Boland J A, Voss H, Wehland J & Cossart P (2001) Comparative genomics of *Listeria species*. *Science* 294:849-852
- Grundling A, Gonzalez M D & Higgins D E (2003) Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J Bacteriol* 185:6295-6307
- Gundelfinger E D, Kessels M M & Qualmann B (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:127-139
- Guzman C A, Rohde M, Chakraborty T, Domann E, Hudel M, Wehland J & Timmis K N (1995) Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun* 63:3665-73
- Hansen L T & Gill T A (2000) Solubility and antimicrobial efficacy of protamine on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* as influenced by pH. *J Appl Microbiol* 88:1049-1055
- Holdiness M R (1991) Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 2:123-134
- Huang L, Gao X, Sorgi F L, Paul R W, Sloane D L & Loomis A G (1999). Stable lipid-comprising drug delivery complexes and methods for their production. USA. Abzurufen unter <http://www.freepatentsonline.com/6008202.htm>
- Iida K, Whitlow M B & Nussenzweig V (1991) Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *J Immunol* 147:2638-2642
- Jacobs T, Darji A, Frahm N, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T & Weiss S (1998) Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Mol Microbiol* 28:1081-1089

- Jacobus B K (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische sowie pathophysiologische Beeinflussung der durch Streptolysin O gebildeten Poren. Dissertationsschrift, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen
- Johansen C, Verheul A, Gram L, Gill T & Abee T (1997) Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:1155-1159
- Kayal S, A Lilienbaum, Poyart C, Memet S, Israel A & Berche P (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 31:1709-1722
- Khelef N, Lecuit M, Buchrieser C, Cabanes D, Dussurget O & Cossart P (2005) *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Dworkin M (Herausgeber) Springer Verlag. Abzurufen unter <http://141.150.157.117:8080/ptokPUB/index.htm>
- Kim J M, Kim H, Kwon S B, Lee S Y, Chung S C, Jeong D W & Min B M (2004) Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 325:101-108
- Koschinski A (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. Dissertationsschrift, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen
- Larsen E H, Gabriei S E, Stutts M J, Fullton J, Price E M & Boucher R C (1996) Endogenous chloride channels of insect sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. *J Gen Physiol* 107:695-714
- Lokeshwar V B, Huang S S & Huang J S (1989) Protamine enhances epidermal growth factor (EGF)-stimulated mitogenesis by increasing cell surface EGF receptor number. Implications for existence of cryptic EGF receptors. *J. Biol. Chem.* 264:19318-19326
- Lopez-Solanilla E, Gonzalez-Zorn B, Novella S, Vazquez-Boland J A & Rodriguez-Palenzuela P (2003) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol Lett* 226:101-105
- Luzio J P, Poupon V, Lindsay M R, Mullock B M, Piper R C & Pryor P R (2003) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20:141-154
- Macpherson L J, Dubin A E, Evans M J, Marr F, Schultz P G, Cravar B F & Patapoutian A (2007) Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 455:541-545

- Marquis H, Doshi V & Portnoy D A (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* 63:4531-4534
- Mayer G, Vogel V, Weyermann J, Lochmann D, van den Broek J A, Tziatzios C, Haase W, Wouters D, Schubert U S, Zimmer A, Kreuter J & Schubert D (2005) Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: Protamine sulfate causes drastic size reduction. *J Control Release* 106:181-187
- McNeil P L (2002) Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci* 115:873-879
- McNeil P L & Steinhardt R A (2003) Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:697-731
- Mengaud J, Vicente M F, Chenevert J, Pereira J M, Geoffroy C & Gicquel-Sanzey B (1988) Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 56:766-72
- Miyake K, McNeil P L, Suzuki K, Tsunoda R & Sugai N (2001) An actin barrier to resealing. *J Cell Sci* 114:3487-3494
- Nabi I R & Le P U (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161 (4):673-677
- Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, Fushitani K, Whiley R A, Tsuji A & Matsuda Y (1996) Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect Immun* 64:3093-3100
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-131
- Nishibori T, Xiong H, Kawamura I, Arakawa M & Mitsuyama M (1996) Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect Immun* 64:3188-3195
- Palmer M (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39:1681-1689
- Park Y J, Liang J F, Ko K S, Kim S W & Yang V C (2003) Low molecular weight protamine as an efficient and nontoxic gene carrier: in vitro study. *J Gene Med* 5:700-711
- Parton R G & A A Richards (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4:724-738
- Peixoto E B & Collares-Buzato C B (2005) Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased tight junction-associated protein expression in cultured MDCK strains. *Cell Struct Funct* 29:165-178

