Gewinnung und elektrophysiologische Charakterisierung von Listeriolysin O-haltigen Überständen aus Bakterienkulturen von *Listeria monocytogenes* und ihrer Mutanten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Stanislav Kaschinski
aus Andischan / Russland

Gießen 2008

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Gf. Direktor: Prof. Dr. Michael Kracht
Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 22.09.2008

Meiner Mutter und Anna

SINE QUIBUS NON

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 *Listerien spp.* und humane Listeriose 1
1.2 Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* im menschlichen Körper 3
1.3 Virulenzgencluster LIPI-1 im Genom von *Listeria monocytogenes* 4
1.4 Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes* 6
1.5 Aufgabenstellung 8

2 Materialien und Methoden 10

2.1 Zellen 10
2.1.1 Zellkultur 10
2.1.2 Aufbereitung der Zellen für elektrophysiologische Messungen 11

2.2 Elektrophysiologische Messungen 12
2.2.1 Aufbau des Patch-Clamp Messstandes 12
2.2.2 Herstellung der Patchpipetten 14
2.2.3 Whole-Cell Messkonfiguration der Patch-Clamp Technik 14
2.2.4 Badperfusion 16
2.2.5 Regulation der Badtemperatur während der elektrophysiologischen Messungen 17
2.2.6 Intra- und Extrazellulärlösungen 18

2.3 Bakterien 21
2.3.1 Verwendete Bakterienstämme 21
2.3.2 Photometrische Messungen 22

2.4 Liste der verwendeten Substanzen 22

2.5 Statistische Auswertung 25

3 Ergebnisse 26

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen 26

3.2 Gewinnung der Listeriolysin-haltigen, bakterienfreien Überstände aus *Listeria monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen 28
3.2.1 Protokoll zur Gewinnung eines bakterienfreien Überstands 28
3.2.2 Funktion von fettsäurefreiem Rinderserumalbumin im Isolationsprotokoll 30

3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der Listeriolysin-induzierten Poren 33
3.3.1 Poren durch Listeriolysin aus *Listeria monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen 33
3.3.2 Temperaturabhängigkeit der Bildung von Listeriolysin Wildtyp-induzierten Poren 35
3.3.3 Überstand der *Listeria monocytogenes* - Mutante *hly*C484S 36
3.3.4 Überstand der *Listeria monocytogenes* - Mutante *hly*W492A 41

3.4 Pharmakologische Charakterisierung der Listeriolysin-induzierten Poren 42
3.4.1 Wirkung von Dithiothreitol 42
3.4.2 Wirkung von Captopril 44
3.4.3 Wirkung von Protamin 47

4 Diskussion 52

5 Zusammenfassung 60

6 Summary 61

7 Literaturverzeichnis 62

Anhang 71

1 Einleitung

1.1 *Listerien spp.* und humane Listeriose

Aus phylogenetischer Sicht sind die uns heute umgebenden Mikroorganismen wesentlich älter als alle höheren Lebewesen der Erde. Die Entstehung der Archaebakterien und Eubakterien (Prokaryonten) wird vor 3,5 Mrd. Jahren angenommen. Die Eukaryonten haben sich „erst“ vor 800 Mio. Jahren in eine Welt voller Mikroorganismen hinein entwickelt und nutzten dazu Überlebensstrategien wie z. B. die Phagozytose (Metchnikoff 1892). Die meisten Archaebakterien und der größte Anteil der Eubakterien blieben für Eukaryonten apathogen. Ein geringer Anteil der Eubakterien entwickelte jedoch sehr wirksame Angriffsmechanismen gegen die später entstandenen Mehrzeller, unter anderem in Form von spezifischen Toxinen. Die Entstehung des intrazellulären Parasitismus in Eukaryonten bedeutete für bestimmte Mikroorganismen die Sicherstellung einer neuen Existenznische und zeigt eine langfristige Überlebensstrategie im Zusammenleben unterschiedlicher Lebensformen auf. Ein besonderes Beispiel für den intrazellulären Parasitismus stellt die Gattung *Listeria* dar, da zwei ihrer Arten die Fähigkeit zum Überleben innerhalb der eukaryontischen Abwehrzellen erworben haben und die Phagozytose als Eintrittspforte in die Zelle nutzen (Mackaness 1962). Eine der beiden Arten - *L. monocytogenes* - ruft eine selten vorkommende, aber häufig tödlich verlaufende septische Infektion des Menschen hervor, die humane Listeriose.

Eubakterien der Gattung *Listeria* sind grampositive, fakultativ anaerobe Stäbchen der Größe 0,4 x 1-1,5 µm, die keine Sporen bilden können. Die *Listeria spp.* sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie sind im Boden, in Salz- und Süßwasser, in der Nahrung und in menschlichen und tierischen Fäkalien zu finden. Die Gattung *Listeria* umfasst nach aktueller Klassifizierung sechs Arten. Von humanmedizinischer Bedeutung sind nur die beiden intrazellulär überlebenden *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* (Billington et al. 2000).
Die humane Listeriose ist eine durch Nahrungsmittel übertragbare Infektionskrankheit, die durch *L. monocytogenes* hervorgerufen wird (Fleming et al. 1985; Linnan et

al. 1988; Bille 1990; McLauchlin et al. 1990; McLauchlin 1991; McLauchlin et al. 1991; Rocourt 1996; Aureli et al. 2000). Die 1926 bei Kaninchen beschriebene infektionsbedingte periphere Monozytose (Murray et al. 1926) ist eine der ersten Dokumentationen einer Listeriose. Den Erreger nannte man zunächst *Bacterium monocytogenes*. Dieses Bakterium wurde als Ursache der Tiger River Disease in Südafrika angesehen (Pirie 1927). Später wurde das Bakterium in *Listerella* und schließlich in *Listeria* umbenannt (Schlech III 2000). Die Listeriose des Menschen zeigt oft einen schweren Verlauf, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen. Die zwei altersbezogenen Grundformen sind die vertikal übertragbare, perinatale (neonatale) Listeriose und die horizontal übertragbare Listeriose des Erwachsenen.

Bei der **perinatalen Listeriose** benutzen *Listerien* in der erkrankten, eventuell symptomfreien Mutter die Plazenta als Invasionspforte. Die dadurch entstehende Chorioamnionitis führt in ca. 80% der Fälle zum Abort. Wird der Geburtstermin erreicht, so unterscheidet man eine sog. *Frühinfektion* von der *Spätinfektion* mit *Listerien*. Bei der ersteren liegt eine generalisierte Infektion vor, bekannt unter dem klinischen Syndrom der *Granulomatosis infantiseptica*. Sie ist durch disseminierte pyogranulomatöse Abszesse und eine hohe Mortalität charakterisiert. Diese Form der Listeriose steht pathogenetisch im Zusammenhang mit Frühgeburt und Chorioamnionitis. Dagegen wird die Spätinfektion, die sich ca. 1-8 Wochen nach der Geburt als Pneumonie sowie Meningitis manifestiert, als Folge einer Aspiration des kontaminierten maternalen Exsudats angesehen (Vazquez-Boland et al. 2001a; Schuchat & Broome 2003).
Bei der **Erwachsenen-Listeriose** handelt es sich um verschiedene Krankheitsbilder, von denen der ZNS-Befall (55-70%), die Septikoämie (15-50%) und an dritter Stelle die Endokarditis die häufigsten Fälle darstellen. Eine kutane Form der Listeriose tritt als pyogranulomatöser Hautausschlag in Erscheinung und kommt sowohl bei Neugeborenen (Smith et al. 1991) als auch bei Erwachsenen vor, dort gehäuft unter Veterinärärzten und Bauern (McLauchlin & Low 1994).
Der kulturelle Nachweis von *L. monocytogenes* aus Abstrichpräparaten ist für die Diagnose der Listeriose obligat, da der klinische Befund und die Anamnese des Patienten nur richtungweisend sind. Die Auswahl einer mehrwöchigen antibiotischen

Therapie richtet sich nach Krankheitsform bzw. Krankheitsstadium des betroffenen Patienten: (a) bei nicht-schwangeren Patienten sind Ampicillin i.v. oder im Falle einer Penicillinallergie Trimethoprim-Sulfamethoxazol i.v. wirksam, (b) bei immunsupprimierten Patienten empfiehlt sich zusätzlich die Anwendung von Gentamicin i.v., (c) die neonatale Listeriose spricht gut auf eine zweiwöchige intravenöse Ampicillintherapie an, (d) die Schwangerschaftslisteriose wird im letzten Schwangerschaftsmonat mit Ampicillin therapiert, alternativ mit oralen Makroliden. Man sollte sich stets vor Augen halten, dass *Listerien* gegen Cephalosporine resistent sind (Schuchat & Broome 2003).

1.2 Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* im menschlichen Körper

Die Infektionspforte zum menschlichen Organismus für *L. monocytogenes* ist der Gastrointestinaltrakt. *L. monocytogenes* dringt unspezifisch durch die apikale Seite der intestinalen Epithelzellen in das darunterliegende Gewebe ein (Daniels et al. 2000), indem das Bakterium die Eigenphagozytose auslöst (Mackaness 1962; Swanson & Baer 1995; Cossart & Sansonetti 2004). Innerhalb der Epithelzelle durchläuft *L. monocytogenes* einen intrazellulären Lebenszyklus (ausführlich dargestellt bei Domann 1992), welcher unter anderem die Verbreitung „von Zelle zur Zelle“ ermöglicht („Cell to Cell Spread“). Wird die intestinale Epithelschranke von *L. monocytogenes* überwunden, verbreiten sich die Bakterien via Blut und Lymphflüssigkeit in Lymphknoten, Leber und Milz. Experimente an Mäusen ergaben, dass die Bakterien rasch aus der Blutbahn eliminiert werden und über 90% der i.v. verabreichten *Listerien* in den ortsständigen Makrophagen der Leber, den Kupfferzellen, akkumulieren. Die Kupfferzellen induzieren eine antigenabhängige Proliferation der T-Lymphozyten und produzieren Zytokine, wodurch eine Immunantwort auf die Infektion in Gang gesetzt wird (Gregory & Wing 2002; Hume et al. 2002). Da nicht alle Bakterienzellen von Makrophagen abgetötet werden, dringen die *Listerien* auch in die Hepatozyten ein. Bei suffizienter Immunlage entsteht durch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten eine klinisch stumme, granulomatöse Hepatitis. Die Bakterien in der Leber, aber auch in allen anderen *Listerien*-Manifestationsorten im

menschlichen Körper, werden in Mikroabszessen durch eine physikalische Barriere (Abszesswand) zurückgehalten. Ihre Verbreitung wird durch die eigene Kontaktinhibition begrenzt und mittels Wirtszytokinen im Abszessmilieu unterbunden. Die entstehenden Granulome sind ein histopathologisches Korrelat der funktionsfähigen zellulären Immunantwort (Fegeler & Böcker 2000). Im Falle einer inadäquaten Immunantwort bei Menschen mit herabgesetzter Abwehrlage vermehren sich die *Listerien* ungehemmt in der Leber, gelangen im weiteren Krankheitsverlauf in großen Mengen über den Blutkreislauf in die Körperperipherie, wo sie gewebeschädigend proliferieren (Milon 1997). Es konnte demonstriert werden, dass *L. monocytogenes* eine Internalisierung an menschlichen epithelialen, endothelialen und dendritischen Zellen, sowie an Fibroblasten, Hepatozyten und Neuronen auslöst (Vazquez-Boland et al. 2001a).

1.3 Virulenzgencluster LIPI-1 im Genom von *Listeria monocytogenes*

Man geht davon aus, dass es während der Evolution einen Klon von *Listeria* gab, der durch den Erwerb der LIPI-1 (*Listeria* pathogenicity island) DNA-Sequenz mit den darin kodierten Virulenzgenen für eine Aufspaltung der *Listeria*-Vorfahren in zwei phylogenetische Äste sorgte (Abb. 1).