- Pelkmans L & Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3:311-320
- Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli J A & Fishelson Z (2005) Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* 27:375-387
- Pizarro-Cerda J & Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715-727
- Porat A & Z Elazar (2000) Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium. *J Biol Chem* 275:29233-72923
- Portnoy D A, Jacks P S & Hinrichs D J (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 167:1459-1471
- Portnoy D A, Chakraborty T, Goebel W & Cossart P (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 60:1263-1267
- Potter R, Hansen L T & Gill T A (2005) Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: importance of electrostatic interactions. *Int J Food Microbiol* 103:23-34
- Poussin M A & Goldfine H (2005) Involvement of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C and host protein kinase C in permeabilization of the macrophage phagosome. *Infect Immun* 73:4410-4413
- Qualmann B, Kessels M M & Kelly R B (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150:111F-116
- Reddy A, Caler E V & Andrews N W (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157-69
- Repp H, Pamukci Z, Koschinski A, Domann E, Darji A, Birringer J, Brockmeier D, Chakraborty T & Dreyer F (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell Microbiol* 4:483-491
- Rocourt J & Cossart P (1997) *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle M P, Beuchat L R & Montville T J (Herausgeber) ASM Press: 337-352
- Rogers S, Wells R & Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368
- Rossjohn J, Feil S C, McKinstry W J, Tweten R K & Parker M W (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89:685-692

- Santangelo F (2003) Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Curr Med Chem* 10:2599-2610
- Schiavo G & van der Goot F G (2001) The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:530-537
- Schlech W F (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* 31:770-775
- Schluter D, Domann E, Buck C, Hain T, Hof H, Chakraborty T & Deckert-Schluter M (1998) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infect Immun* 66:5930-5938
- Schluter D, Buck C, Reiter S, Meyer T, Hof H & Deckert-Schluter M (1999) Immune reactions to *Listeria monocytogenes* in the brain. *Immunobiology* 201:188-95
- Schmid M W, Ng E Y, Lampidis R, Emmerth M, Walcher M, Kreft J, Goebel W, Wagner M & Schleifer K H (2005) Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol* 28:1-18
- Schnizler M K, Bogdan R, Bennert A, Bury N R, Fronius M & Clauss W (2007) Short-term exposure to waterborne free silver has acute effects on membrane current of *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1768:317-323
- Seeliger H & Jones D (1986) Genus *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath M, Sarpe N & Holt J (Herausgeber) Williams & Wilkins Verlag:1235-1245
- Sheetz M P, Sable J E & Dobereiner H G (2006) Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:417-434
- Shen S S, Tucker W C, Chapman E R & Steinhardt R A (2005) Molecular regulation of membrane resealing in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 280:1652-1660
- Shyng S L, Heuser J E & Harris D A (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125 (6):1239-1250
- Smith G A, Marquis H, Jones S, Johnston N C, Portnoy D A & Goldfine H (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 63:4231-4237
- Stahlmann R & Lode H (2005) Aminoglykosidantibiotika. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F & Starke K (Herausgeber) Urban & Fischer Verlag, 9. Auflage:812-817
- Tang P, Rosenshine I, Cossart P & Finlay B B (1996) Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun* 64:2359-2361

- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M & van Deurs B (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13:238-250
- Tilley S J, Orlova E V, Gilbert R J, Andrew P W & Saibil H R (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121:247-256
- Tilney L G & Portnoy D A (1989) Actin filaments and the growth, movement & spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597-1608
- Todar K (2003) *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [html] Abzurufen unter <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>
- Togo T, Alderton J M, Bi G Q & Steinhardt R A (1999) The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J Cell Sci* 112:719-731
- Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J & Kreft J (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640
- Wikipedia Foundation Inc (2006) *Wikipedia* [html] Abzurufen unter http://de.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes
- Yeung P S, Zagorski N & Marquis H (2005) The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *J Bacteriol* 187:2601-2608
- Yoneda M, Nishizaki T, Tasaka K, Kurachi H, Miyake A & Murata Y (2000) Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized GH3 cells: calcium directly regulates F-actin disassembly. *J Endocrinol* 166:677-687
- Yu S P & Kerchner G A (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 52:612-617

Abkürzungsverzeichnis

Tab. 6: Präfixe verwendeter Einheiten

Symbol	Präfix	Faktor
G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Pico	10^{-12}
f	Femto	10^{-15}

Tab. 7: verwendete Einheiten

Symbol	Einheit
A	Ampere
C	Coulomb
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
s	Sekunde
V	Volt
Ω	Ohm

Tab. 8: sonstige Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
α -Hly	α -Hämolyisin
BHI	<u>b</u> rain- <u>h</u> eart <u>i</u> nfusion
BV-2-Zellen	murine Mikroglia-Zellen
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle's <u>m</u> edium