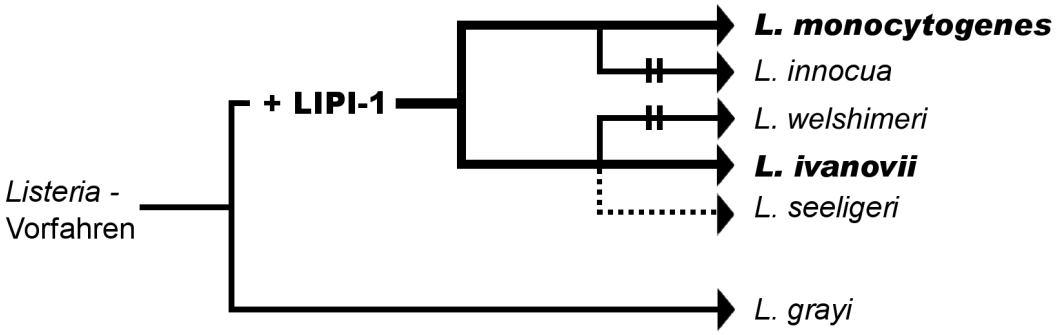

Abb. 1: Angenommene Evolution des Virulenzgenclusters LIPI-1 in der Gattung von *Listeria*. *L. grayi* enthält keine LIPI-1 Sequenz. Die dicken Pfeile weisen auf *Listeria*arten hin, deren LIPI-1 in seiner ursprünglichen Form konserviert ist. Die dünnen Pfeile führen zu *Listeria*arten, die LIPI-1 durch Exzission verloren haben (—‖—). Der gepunktete Pfeil führt zu *L. seeligeri*, bei der LIPI-1 funktionell ausgeschaltet ist (verändert nach Vazquez-Boland et al. 1989).

Während *L. grayi* keine LIPI-1Sequenz erhielt und bis heute saprophytisch geblieben ist, erweiterten die übrigen *Listeria spp.* durch die Ausrüstung mit LIPI-1 ihr Habitat

auf die Warmblüter und wurden somit zu Parasiten. Daraus wird klar, dass die LIPI-1 DNA-Sequenz für den parasitären Infektionszyklus von *Listeria spp.* notwendig ist. Die evolutionären, mutationsbedingten Veränderungen dieses Virulenzgenclusters bestimmen die heutige Artenmannigfaltigkeit der parasitären Form in der Gattung *Listeria*. *L. innocua* und *L. welshimeri* haben LIPI-1 durch Exzission verloren. Bei *L. seeligeri* haben sich die Transkriptionsprodukte von LIPI-1 verändert, wodurch LIPI-1 funktionell ausgeschaltet wurde. Auf diese Weise wurden die drei zuletzt genannten *Listeria*-Arten wieder saprophytisch. Nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* besitzen die LIPI-1 DNA-Sequenz weiterhin in ihrer ursprünglichen Form, wodurch die Kontagiosität dem Menschen gegenüber bedingt ist. *L. ivanovii* befällt hauptsächlich Wiederkäuer (Gonzalez-Zorn et al. 1999, 2000).

Die LIPI-1 DNA-Region des *L. monocytogenes*-Genoms ist 9 kb lang und umfasst sechs Virulenzgene: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* (Abb. 2). Zwei weitere, randständige Gene *orfX* und *orfZ* (open read frame *X* und *Z*) kodieren keine Virulenzfaktoren. Die Transkription des Virulenzgenclusters wird durch den positiven Regulatorfaktor PrfA reguliert (Chakraborty et al. 2000).

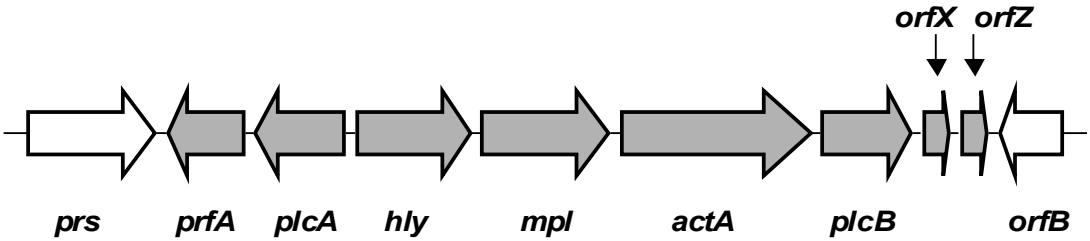

Abb. 2: Physikalische und transkriptionale Organisation des zentralen Virulenzgenclusters LIPI-1 im Genom von *L. monocytogenes*. *Grau:* Gene für Virulenzfaktoren innerhalb des LIPI-1. *Weiß:* angrenzende Gene. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an (verändert nach Vazquez-Boland et al. 1989).

Die funktionelle Bedeutung der einzelnen Genprodukte ist weitgehend aufgeklärt. Sie sind alle in den Mechanismus des intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* eingebunden. Die Sequenzen *plcA*, *plcB* und *hly* kodieren für Proteine, die sich bei der Lyse der Zellmembran synergistisch unterstützen (listerielle Phospholipasen A und B und Listeriolysin O). Die durch *mpl* kodierte Zink-Metalloprotease ist in den Prozess der Aktivierung von pro-PlcB eingebunden (Domann et

al. 1991; Domann 1992; Poyart et al. 1993). Das Translationsprodukt von *actA* sorgt für die Motilität des Bakteriums im Zytosol, indem es die Polymerisation des F-Aktins an einem der Bakterienpole vermittelt (Revenu et al. 2004). An LIPI-1 angrenzend befinden sich zwei Orf-Gene, *orfX* und *orfZ*. Das Genprodukt OrfX hat keine Homologe in den Datenbanken der bakteriellen Proteine, dafür aber homologe Sequenzen zum viralen Glykoprotein gp160 aus *HIV1* (humanes Immundefizienz-Virus). OrfZ zeigt homologe Sequenzen zu einem Protein in *Escherichia coli* und zum Kapsidprotein VP5 (virales Protein) aus *Orbivirus*. Diese Sequenzähnlichkeiten lassen vermuten, dass die kleinen Orfs in LIPI-1 „Spuren“ der transduzierenden Bakteriophagen darstellen (Vazquez-Boland et al. 2001b).

1.4 Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*

Das Eubakterium *L. monocytogenes* muss die Membran einer eukaryontischen Zelle verändern können, um den LIPI-1 vermittelten, intrazellulären Infektionszyklus erfolgreich zu bewerkstelligen. Zwei Gruppen der aktiv sezernierten Proteine aus *L. monocytogenes* zeigen eine Wirkung auf die Zellmembran: 1) die beiden Phospholipasen, für die eine schwache hämolytische Wirkung beschrieben ist (Geoffroy et al. 1991) und 2) das Toxin LLO (Listeriolysin O), für das ein porenbildender Effekt an der eukaryontischen Zellmembran direkt mit Hilfe der elektrophysiologischen Patch-Clamp Technik gezeigt werden konnte (Repp et al. 2002).

Das Peptid Listeriolysin O wird von *L. monocytogenes* produziert und aktiv extrazellulär sezerniert. Es ist eines von 23 Mitgliedern aus der Familie der cholesterolabhängigen und thiolaktivierbaren Zytolysine (CDTXs, cholesterol-dependent toxins). Die Vertreter dieser Toxinfamilie werden von fünf Bakteriengattungen grampositiver Bakterien synthetisiert: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Arachnobacterium* (Palmer 2001). Sie alle weisen eine hämolytische Wirkung an eukaryontischen Membranen auf (Billington et al. 2000). Das LLO besteht aus 529 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58 kD (Mengaud et al. 1987; Alouf 1999; Jacobs et al. 1999) und ist ein essentieller und der wichtigste Virulenzfaktor von

L. monocytogenes (Cossart et al. 1989; Guzman et al. 1996). Neben der Modulation verschiedener zellulärer Signalkaskaden (Darji et al. 1995; Guzman et al. 1996; Nishibori et al. 1996; Tang et al. 1996; Krull et al. 1997; Coconnier et al. 1998; Kayal et al. 1999; Hornef et al. 2002; Rosenberger & Finlay 2003) vermittelt LLO hauptsächlich die Befreiung der *Listerien* aus der primären Vakuole nach erster Internalisierung bzw. aus dem Phagosom nach dem „Cell to Cell Spread". Die Porenbildung an der eukaryontischen Zellmembran spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes*, da die Fähigkeit zur Membranschädigung eine Voraussetzung für ihren erfolgreichen intrazellulären Lebenszyklus ist. Der genaue Mechanismus der Porenbildung ist nicht geklärt. Zwei Eigenschaften des LLO-Moleküls unterscheiden es von den übrigen CDTXs und unterstreichen seine Bedeutung im intrazellulären Infektionszyklus: Seine kurze Wirkungsdauer (Decatur & Portnoy 2000) und sein pH-Wirkungsmaximum im sauren Bereich von pH 5,5 (Geoffroy et al. 1987). Es ist gezeigt worden, dass *L. monocytogenes* enthaltende Phagosomen besonders schnell angesäuert werden (Beauregard et al. 1997), was die rasche Befreiung aus dem Phagosom zu erklären vermag. Die beiden Phospholipasen von *L. monocytogenes* unterstützen LLO bei der Zellmembranschädigung während der Lyse des Phagosoms im Zytosol (Sibelius et al. 1996; Goldfine & Wadsworth 2002).

Die spezifische Funktionsweise eines Proteins wird durch seine tertiäre und quartäre Struktur bedingt, die ihrerseits durch die primäre Proteinstruktur festgelegt sind (Alberts et al. 1995). Um bestimmte biochemische Eigenschaften eines Proteins in einem biologischen System verstehen zu können, muss die Funktion seiner einzelnen Aminosäuren bekannt sein. Die Rolle einzelner Aminosäuren in einem Protein kann durch ihre Substitutionen im kodierenden DNA-Bereich untersucht werden, indem man nach Unterschieden in der Wirkung des mutierten Proteins im Vergleich zu seinem Wildtyp sucht. Eine mutationsbedingte Veränderung der primären Proteinstruktur eines Proteins verursacht über die neu entstehende tertiäre bzw. quartäre Struktur eine Veränderung seiner Wirkung. Aus den herausgearbeiteten Unterschieden in der Wirkungsweise (hinzukommende bzw. verschwindende Effekte) kann auf die funktionelle Bedeutung der natürlich

vorkommenden Aminosäuren im Protein geschlossen werden. Diese Mutantenmethodik kann auch zur Untersuchung der LLO-induzierten Porenbildung angewendet werden. Zwei Hauptvoraussetzungen für solche Untersuchungen zur LLO-Porenkinetik sind erfüllt: (1) Mit der DNA-Technologie und der Molekularbiologie stehen verschiedene Mutanten der Eubakterienart *L. monocytogenes* mit punktuellen Aminosäuresubstitutionen im LLO-Gen zur experimentellen Verfügung; (2) es existiert eine elektrophysiologische Patch-Clamp Messmethode (Hamill et al. 1981), die eine sehr sensitive Registrierung von durch bakterielle Toxine induzierten Porenöffnungen und Porenschließungen in der Zellmembran erlaubt (Dreyer et al. 1990).

1.5 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren konnte unsere Arbeitsgruppe das gereinigte CDTX Listeriolysin O (LLO) bezüglich seiner porenbildenden Wirkung elektrophysiologisch weitgehend charakterisieren. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Aminosäuresubstitutionen im LLO-Gen von *L. monocytogenes*-Mutanten auf die porenbildende Aktivität mit Hilfe der Patch-Clamp Technik. Damit sollte ein Beitrag zum Verständnis der Bedeutung der einzelnen Aminosäuren im LLO-Molekül geleistet werden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine standardisierte Isolationsmethode für die Toxine aus Bakterienkulturen entwickelt werden, weil zum einen keine gereinigten Toxine von den zu untersuchenden Mutanten von *L. monocytogenes* zur Verfügung standen. Zum anderen standen vom gereinigten Wildtyp (WT) Toxin LLO für die zahlreichen geplanten Experimente nur jeweils geringen Toxinmengen von Chargen mit verschiedener biologischer Aktivität zur Verfügung, die - bezogen auf eine definierte LLO-Konzentration - im Erythrozytenhämolyse-Test bis zu einem Faktor von ca. 3 variierte (Daten von Prof. Dr. E. Domann, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen). So konnten durch die notwendige Verwendung *verschiedener* Chargen bei der großen Zahl an Patch-Clamp Experimenten keine optimal standardisierten Messbedingungen geschaffen werden. Dementsprechend

musste die gesuchte Isolationsmethode eine Herstellung von Chargen mit großen Überstandsmengen erlauben. Um eine konstante LLO-Konzentration im Überstand zu gewährleisten, mussten die gewonnenen Lösungen bakterienfrei sein, um eine weitere Freisetzung von LLO aus noch vorhandenen Bakterienzellen zu verhindern.

Die so gewonnenen bakterienfreien, toxinhaltigen Isolate aus Bakterienkulturen von *L. monocytogenes* WT und der verschiedenen Mutanten wurden hinsichtlich ihrer porenbildenden Aktivität elektrophysiologisch charakterisiert und miteinander verglichen. Basierend auf den Ergebnissen dieser vergleichenden Experimente über die Porenkinetiken der ausgewählten Mutanten sollte dann untersucht werden, ob die porenbildende Aktivität von LLO durch äußere Faktoren beeinflussbar ist. Dazu sollten verschiedene, auch arzneitherapeutisch eingesetzte pharmakologische Substanzen bezüglich ihrer Wirkung auf die Porenkinetik von LLO getestet werden.

2 Materialien und Methoden

2. Zellen

2.1.1 Zellkultur

HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells) wurden in einer 1:1-Mischung aus DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s Medium) und Ham´s F12 Medium kultiviert, wobei 10% FKS (fetales Kälberserum) und 2 mM Glutamin zugesetzt wurden. Alle Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO_2-Inkubator 6220, Heraeus Instruments, Hanau) bei 37°C und 95% Luftfeuchte in einer 94% Luft / 6% CO_2 Atmosphäre gezüchtet. Alle Kultivierungsarbeiten erfolgten unter aseptischen Verhältnissen an einer Werkbank (Lamin Air HB2448, Heraeus Instruments, Hanau).

Das Wechseln des Zellkulturmediums (10 ml) erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche, in Abhängigkeit davon, wann der Boden der Petrischalen (∅ 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS, phosphate buffered saline, in [mM]: 120 NaCl; 3,4 KCl; 10,1 NaH_2PO_4; 2,2 K_2PO_4; pH 7,4) gespült. Da die Zellen bodenadhärent sind, wurde der konfluente Zellrasen anschließend mit 5 ml Trypsin-haltiger PBS-Lösung behandelt (0,05% w/v, d.h. c_{PBS} = 50 mg/dl), bis die Zellen sich vom Petrischalenboden zu lösen begannen. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen durch kräftiges Abspülen mit dem Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtes Aufziehen in eine sterile 10 ml Glaspipette vereinzelt. Anschließend wurde 1 ml aus der entstandenen Zellsuspension in 9 ml vorgelegtes, neues Zellkulturmedium einpipettiert und durch kreuzweises Schwenken der Zellkulturschale gut verteilt.
Die Trypsinlösung wurde bei -20°C und die Nährlösung für die HEK-Zellen bei +4°C aufbewahrt. Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der Benutzung im Wasserbad bei 28°C langsam über 30 Minuten erwärmt.

2.1.2 Aufbereitung der Zellen für elektrophysiologische Messungen

Die HEK293-Zellen wurden 24-48 Stunden vor den elektrophysiologischen Experimenten in Petrischalen (∅ 35 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) in geringer Dichte ausplattiert.

Es wurde darauf geachtet, dass sich zum Zeitpunkt der Messung noch kein geschlossener Zellrasen gebildet hatte, um die Zellen in ihrer proliferativen Phase messen zu können. Artefakte durch bereits apoptotische Zellen sollten damit weitgehend vermieden werden. Die zur Messungen herangezogenen Zellen hatten ein leicht ovales, spindelförmiges Aussehen und besaßen keinen mikroskopisch sichtbaren Membrankontakt zu den Nachbarzellen. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass runde, aus dem Zellrasen nach oben hervorstehende, lichtdoppelbrechende Zellen nicht für die elektrophysiologischen Messungen genommen wurden.

2.2 Elektrophysiologische Messungen

2.2.1 Aufbau des Patch-Clamp Messstandes

Der schematische Aufbau der Messanordnung zur Durchführung der Patch-Clamp Experimente ist in der Abb. 3 skizziert.

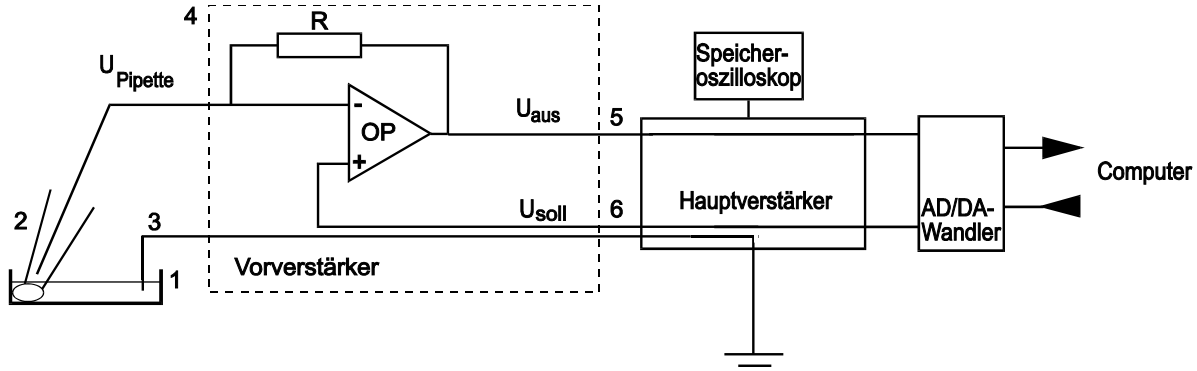

Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Messstandes. (1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patchpipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit des hohen Rückkopplungswiderstands R in einen Strom umgerechnet wird, (6) vom Computer vorgegebene Kommandospannung, die in das einzustellende Potential umgerechnet wird (Koschinski 2001).

Als Messkammer wurden Petrischalen (∅ 35 mm) verwendet, in denen die Zellen wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben vorbereitet wurden. Die Petrischalen konnten direkt in eine Halterung eingesetzt werden, die die Zellen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen) fixierte. Diese Halterung ermöglichte auch eine Messung und Regulation der Temperatur in der Badlösung während des Experiments (Temperature Control System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen. Zur Erklärung der Temperaturkontrolle während elektrophysiologischer Messungen siehe Abschnitt 2.2.5). In die Messkammer hinein ragten die Referenzelektrode und die Patchpipette aus Glas mit der dazugehörigen Ableitelektrode. Die Patchpipette war über den Pipettenhalter und einen Silikonschlauch mit einer 50 ml Kolbenspritze verbunden, die das Erzeugen des Über- und Unterdrucks in der Patchpipette ermöglichte. Mit Hilfe eines elektromechanisch getriebenen Mikromanipulators konnte die Patchpipette unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt werden. Über die beiden chlorierten Silberelektroden (Heraeus Instruments, Hanau) erfolgte die Messung der Ströme, die im Bereich von

10^{-15} bis 10^{-12} Ampere lagen. Die geringen Ströme wurden über den direkt mit den Elektroden verbundenen externen Vorverstärker aufgenommen und dabei in Spannungssignale umgesetzt. Der Vorverstärker weist einen hohen Eingangswiderstand im Bereich mehrerer 100 GΩ auf und ist in der Lage, solche geringen Ströme aufzunehmen und in Spannungssignale mit niedrigem Ausgangswiderstand umzuwandeln. Diese Strom-Spannungskonvertierung ist nötig, um die sehr kleinen Signale ohne große Beeinträchtigung durch die einstrahlende elektromagnetische Strahlung in der Umgebung zum räumlich getrennt stehenden Hauptgerät des Patch-Clamp Verstärkers L/M-EPC9 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) zu leiten. Nach der Endverstärkung durch den EPC-9 wurden die Signale mit einem Tiefpassfilter gefiltert, wobei die Cut-Off Frequenz jeweils ein Drittel der Digitalisierungsfrequenz betrug (f_{dig} = 100 Hz und f_{CutOff} = 33,3 Hz). Invertmikroskop, Messkammerhalterung und Mikromanipulator wurden innerhalb des Faradayschen Käfigs pneumatisch gedämpft gelagert.

Die Darstellung der aufgenommenen Signale erfolgte über den Analog/Digitalwandler des Interface-Gerätes ITC-16 (Instrutech Corporation, Elmont NY, USA) auf dem Bildschirm eines PCs. Der PC mit einem Programm zur Aufnahme der Patch-Clamp Daten (Pulse+PulseFit, v8.31, HEKA Electronic 1990-1999, Lambrecht) ermöglichte sowohl eine ununterbrochene Datenaufnahme bei einem vorgegebenen Membranpotential als auch die Aufnahme von Pulssequenzen mit verschiedenen Membranpotentialen. Hierbei fungierte der Computer als programmierbarer Pulsgeber, der vorbereitete, speicherbare und dementsprechend beliebig aufrufbare Befehlspulssequenzen zur Ausführung über den Digital/Analogwandler an den Patch-Clamp Verstärker EPC-9 sendete. Hier wurden die Befehlssequenzen in entsprechende Spannungs- bzw. Strompulse umgewandelt und über die Elektroden an die Zellmembran geleitet, wodurch sich die gewünschten Membranpotentiale erreichen ließen. Der Vorverstärker diente dabei je nach Messmodus (Current/Voltage-Clamp) als belastbare Strom- bzw. Spannungsquelle mit niedrigem Ausgangswiderstand.

Die Datenanalyse und -aufbereitung geschah mit Hilfe des gleichen Rechners und mit den Programmen Igor Pro (WaveMetrics, Inc., v. 3.1.5.0, Oregon, USA), Pulse+PulseFit (v. 8.31, HEKA Electronic, Lambrecht), Excel 95 (v. 7.0a, Microsoft,

USA) und GraphPad Prism (v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Die Herstellung der Abbildungen geschah mit den Programmen Picture Publisher (v. 8.0, Micrografx, Germany), PowerPoint 2000 (v. 9.0.2716, Microsoft, USA) und Gimp (v. 2.2, OpenSource).

2.2.2 Herstellung der Patchpipetten

Aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Filament innerhalb ihres Lumens (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Filament 0,2 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) wurden in einem mehrstufigen Prozess in einem Horizontal-Puller (P-97, Sutter Intruments Co., Novato, CA, USA) Mikropipetten (Patchpipetten) gezogen, wobei je nach Einstellung Spitzenform und Öffnungsdurchmesser sehr variabel gewählt werden konnten. Anschließend wurden die Spitzen der Patchpipetten mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (L/M-CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) unter mikroskopischer Sichtkontrolle feuerpoliert. Durch das Feuerpolieren wurden mögliche Oberflächenunebenheiten der Patchpipettenspitze eingeschmolzen und Verunreinigungen entfernt. Dies ermöglichte einen dichten Kontakt zwischen Patchpipettenspitze und Zellmembran und verringerte damit das Rauschen. In den Experimenten wurde besonders darauf geachtet, dass jede Patchpipette nur einmal die Phasengrenze Luft-Messkammerlösung passierte. Es wurden nur unmittelbar vor den Experimenten hergestellte und polierte Patchpipetten verwendet.