Abkürzung	Bedeutung
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Konzentration
et al.	et altera (und andere)
FAF-BSA	fatty acid-free bovine serum albumine (fettsäurefreies Rinderserum-Albumin)
FKS	fetales Kälberserum
HEK293-Zellen	human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
HEp2-Zellen	humane Kehlkopfkarzinom-Zellen
IC ₅₀	halbmaximal inhibitorische Konzentration
I _m	Membranstrom
L.	<i>Listeria</i>
L.m.	<i>Listeria monocytogenes</i>
LLO	Listeriolysin O
MEM	minimal essential medium
min	Minute
MW	molecular weight (Molare Masse)
n	Anzahl der Experimente
NAC	N-Acetyl-Cystein
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
Neuro-2a-Zellen	murine Neuroblastom-Zellen
n _H	Hill-Koeffizient
NKS	neonatales Kälberserum
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
PFO	Perfringolysin
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLC	Phospholipase C
q _m	Ladung, die über die Membran fließt
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Δt	Latenzzeit
Tab.	Tabelle
U _m	Membranspannung
v/v	Volumen pro Volumen
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen

Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Anke Bennert

Danksagung

Die „Fähigkeit zur wissenschaftlichen Arbeit“ ist leider nicht angeboren und läßt sich ohne fremde Hilfe nur schwer erlernen und unter Beweis stellen. Allen, die mich dabei unterstützt haben, möchte ich hiermit meine Achtung und meinen Dank aussprechen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei...

...meinen Doktorvater Herrn Prof. Dreyer, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Er war immer bereit, mir bei jedem meiner Anliegen weiterzuhelfen und hat meiner Arbeit vertraut. Besonders gefreut hat mich seine Unterstützung bei meiner Weiterbildung auf allen Gebieten, die mich interessieren.

...Herrn Prof. Clauß, der sich für meine Dissertation im Fachbereich Medizin einsetzte, die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie übernahm und über den ich überhaupt zur Elektrophysiologie gekommen bin.

...Herrn Prof. Domann, der immer bereit war, Wissen und Material für neue Projekte zur Verfügung zu stellen.

...Herrn Prof. Chakraborty für die Bereitstellung von Listerien, gereinigtem Listeriolysin und Schafserythrozyten.

...Herrn Prof. Walev und Prof. Bhakdi für die Bereitstellung von α -Hämolysin.

...Prof. Brockmeier für die statistische Hilfestellung, die Auswertung der Porenstromamplituden und all die Zeit und Mühe, die er in meine Weiterbildung im Fach Pharmakokinetik investiert hat (und investiert).

...die Justus-Liebig-Universität Gießen für die Förderung durch ein Graduierten-Stipendium nach dem Hessischen Gesetz für Nachwuchswissenschaftler.

...Dr. Andreas Koschinski für die Betreuung der ganzen experimentellen Arbeit und die schöne Zusammenarbeit. Er hat immer alles stehen und liegen lassen um uns Doktoranden zu helfen - und das nicht nur bei fachlichen Problemen.

...Dr. Holger Repp, von dem ich viel über Formulierungen, Darstellungsweisen und kritisches Lesen gelernt habe und der sich auch immer sehr erfolgreich um den Spaß- und Wohlfühlfaktor im Labor bemüht hat.

...Christiane Zibuschka für die Einarbeitung und Hilfe im Labor und die liebevolle Pflege „meiner“ Zellen, wenn ich mal nicht da war.

...Beate Dickopf für ihr großes Engagement bei den Hämolyse- und Invasionsassays. Sie hat mir viel Arbeit und als ZuhörerIn auch so manchen Dampf abgenommen.

...Dr. Thomas Eucker für seine exzellenten Erythrozyten.

...all meine Mitdoktoranden und -innen für die nette Zeit. Schade, dass viele von Euch nur so kurz da waren! Besonders froh bin ich, während meiner Doktorarbeit, Dr. (!) Brit Jacobus kennengelernt zu haben. Messstand an Messstand haben wir so manche Forschungshöhen und -tiefen erlebt. Der Kontakt außerhalb des Labors findet zwar nun viel seltener statt, war und ist jedoch für mich mindestens ebenso wichtig.

...wirklich ausnahmslos alle anderen Institutsangehörigen. Mir fällt niemand ein, der mir nicht mal auf die eine oder andere Weise bei meiner Arbeit geholfen hätte. Und sei es „nur“ durch das Mitwirken an der Atmosphäre des Instituts, die einen (fast) immer gerne zur Arbeit kommen ließ.

...Martin Fronius, der mir sowohl als Freund als auch als außenstehender Elektrophysiologe, beim Erstellen von Grafiken und beim Korrekturlesen eine große Hilfe war. Seine größte Leistung bestand aber vermutlich darin, meine Launen und Stimmungen während der Anfertigung dieser Arbeit zu ertragen und in ausgewogenere und produktivere Bahnen zu lenken.

...meine Eltern Horst und Hildegard Bennert. Sie haben mich schon immer in dem gefördert, was mir wichtig war und Spaß machte. Ohne mir diesen Weg vorzugeben, haben sie mir die Schulbildung und das Studium ermöglicht und auch während meiner Doktorarbeit keine Zweifel offen gelassen, dass sie mir im Notfall bedingungslos zur Seite stünden.