2.2.3 Whole-Cell Messkonfiguration der Patch-Clamp Technik

Es existieren verschiedene Messkonfigurationen der Patch-Clamp Technik mit ihren speziellen Vor- und Nachteilen. In dieser Arbeit wurde nur die Whole-Cell Messkonfiguration verwendet, deren Herstellung in der Abb. 4 gezeigt ist. Zunächst wurde eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette mittels eines Mikromanipulators an die Membran der in der Badkammer befindlichen Zelle positioniert. Ein mit einer 50 ml

Kolbenspritze auf die Pipettenlösung angelegter leichter Überdruck von ca. +80 cm H_2O-Säule verhinderte während dieses Vorgangs das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Patchpipette sowie Verunreinigungen der Patchpipettenspitze bei Durchtritt durch die Badlösungsoberfläche oder durch Partikel in der Badlösung (Abb. 4A). Zudem wurde dadurch die Zellmembran in der letzten Phase der Annäherung der Patchpipettenspitze an die Zelloberfläche leicht eingedellt. Der elektrische Widerstand der Patchpipette wurde dabei ständig durch einen Testimpuls von 10 mV und durch Messung des dadurch fließenden Stroms kontrolliert. Mit der Patchpipette frei in der Badlösung betrug der Elektrodenwiderstand zwischen 5 und 10 MΩ. Beim Wegnehmen des Überdrucks näherten sich Patchpipettenspitze und Zellmembran einander soweit, dass der Widerstand auf etwa 50-100 MΩ anstieg (Abb. 4B). Durch Erzeugen eines Unterdrucks mittels der Kolbenspritze von ca. -80 cm H_2O-Säule entstand dann ein so enger Kontakt zwischen Membran und der Glaswand der Patchpipettenspitze, dass der elektrische Widerstand auf 10-50 GΩ anstieg. Damit bildete sich der sog. Giga-Seal (Abb. 4C). Ausgehend von dieser Cell-Attached Messkonfiguration konnte man durch einen kurzen Spannungsimpuls (U= -950 mV, t= 100 µs) die Zellmembran unter der Patchpipettenöffnung durchbrechen und gelangte so zur Ganzzell-Ableitungsmesskonfiguration (Whole-Cell Messkonfiguration), bei der die Patchpipette leitend mit dem Zytoplasma verbunden war (Abb. 4D).

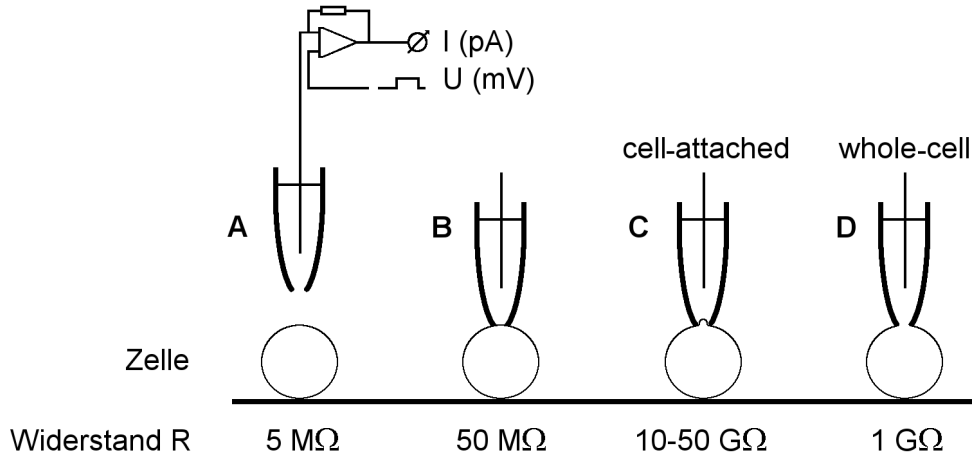

Abb. 4: Schematische Darstellung der Herstellung einer Whole-Cell Messkonfiguration in der Patch-Clamp Technik (verändert nach Dreyer et al. 1990). Erklärung siehe Text.

Auf diese Weise ließen sich die Ströme durch die gesamte Zellmembranoberfläche messen. Ein Vorteil dieser Messmethode ist, dass die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung der Zelle vorgegeben werden kann. Der Nachteil liegt darin, dass in der Whole-Cell Messkonfiguration durch den Austausch des Zytoplasmas gegen die Intrazellulärlösung (das Patchpipettenvolumen ist um den Faktor 10^{12} größer als das Zytoplasmavolumen) lösliche Bestandteile des Zytoplasmas verloren gehen können, die nicht an der Membran oder an anderen Strukturen des Zellinneren verankert sind, wie z. B. Signalkettenproteine (Dreyer et al. 1990).

2.2.4 Badperfusion

Um die Zellen unter Patch-Clamp Messbedingungen mit verschiedenen Lösungen umspülen oder Substanzen schnell applizieren und/oder wieder auswaschen zu können, wurde die in der Abb. 5 schematisch dargestellte Badperfusionsanlage verwendet.

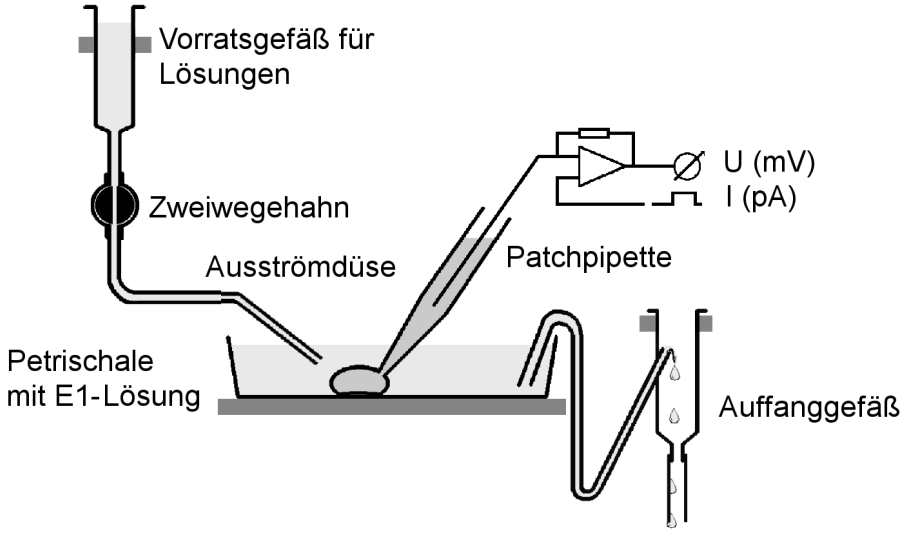

Abb. 5: Schematische Darstellung der Badperfusionsanlage (verändert nach Koschinski 2001).

Als Vorratsgefäß diente eine handelsübliche 25 ml Einwegspritze (Braun, Melsungen), die über einen Schlauch aus Polyethylen und aus Silikon (Innendurchmesser 0,5 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit einer Ausströmdüse

verbunden war. Aus der Ausströmdüse, welche aus einer abgeschliffenen Infusionsbraunüle hergestellt worden war, konnten die entsprechenden Lösungen aus dem Vorratsgefäß zur Zelle strömen. Die Ausströmdüse war über einen Adapter mit einem mechanischen Mikromanipulator verbunden und konnte so vor die zu messende Zelle platziert werden. Der Zulauf wurde über einen Zweiwegehahn aus handelsüblichen Infusionsbestecken geregelt. Die Extrazellulärlösung, die zu Beginn des Experiments die Zelle umgab, wurde während der Superfusion aus der Zellnähe verdrängt.

Die Durchflussmenge wurde durch die Höhe des Vorratsgefäßes über dem Flüssigkeitsspiegel der Badlösung eingestellt. Schon mit Durchflussgeschwindigkeiten von 100-250 µl Lösung/min und bei Platzierung der Ausströmdüse ca. 50-80 µm vor der Zelle war in Kontrollversuchen mit Farbstofflösung der Raum unmittelbar um die Zelle innerhalb von weniger als 10 s optisch mit Farbstoff gefüllt. Es war also davon auszugehen, dass die ursprüngliche Lösung innerhalb dieser Zeit von der neuen Lösung verdrängt wurde. Höhere Lösungswechselgeschwindigkeiten führten zu Membraninstabilitäten und zum Sealverlust und waren außerdem für die geplanten Experimente nicht erforderlich.

Alle verwendeten Lösungen wurden partikelfrei gefiltert und das Vorratsgefäß staubfrei gelagert, da mitgerissene, auf die Zelle auftreffende Partikel bei diesen Strömungsgeschwindigkeiten zu deutlichen Membranreaktionen geführt hätten.

2.2.5 Regulation der Badtemperatur während der elektrophysiologischen Messungen

Die normale Messtemperatur war 21°C. In dieser Arbeit wurde die LLO-induzierte Porenbildung auch bei Temperaturen im Bereich von 16°C bis 37°C untersucht. Die Erwärmung bzw. Kühlung der Badlösung erfolgte über Peltier-Elemente, die in der Petrischalenhalterung eingebaut waren. Die Temperatur der Extrazellulärlösung wurde über eine in die Badlösung eintauchende Messelektrode registriert. Der mit der Messelektrode verbundene Temperaturkontroller (Temperature Controller System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) stellte sicher, dass die Temperatur im

Experiment konstant gehalten werden konnte, indem die Peltier-Elemente in der Petrischalenhalterung erwärmt oder gekühlt wurden.

2.2.6 Intra- und Extrazellulärlösungen

Die für die Patch-Clamp Experimente verwendeten Ionenlösungen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet. Bei den Experimenten wurde die als Extrazellulärlösung bezeichnete Lösung an der physiologischen Zellmembranaußenseite und die als Intrazellulärlösung benannten Lösungen an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Extrazellulärlösung (in mM)						
	NaCl	**KCl**	**$MgCl_2$**	**$CaCl_2$**	**Glucose**	**HEPES**
E1	140	3	2	2	15	10

E1 = Extrazellulärlösung mit physiologischer Zusammensetzung (laborinterne Lösung Nr. 1).
Der E1-Puffer wurde mit 4 mM NaOH auf pH 7,35 eingestellt; dies erhöhte die Na^+-Konzentration auf 144 mM.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Intrazellulärlösungen (in mM)							
	$[Ca^{2+}]_{frei}$	**Kalium-glutamat**	**NaCl**	**$MgCl_2$**	**$CaCl_2$**	**BAPTA**	**HEPES**
IBL10	10 nM	140	20	2	4,0 µM	0,1	10
IBL100	100 nM	140	20	2	29,7 µM	0,1	10

IBL = physiologische Intrazellulärlösung mit BAPTA, low buffered. Die nachgestellten Zahlen in der Namensgebung geben die freie Ca^{2+}-Konzentration der Intrazellulärlösungen an. IBL10 und IBL100 sind in Bezug auf die Ca^{2+}-Konzentration schwach gepufferte Intrazellulärlösungen; sie wurden mit etwa 0,3 mM KOH auf pH 7,30 eingestellt.
HEPES = 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure ist ein Puffer, der im Bereich von 7,35 bis 7,75 optimal puffert. BAPTA = 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure.

Für die in Bezug auf $[Ca^{2+}]$ mit geringer Kapazität („schwach") gepufferte Intrazellulärlösung („low-buffer system") wurde zur Berechnung des einzuwiegenden $CaCl_2$ die Formel

$$[CaCl_2]_{Einwaage} = [Ca^{2+}]_{frei} + \frac{[Ca^{2+}]_{frei} \times [Chelator]_{Einwaage}}{K_D + [Ca^{2+}]_{frei}}$$

eingesetzt.

Hierbei ist $[Ca^{2+}]_{frei}$ die gewünschte freie Calciumkonzentration, $[CaCl_2]_{Einwaage}$ die zu verwendende Calciumkonzentration und $[Chelator]_{Einwaage}$ die zu verwendende BAPTA-Konzentration. Der K_D-Wert für BAPTA in der für Ca^{2+} schwach gepufferten Intrazellulärlösung wurde für den entsprechenden Puffer nach der von Marks und Maxfield vorgeschlagenen Methode berechnet (Marks & Maxfield 1991). Da die Dissoziationskonstante von BAPTA stark von der Ionenstärke und vom pH-Wert der verwendeten Lösung abhängt, muss sie für die verwendeten Lösungen bestimmt werden. Für die verwendeten Intrazellulärlösungen IBL100 und IBL10 ergab sich ein K_D-Wert für Ca^{2+}/BAPTA von 238 nM (Koschinski 2001).

Die benötigten Chemikalien wurden abgewogen und in deionisiertem und dann filtriertem Wasser aufgelöst. Zur Filtration des Wassers wurde eine Millipore-Anlage eingesetzt (MilliQ Gradient A10, Bedford, MA) und zur vollständigen Auflösung der Substanzen ein Magnetrührer (Heidolph MR 3001, Schwabach) verwendet. Die Messung des pH-Wertes der verschiedenen Lösungen und seine Einstellung erfolgte mit Hilfe eines pH-Meters (Calimatic 761, Berlin).

Die verwendeten HEK293-Zellen reagieren auf Osmolaritätsunterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärlösungen häufig mit einer Anschwellung oder mit der Bildung von Membranaussackungen. Um Membranstromaktivierungen durch Zellschwellung weitestgehend auszuschließen („Stretch-activated channels“, Ordway et al. 1995; Petrou et al. 1995), wurden die eingesetzten Lösungen mit einem Halbmikro-Osmometer (Osmomat 030, Cryoscopic Osmometer, Gonotec GmbH, Berlin) auf ihre Osmolarität hin geprüft. Gegebenenfalls wurden die Extrazellulärlösungen mit Sorbitol auf die höhere Osmolarität der intrazellulären Lösungen eingestellt (300-340 mosmol/kg). Kontrollexperimente zeigten, dass Sorbitol selbst die Messereignisse nicht beeinflusste.

Bei Verwendung unterschiedlicher Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen bilden sich durch deren unterschiedliche Beweglichkeiten an der Spitze der

Patchpipette im Sinne eines Donnan-Potentials ein sog. Liquid-Junction-Potential aus (Barry & Lynch 1991; Neher 1992). Wenn notwendig, wurden die Membranpotentiale um dieses Liquid-Junction-Potential (bei den verwendeten Lösungen Korrekturwert von -10 mV dazu gerechnet) korrigiert.

2.3 Bakterien

2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme erhielt unsere Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Domann (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen). Dabei handelt es sich um *L. monocytogenes* EGD-e Serovar 1/2a und die beiden *L. monocytogenes*-Mutanten *hly*C484S und *hly*W492A, bei denen der jeweilige Aminosäureaustausch im LLO-Gen liegt. In den Bezeichnungen der Mutanten wird der Einbuchstaben-Code benutzt, welcher seine Anwendung bei Abkürzungen von langen Aminosäuresequenzen findet. Bei der DNA-Mutante *L. monocytogenes hly*C484S ist das einzige im LLO-Toxinmolekül vorhandene Cystein (C) an der Stelle 484 gegen ein Serin (S) ausgetauscht. Cystein und Serin sind beide polare und ungeladene Aminosäuren. Sie nehmen daher eine Zwischenstellung zwischen unpolaren aliphatischen und aromatischen Aminosäuren (hydrophob) sowie den Aminosäuren mit geladenen Seitenketten (hydrophil) ein. Cystein enthält endständig ein Schwefelatom, welches u. a. an Redoxreaktionen mitbeteiligt ist. Serin enthält endständig eine Hydroxylgruppe (OH). Die funktionelle Sulfhydrylgruppe (SH) des Cysteins ist stärker nucleophil als die OH-Gruppe des Serins.

Bei der DNA-Mutante *L. monocytogenes hly*W492A ist das Tryptophan (W) an der Stelle 492 gegen ein Alanin (A) ausgetauscht. Tryptophan enthält eine lange aromatische Seitenkette, welche dem Molekülabschnitt starke hydrophobe Eigenschaften verleiht. Alanin enthält dagegen als Seitenkette den minimalen hydrophoben Methylrest (CH_3), seine Seitenkette ist damit stärker hydrophil als die Seitenkette des Tryptophans.

Die *Listerien* wurden bei +4°C im Kühlschrank auf BHI-Agarplatten (∅ 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) aufbewahrt und aufgrund ihres Wachstums und konsekutiver Kontaktinhibition alle zwei bis drei Monate fraktioniert ausgestrichen.

2.3.2 Photometrische Messungen

Die Extinktionsmessungen zur quantitativen Beurteilung der Opazität der Bakteriensuspensionen dienten der Bestimmung der Bakterienkonzentration und erfolgten bei 650 nm am Spektralphotometer Biochrom 4000 UV-Visible Spectrophotometer (Firma Pharmacia LKB, Freiburg). Um das Lambert-Beer Gesetz anwenden zu können, musste die zu untersuchende Bakteriensuspension vor der photometrischen Messung verdünnt werden. Das gewählte Verhältnis war 100 µl Bakteriensuspension zu 900 µl E1-Lösung. Um den reflektierten Anteil des monochromatischen Lichts während der Bestimmung zu eliminieren, erfolgten die Extinktionsmessungen nach Durchtritt des Lichts durch eine Küvette mit der bakterienlosen E1-Lösung. Der angezeigte Wert wurde mit 10 multipliziert, um die Extinktion in 1 ml der Bakteriensuspension angeben zu können. So beziehen sich alle weiter unten angegebenen Werte der photometrischen Messungen auf 1 ml Volumen der Bakteriensuspension.

2.4 Liste der verwendeten Substanzen

BHI (brain heart infusion) ist ein Vollmedium zur Anzüchtung verschiedener Mikroorganismen. Das BHI-Pulver ist zusammengesetzt aus getrockneter Gehirnmasse und Herzen von Schweinen. Das Pulver wird aus großen Volumina des Rohmaterials hergestellt, wobei alle nahrhaften und wachstumsstimulierenden Eigenschaften des frischen Gewebes, Stickstoff, Aminosäuren und Vitamine erhalten bleiben. Dieses Anzüchtungsmedium wurde von Prof. Dr. T. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) bezogen. Das BHI-Medium wurde im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Der pH-Wert lag bei 7,4 $\pm$ 0,2. Für die Arbeiten wurde nur BHI-Medium benutzt, das nicht älter als 30 Tage war.

Captopril ($C_9H_{15}NO_3S$) ist ein kompetitiver Hemmstoff des Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) mit einem Molekulargewicht von 217,29. Es wurde in den 1970er Jahren synthetisiert, wobei eine Carboxypeptidase aus dem Rinderpankreas als ein zum humanen ACE analoges Enzym anfänglich für die Forschung diente. Captopril

besteht aus einem Prolin, an welches über die Kohlenstoffkette -CO-$CHCH_3$-CH_2- eine SH-Gruppe kovalent gebunden ist. Experimentell konnte demonstriert werden, dass diese Thiolgruppe eine hohe Affinität zu Zn^{2+}-Ionen des ACE aufweist und dadurch die sehr hohe inhibitorische Potenz des Captoprils bedingt (Lima 1999). Als Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet (s. u.).

Dithiothreitol (DTT) wird auch Cleland's Reagenz genannt und hat ein Molekulargewicht von 154,25. DTT (HS-$CH_2(CHOH)_2CH_2$-SH) weist ein niedriges Redoxpotential von -0,33 V bei pH 7,0 auf und hält daher alle in der Lösung befindlichen Monothiole in reduzierter Form (Cleland 1964). Die Reduktion der Doppelbrücken findet in zwei Reaktionsschritten statt. Im ersten Schritt wird die Doppelbrücke gespalten und einer der beiden Reaktionspartner (**R**) an das DTT über seinen Thiolrest gebunden: **R**-**SS**-**R** + HS-DTT-SH ↔ **R**-**S**H + **R**-**S**S-DTT-SH. Im zweiten Schritt bilden die beiden endständigen Thiolgruppen des DTT aufgrund des niedrigen Redoxpotentials untereinander eine Doppelbindung aus, das DTT geht somit in die Ringstruktur über und setzt den zweiten Reaktionspartner in reduzierter Form frei: **R-S**S-DTT-SH → **R**-**S**H + -S-DTT-S- (Ringstruktur, beide Thiole sind miteinander über eine Doppelbindung kovalent verbunden). DTT ist sehr gut wasserlöslich. Bis zu 50 mg/ml ergeben eine klare Lösung. Die Substanz hat geringe Tendenz zur Oxidation in der Luft (Cleland 1964). Eine breite Anwendung findet DTT in der SDS-PAGE Elektrophorese. Da die Halbwertszeit einer DTT-Lösung bei pH 7,5 und 20°C ca. 10 Stunden beträgt, wurden für die Experimente täglich neu hergestellte Lösungen verwendet.

Dimethylsulfoxid (DMSO) C_2H_6SO mit einem Molekulargewicht von 78,13 ist ein hervorragend geeignetes, nicht-wässriges Lösungsmittel für sehr lipophile Substanzen.

Eosin Yellow $C_{20}H_6Br_4O_5Na_2$ mit einem Molekulargewicht von 691,9 ist ein von Fluorescein abgeleiteter saurer, roter Xanthenfarbstoff. Es wird zur Färbung eosinophiler Zellbestandteile wie Zytoplasma oder eosinophiler Granula benutzt.

Biochemisch besitzt Eosin eine blockierende Wirkung auf membranständige ATPasen (Slinchenko et al. 1998, 2003; Chernysh 1999; Chernysh & Slinchenko 1999) sowie biphasische Effekte auf CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) Cl^--Kanäle (Cai & Sheppard 2002).

Albumin macht ungefähr 2/3 der Proteine im tierischen Serum aus. Aufgrund seiner negativen Eigenladung bindet es verschiedene Substanzen und weist für sie eine Transportfunktion im Blutkreislauf auf. BSA (bovine serum albumin) enthält freie Fettsäuren. Watanabe & Sato (1996) konnten zeigen, dass die freien Fettsäuren im Serum die Bindungskapazität des Albumins durch eine Absättigung der Bindungsstellen verringern können. Koschinski (2001) konnte demonstrieren, dass die freien Fettsäuren Ca^{2+}-abhängige, spannungsunabhängige K^+-Kanäle (hSK4, humaner Kaliumkanal kleiner Leitfähigkeit) in NIH3T3 Mäusefibroblasten aktivieren können. Um mögliche Artefakte durch solche Effekte zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit **FAFBSA** (fatty acid free bovine serum albumin) verwendet. Aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass eine FAFBSA-Konzentration bis zu 0,5% w/v keine Messartefakte in Patch-Clamp Experimenten bewirkt. Bei den elektrophysiologischen Experimenten in dieser Arbeit betrug die maximal eingesetzte FAFBSA-Konzentration lediglich 0,025% w/v.

Lanthan ist ein chemisches Element aus der Gruppe der Lanthanoide, auch als seltene Erdmetalle bezeichnete Elemente (von $_{57}La^{3+}$ bis $_{71}Lu^{3+}$). In biologischen Systemen besitzt Lanthan antibakterielle, immunregulatorische und modulatorische Eigenschaften auf verschiedene Ionenkanäle und Transmittertransporter der Zellmembran (Carafoli 1991; Ma & Narahashi 1993; Narahashi et al. 1994; Bryan-Lluka & Bonisch 1997; Ferreira et al. 1998; Huettner et al. 1998; Beedle et al. 2002; Rangel-Gonzalez et al. 2002; Dramsi & Cossart 2003). Klinisch wird Lanthancarbonat (Fosrenol®) als Phosphatbinder bei Dialysepatienten eingesetzt.

Listeriolysin O (LLO) wurde als gereinigtes Hämolysin aus *L. monocytogenes* gewonnen. Die Toxinchargen wurden unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Domann

und Prof. Dr. T. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Protamin ist ein basisches, polykationisches Peptid (pI>10). Das Protein ist unter Vertebraten weit verbreitet. Es gehört zu der SNB Protein-Familie (sperm nuclear basic protein) und besitzt ein Molekulargewicht von durchschnittlich 4500 Dalton (Lewis et al. 2003). Protamin besitzt einen hohen Anteil an Arginin und Cysteinresten (das in dieser Arbeit verwendete Lachsprotamin verfügt über 6 bis 9 Cysteinreste pro Protaminmolekül) und weist eine antimikrobielle Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum an Bakterien und Pilzen auf (Hirsch 1958; Islam et al. 1984; Uyttendaele & Debevere 1994; Johansen et al. 1995; Hansen et al. 2001). Die Substanz besitzt eine hemmende Wirkung auf das Listerienwachstum (Lopez-Solanilla et al. 2003). Protamin ist Bestandteil von NPH(=neutrales Protamin-Hagedorn)-Verzögerungsinsulin und dient als Antidot bei Überdosierungen mit unfraktioniertem Heparin.

Falls nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung der verwendeten Lösungen die Extrazellulärlösung E1 (Tab. 2) als Lösungsmittel verwendet. Die aufgeführten Substanzen (außer BHI-Medium und Listeriolysin O) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des PC-Programms Graph Pad Prism, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgte die Angabe von Mittelwerten $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Die statistischen Vergleiche wurden mit Student's *t*-Test ($p<0,05$) und ANOVA ($p<0,05$) mit nachfolgendem Bonferroni-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen

Zunächst wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der HEK293-Zellen charakterisiert. HEK293-Zellen hatten in der Whole-Cell Messkonfiguration im Current-Clamp Modus ein Ruhemembranpotential von -51,1 mV ± 3,0 mV (n=48). In der Abb. 6A sind die Membranströme einer HEK293-Zelle bei verschiedenen Membranpotentialen im Bereich von -120 mV bis +80 mV in der Voltage-Clamp Messkonfiguration dargestellt. In der Abb. 6B ist die dazugehörige Strom-Spannungsbeziehung gezeigt. Deutlich zeigte sich ab einem Membranpotential von -20 mV die Aktivierung eines spannungsabhängigen, verzögert aktivierenden Kaliumstroms. Dieser Kaliumstrom war auch vorhanden, wenn nominell Ca^{2+}-freie Intrazellulärlösung benutzt wurde. Es handelt sich also um einen Ca^{2+}-unabhängigen Kaliumauswärtsstrom (sog. delayed outward rectifier). In HEK293-Zellen wurde bei Membranpotentialen negativer als -20 mV dieser Kaliumkanaltyp nicht aktiviert. In der Literatur wird für HEK293-Zellen außerdem ein transienter Calciumstrom beschrieben, der bei Membranpotentialen positiver als -40 mV durch Depolarisation aktiviert wird (Berjukow et al. 1996). Unter unseren Messbedingungen konnte dieser Calciumstrom jedoch nicht registriert werden. HEK293-Zellen zeigten sich somit für Untersuchungen mit porenbildenden Toxinen als besonders geeignet, da die Porenbildung bei Haltepotentialen negativer als -40 mV ungestört von endogenen Ionenkanälen registriert werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Experimente bei einem Haltepotential von -50 mV durchgeführt. Bei diesem Haltepotential hatte der unspezifische Membranstrom nur eine Amplitude von -3,3 pA ± 1,6 pA (n =48).

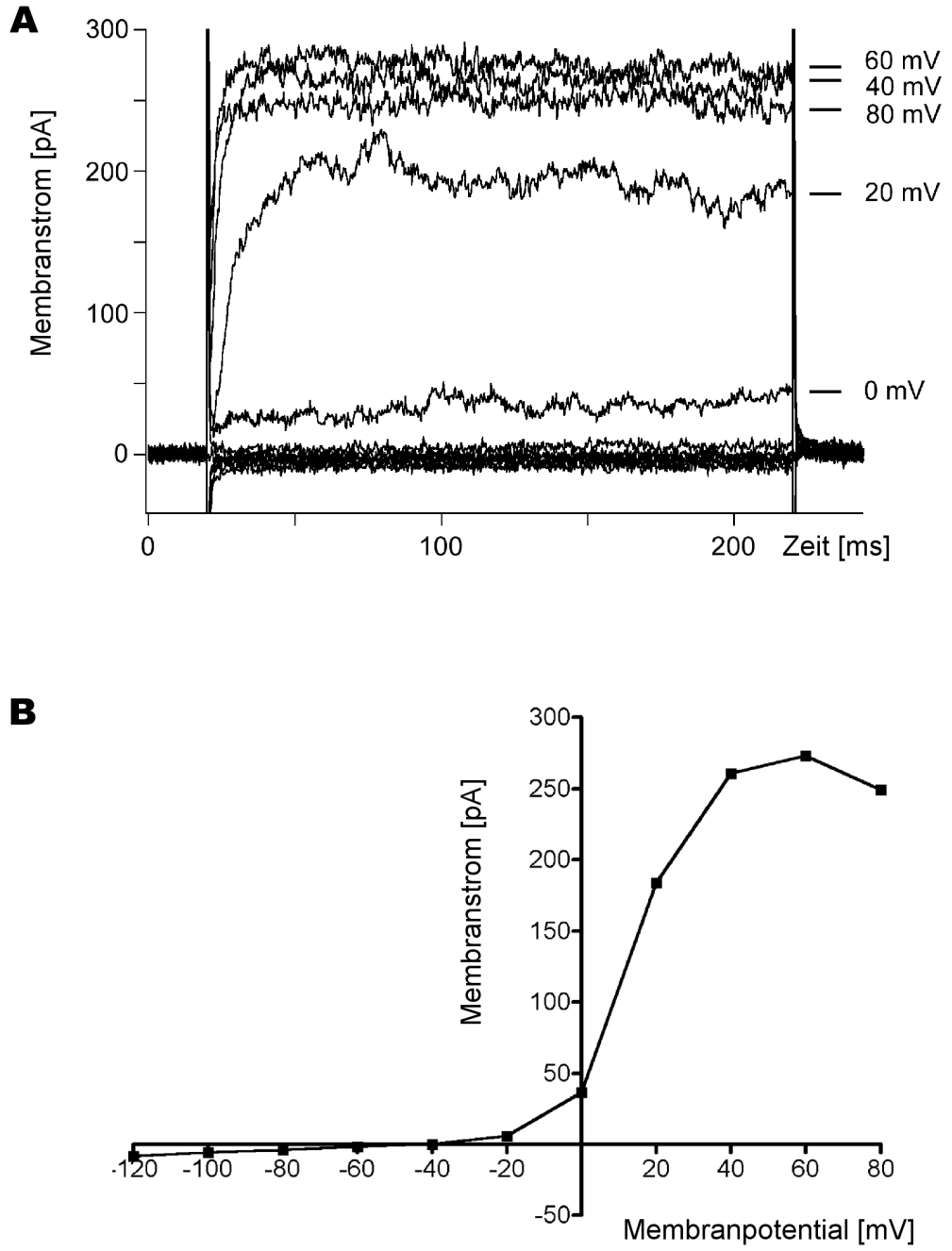

Abb. 6: Membranströme einer HEK293-Zelle in der Whole-Cell Konfiguration. **(A)** Membranströme bei verschiedenen Membranpotentialen. Das Membranpotential wurde in 20 mV-Schritten von -120 mV bis auf +80 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 200 ms angelegt waren, wurde für jeweils 100 ms auf das Haltepotential von -50 mV zurückgeschaltet. Die Stromamplituden wurden am Ende der Spannungspulse im Zeitintervall 140-190 ms gemessen und ergaben die in **(B)** dargestellte Strom-Spannungskurve. Temperatur 21°C.

3.2 Gewinnung der Listeriolysin-haltigen, bakterienfreien Überstände aus *Listeria monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen

3.2.1 Protokoll zur Gewinnung eines bakterienfreien Überstands

Der **erste Schritt** des Protokolls zur Gewinnung eines LLO-haltigen, bakterienfreien Überstands war die Herstellung einer großen Anzahl an toxinproduzierenden Bakterien. Dazu wurden die Bakterien in einem für sie nahrungsreichen BHI-Medium meist über Nacht inkubiert, was die laborinterne Namensgebung „Übernachtkultur" dieses Schritts erklärt. Unter einer aseptischen Werkbank wurden in einen 100 ml Erlenmeyer Kolben 20 ml BHI-Medium hineinpipettiert. Zu diesem Medium wurden eine bis drei einzelne Bakterienkolonien hinzugegeben, die mit einer sterilen, vor der Anwendung abgeflammten Öse vom Nährboden der Züchtungsschale aufgenommen wurden. Anschließend wurde der Kolben mit der noch klaren gelben Lösung in einen Schüttelinkubator (Aerotron, Infors AG, CH-Bottmingen) gestellt, wo er über eine Nacht (mindestens 10 h lang) bei 37°C und 180 rpm belassen wurde. Für diese Zeit wurde der Erlenmeyer Kolben mit einem Stopfen aus gepresster Watte verschlossen, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* bei 37°C im BHI-Medium vermehrt Virulenzfaktoren freisetzt (Leimeister-Wachter 1992; Jaradat & Bhunia 2002). Die Dauer der „Übernachtkultur" von mindestens 10 Stunden begründet sich aus dem kontinuierlichen Anstieg der optischen Dichte der Suspension, der nach ca. 10 h sistierte und damit das Ende der Bakterienvermehrung signalisierte.

Der **zweite Schritt** diente zum Überführen der Bakterien in einen stoffwechselaktiven Zustand (daher der Name „Aktivierungskultur"), nachdem die logarithmische Phase ihrer Vermehrung beendet war. Dafür wurden zur entstandenen „Übernachtkultur" (mittlerweile eine sehr trübe, weiß-gelbliche Suspension) 5 ml BHI-Medium, das eine Temperatur von 37°C hatte, hinzugegeben. Danach wurde der Erlenmeyer Kolben für weitere 2 Stunden bei 37°C und 180 rpm wieder in den Schüttelinkubator (Aerotron, Infors AG, CH-Bottmingen) gestellt.

Der **dritte Schritt** diente zum Versetzen der Bakterien in die Phase der Toxinfreisetzung. Die im zweiten Protokollschritt hergestellte Bakteriensuspension

wurde nach dem Umfüllen in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen (Renner GmbH, Dannstadt) bei 4800 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert (Hermle-Zentrifuge Z380, Eppendorf). Der klare Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Pellet in 5 ml E1-Lösung mit 0,5% w/v fettsäurefreiem Rinderserumalbumin (FAFBSA) resuspendiert. Dieser Austausch der Medien ist notwendig, weil das BHI-Medium eigene proteolytische Aktivität besitzt und sich somit für spätere Experimente nicht eignet. Von dieser neuen Bakteriensuspension wurden 100 µl zur Messung der optischen Dichte entnommen, um die Bakterienkonzentration zu bestimmen. In elektrophysiologischen Experimenten konnte gezeigt werde, dass die optische Dichte den Wert 10 ml^{-1} erreicht haben musste, um später LLO-induzierte Porenströme registrieren zu können. Wenn der gemessene Opazitätswert unter 10 ml^{-1} lag, wurde die Gewinnung der Überstände abgebrochen und mit Einsatz eines frisch hergestellten BHI-Nährmediums erneut begonnen. Erreichte die gemessene optische Dichte den Wert 10 ml^{-1}, wurden die verbleibenden 4,9 ml der Bakteriensuspension für weitere 30 Minuten in den Schüttelinkubator bei 37°C gestellt. Während dieser Zeit setzten die *Listerien* eine Reihe von Substanzen, unter anderem auch LLO in die E1-Lösung frei, was die Namensgebung „Reizungsphase“ begründet. In mehreren Patch-Clamp Experimenten stellte sich heraus, dass diese Zeit von 30 Minuten bereits ausreichte, um eine optimale Konzentration an LLO in den Überständen zu erhalten.

Im **vierten Schritt** wurde am Ende der „Reizungsphase“ die entstandene Suspension zentrifugiert. Dazu wurden viermal je 1 ml der Bakteriensuspension jeweils in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß aliquotiert. Anschließend wurden diese vier Proben in einer Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech, Osterode) bei 17860 g über 5 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer Pipette aus den vier Eppendorfgefäßen aufgenommen und in eine 10 ml Plastikspritze überführt, auf die dann anschließend ein Renner Einweg-Filterhalter mit Celluloseacetatfiltern (Renner GmbH, Dannstadt) positioniert wurde. Diese Filter weisen eine Porengröße von 0,2 µm auf und sind damit für Bakterienzellen undurchlässig. Mit Hilfe des Filterhalters wurde der noch bakterienhaltige Überstand zu einer sterilen, toxinhaltigen Lösung filtriert. Der filtrierte Überstand wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäßen mit je 105 µl aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. Der pH-Wert der Isolate betrug

5,0-5,5. Die Sterilität der Toxinisolate konnte mittels Wachstumstests demonstriert werden.

Aus dem dargestellten Protokoll konnten bis zu 36 Proben für Patch-Clamp Experimente hergestellt werden, die jeweils die gleiche Konzentration an LLO enthielten. Wenn mehr Proben benötigt wurden, dann wurde das BHI-Volumen der „Aktivierungskultur“ (zweiter Isolationsschritt) von ursprünglichen 5 ml auf 20 ml vergrößert und die Dauer dieses Isolationsschritts von 2 auf 3 Stunden verlängert. Durch diese Veränderungen stieg die optische Dichte der Bakteriensuspension unmittelbar vor der „Reizungsphase“ auf Extinktionswerte von 20-21 ml^{-1}. Der doppelte Wert der optischen Dichte erlaubte wiederum das Einsetzen der doppelten Menge von E1-Lösung mit 0,5% w/v FAFBSA zur Resuspension des Pellets beim Mediumaustausch (10 ml anstatt von 5 ml). Auf diese Weise wurde das endgültige Überstandvolumen während der „Reizungsphase“ auf das Doppelte vergrößert, wobei dann der Extinktionswert der Lösung auf den geforderten Wert von 10 ml^{-1} zurück fiel. Es ergaben sich somit 72 identische Proben mit je 105 µl sterilem LLO-haltigen Überstand.

3.2.2 Funktion von fettsäurefreiem Rinderserumalbumin im Isolationsprotokoll

Wie im Abschnitt 3.2.1 dargestellt, wurde am Anfang der „Reizungsphase“ (dritter Isolationsschritt) das Kulturmedium BHI gegen E1-Lösung ausgetauscht, die 0,5% w/v FAFBSA enthielt. Das FAFBSA wurde eingeführt, damit die von den *Listerien* freigesetzten Toxinproteine in dem gewonnenen Überstand nicht durch unspezifische Bindungen verloren gehen. Für Proteine ist es allgemein bekannt, dass man bei Konzentrationen unter 1 µg/ml mit Verlusten ihrer Wirkung durch unspezifische Bindungen zu rechnen hat. Um diesen Verlust bei der Herstellung von bakterienfreien, LLO-haltigen Überständen zu demonstrieren, wurden folgende Experimente durchgeführt.
Bei der Isolation wurde der Überstand zum einen mit und zum anderen ohne der Zugabe des FAFBSA hergestellt. Dazu wurde das Pellet aus der abzentrifugierten

„Übernachtkultur“ mit 5 ml E1-Lösung resuspendiert. Zu der einen Hälfte (die ersten 2,5 ml) wurden 131,6 µl E1-Lösung mit 10% w/v FAFBSA hinzugegeben (dies entsprach 0,5% w/v Endkonzentration des FAFBSA), zu der verbleibenden Hälfte das gleiche Volumen an E1-Lösung ohne FAFBSA. Danach wurde die Isolation nach dem üblichen Protokoll zu Ende geführt (siehe Abschnitt 3.2.1).

In Patch-Clamp Experimenten (siehe als Beispiel Abb. 8) wurden die beiden hergestellten Überstände in verschiedenen Verdünnungen auf die HEK293-Zellen appliziert. Registriert wurde die Zeit bis zum Auftreten der ersten LLO-Pore (Latenzzeit) nach Zugabe des Überstands zur Badlösung. Die Abb. 7 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.

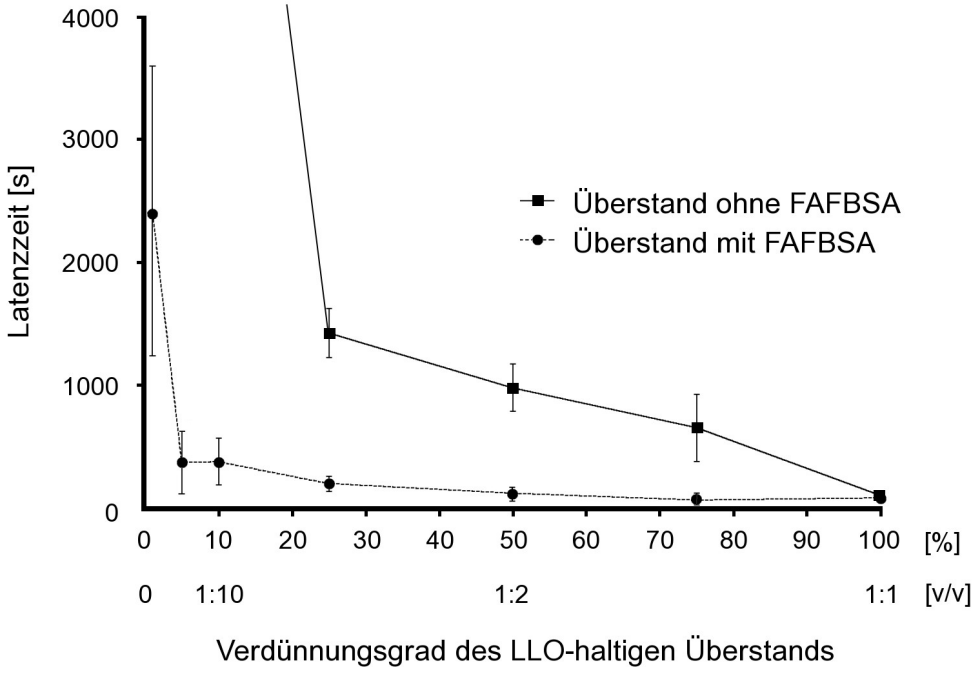

Abb. 7: Porenbildende Wirkung der Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen mit oder ohne FAFBSA in der Lösung im Patch-Clamp Experiment. Latenzzeit (*Ordinate*): Zeit von der Applikation der Überstände bis zur Registrierung der ersten LLO-induzierten Pore. Verdünnungsgrad des applizierten Überstands in v/v (Volumen des Überstands zum Gesamtvolumen der applizierten Lösung) und in % (*Abszisse*), wobei der unverdünnte Überstand den 100% entspricht. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV. Pro Datenpunkt n=3.

In Anwesenheit von FAFBSA ist die porenbildende Wirkung des LLO im Überstand sehr viel potenter, da der Verlust an LLO-Molekülen durch unspezifische

Proteinbindungen an allen in Kontakt kommenden Oberflächen geringer ist. Sogar bei einer Verdünnung des Überstands auf 5% der ursprünglichen Konzentration (v/v-Verhältnis Überstand zu Lösungsmittel wie 1:20) konnte eine Porenbildung elektrophysiologisch noch gemessen werden, während bei Überständen ohne FAFBSA bereits bei Verdünnungen unter 25% (v/v-Verhältnis Überstand zu Lösungsmittel wie 1:4) keine Porenbildung mehr registriert werden konnte.

3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der Listeriolysin-induzierten Poren

3.3.1 Poren durch Listeriolysin aus *Listeria monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen

Abbildung 8 zeigt an einer HEK293-Zelle die elektrophysiologische Registrierung eines typischen, porenbildenden Effekts, der durch die mit FAFBSA hergestellten Überstände von *L. monocytogenes* Wildtyp hervorgerufen wird.

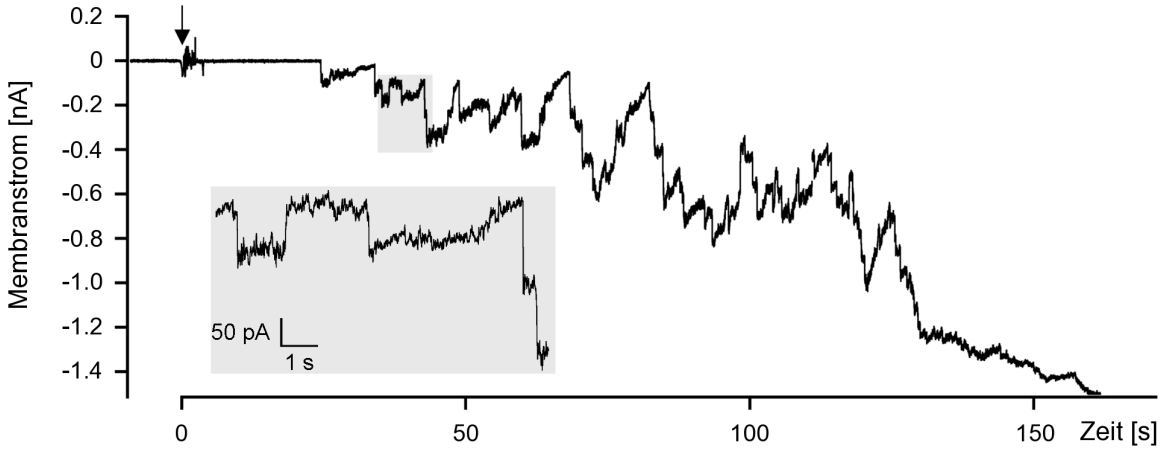

Abb. 8: Typische elektrophysiologische Ableitung der Porenöffnungen und -schliessungen an einer HEK293-Zelle nach Applikation (Pfeil) eines 75% toxinhaltigen Überstands aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen. Das Inset entspricht in höherer Zeit- und Membranstromauflösung dem grau hinterlegten Kästchen der Originalregistrierung. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Nach einer Latenzzeit von etwa 25 s (bei einer gewählten Verdünnung des Überstands von 75%) kommt es zu einer abrupten, negativen Zunahme des Membranstroms. Im Gegensatz zu der stets abrupten Porenöffnung können bei der Porenschliessung zwei Formen beobachtet werden (Abb. 8, Inset), zum einen ein abrupter Porenschluss (in ca. 50% der Fälle) und zum anderen ein langsamer Porenschluss (in den restlichen 50% der Fälle). Um eine Aussage über die Amplituden der Porenströme zu erhalten, wurde jeweils nur die Zunahme des Membranstroms bei den Porenöffnungen gemessen. Abbildung 9 zeigt in Form eines Histogramms die Porenstromamplitudenverteilung von 454 Porenöffnungen aus über 50 Experimenten, die bei Verwendung unverdünnter Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen bis zu einem Gesamtmembranstrom von -1 nA gemessen wurden. Die

gemessenen Stromamplituden zeigen eine große Variationsbreite zwischen 10 pA und 230 pA. Aufgrund der höheren Toxinkonzentrationen bei den verwendeten Überständen findet sich jedoch ein erstes Maximum bei 47 pA. Dies entspricht bei einem Membranpotential von -50 mV einer Leitfähigkeit von 940 pS. Weitere Maxima finden sich bei 80 pA, 108 pA, 136 pA, 170 pA und 234 pA. Diese sind in etwa ganzzahlig Vielfache des Maximums von 20 pA, das in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gefunden und beschreiben wurde (Repp et al. 2002; Butler 2005).

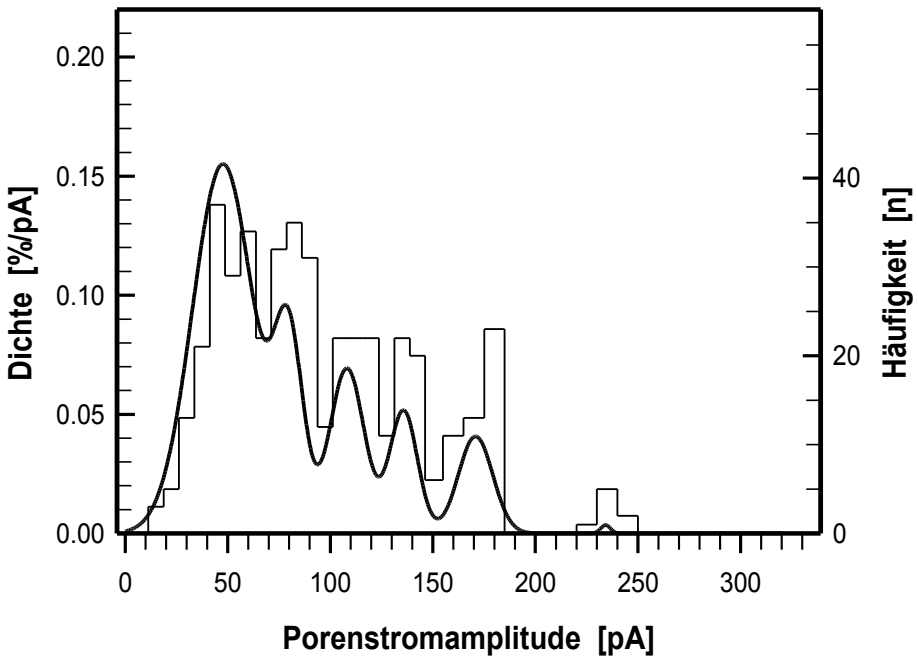

Abb. 9: Amplitudenhistogramm der Porenströme (n=454) nach Applikation unverdünnter Überstände aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen. Die Abszisse zeigt die Porenstromamplituden, die rechte Ordinate deren absolute Häufigkeit bei einer Klassenbreite von 10 pA. Die linke Ordinate zeigt die Dichte der angepassten Normalverteilungen. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Die Strom-Spannungskurven der Porenströme hatten Umkehrpotentiale von –1 mV ±6 mV (n=23). Dies deutet auf eine nicht-selektive Permeabilität der LLO-induzierten Poren für zumindest monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ hin.

Der poreninduzierende Effekt des in unverdünnten Überständen aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen enthaltenen LLO wurde in Patch-Clamp mit gereinigtem LLO verglichen. Dabei zeigte sich, dass die nach dem beschriebenen Protokoll hergestellten Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen einer Listeriolysinkonzentration im Bereich von 10-100 ng/ml entsprachen.

3.3.2 Temperaturabhängigkeit der Bildung von Listeriolysin Wildtyp-induzierten Poren

Die elektrophysiologischen Messungen wurden normalerweise bei einer Temperatur von 21°C durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Temperaturabhängigkeit der LLO-induzierten Porenbildung gemessen. Dazu wurden bei verschiedenen Temperaturen der Zellbadlösung die Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen in stets gleicher Konzentration (5% Verdünnung, v/v-Verhältnis Überstand zu Lösungsmittel wie 1:20) in die Badlösung zu den HEK293-Zellen appliziert. Es wurde bewusst ein sehr hoher Verdünnungsgrad von 5% gewählt, um eine bei höherer Temperatur zu erwartende Erhöhung der poreninduzierenden LLO-Wirkung messen zu können. Registriert wurde die Latenzzeit von der Überstandsapplikation bis zur Registrierung der ersten Porenöffnung. Abbildung 10 zeigt, dass die porenbildende Potenz von LLO mit steigender Temperatur zunimmt.

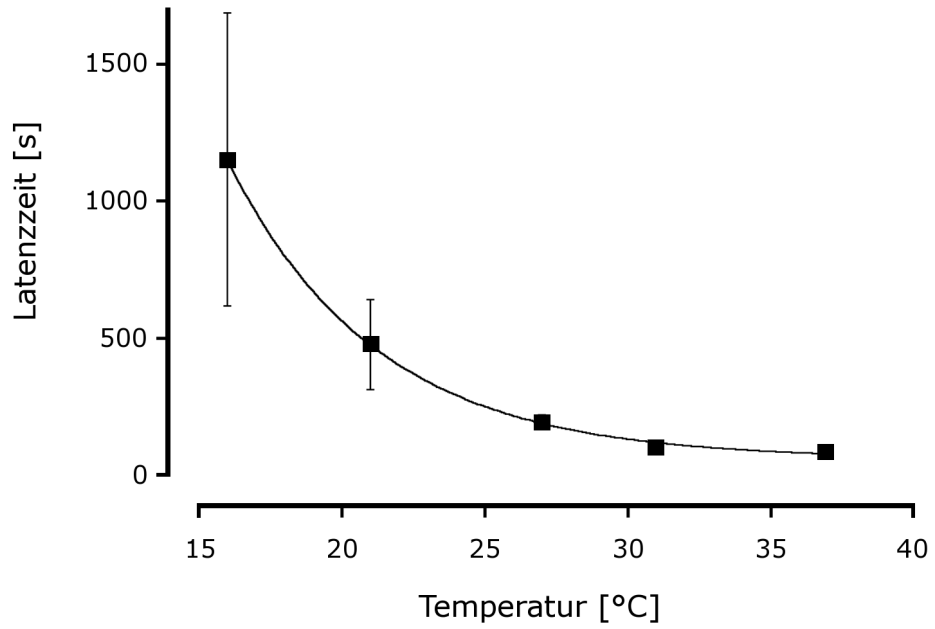

Abb. 10: Poreninduzierende LLO-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. *Ordinate*: Zeit von der Applikation des 5%toxinhaltigen Überstands aus *L. monocytogenes* WT-Kulturen zu den HEK293-Zellen bis zur Registrierung der ersten LLO-induzierten Porenöffnung (Latenzzeit). *Abszisse*: Temperatur der Badlösung. Membranpotential -50 mV. Pro Datenpunkt n=5.

Die poreninduzierende LLO-Aktivität ist bei 37°C signifikant höher als bei der Standardmesstemperatur von 21°C (mind. um den Faktor 3, $p < 0,05$). Die minimale

Latenzzeit beträgt 97 s und ist offensichtlich begrenzt durch die Diffusionszeit der LLO-Moleküle an die Zellmembranoberfläche nach Applikation des Überstands. Die Temperaturabhängigkeit lässt sich annähernd mit einer exponentiellen Kurve beschreiben, wobei der Q_{10}-Wert zwischen 3-4 liegt.

3.3.3 Überstand der *Listeria monocytogenes*-Mutante *hly*C484S

In dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob mutiertes LLO *hly*C484S, gewonnen nach dem im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Isolationsprotokoll, eine zum Wildtyp-LLO unterschiedliche poreninduzierende Wirkung aufweist. Die beiden elektrophysiologischen Originalregistrierungen in der Abb. 11 zeigen vergleichend die Wirkung des Überstands aus *L. monocytogenes* WT- und aus *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S-Bakterienkulturen.

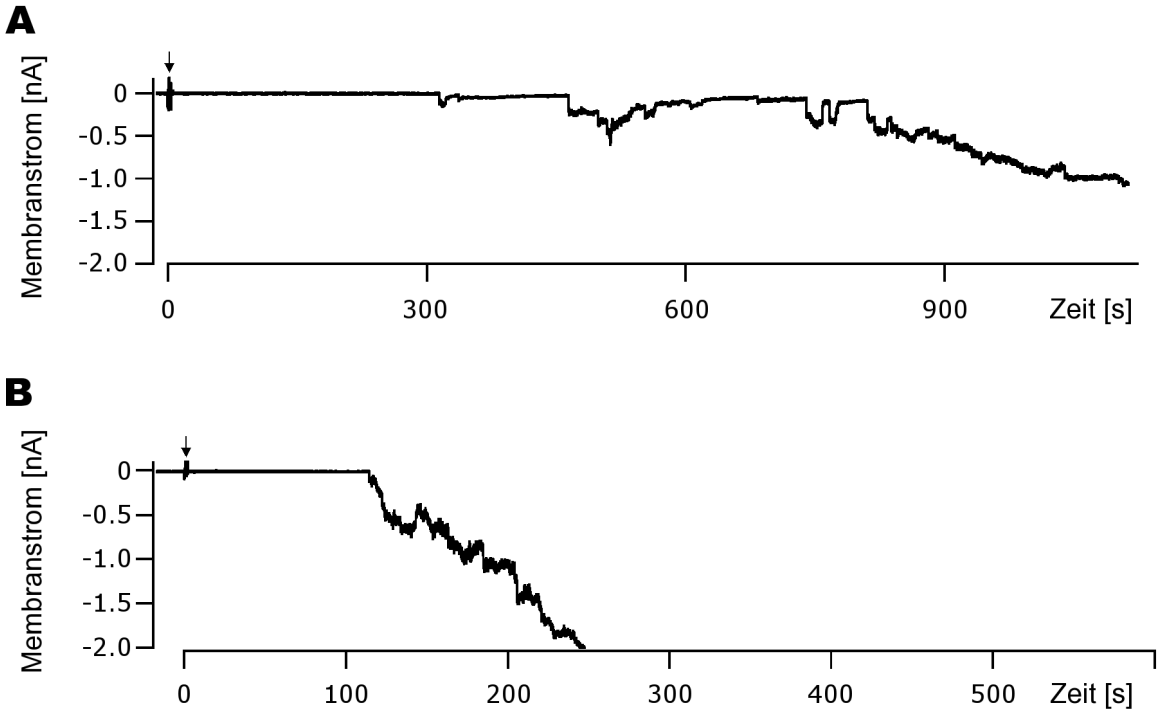

Abb. 11: Elektrophysiologische Registrierungen der Porenöffnungen und -schliessungen an HEK293-Zellen nach Applikation (Pfeil) eines jeweiligen 5% toxinhaltigen Überstands aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen **(A)** und aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S **(B)** im Vergleich. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Auffallend sind zum einen die um den Faktor 2-3 kürzere Latenzzeit bei der LLO-Mutante *hly*C484S (bei 21°C), als auch der höhere *hly*C484S-induzierte Membranstrom (letzterer als Ausdruck einer höheren Anzahl an gleichzeitig geöffneten LLO-induzierten Membranporen) im Vergleich zum LLO aus *L.m.* WT. Das bedeutet, dass mutiertes LLO *hly*C484S, bei dem das einzige Cystein durch Serin ersetzt ist, eine höhere poreninduzierende Potenz besitzt als der LLO-Wildtyp.

Nach diesem Ergebnis wurde die Temperaturabhängigkeit der Überstände aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S untersucht. Abbildung 12 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Latenzzeiten für die beiden Überstände (aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes* Wildtyp und aus ihrer Mutante *L. monocytogenes hly*C484S) im Vergleich. Um diesen Vergleich zu ermöglichen, wurden für beide Bakterienstämme die gleichen hohen Verdünnungen der Überstande verwendet.

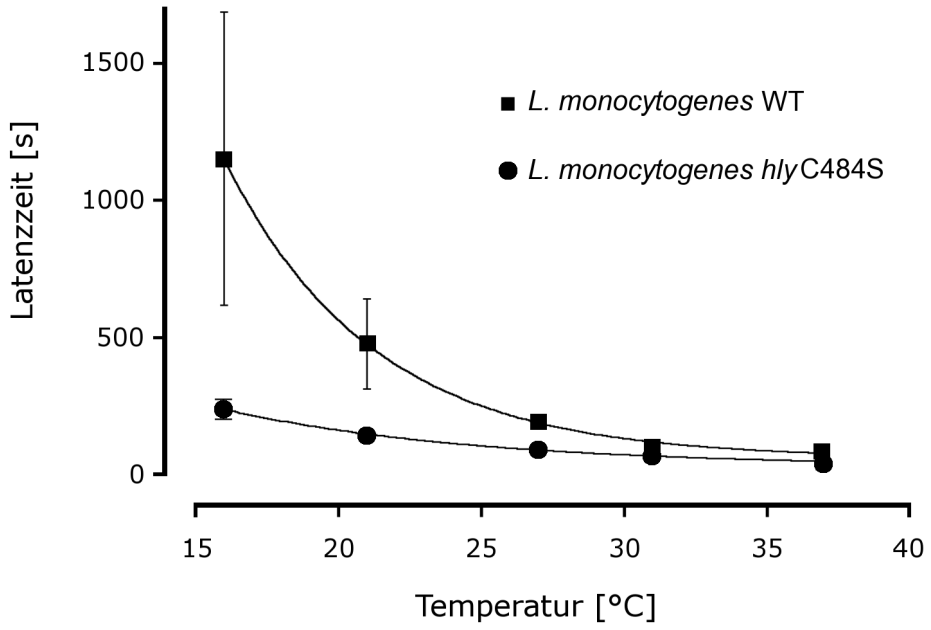

Abb. 12: Poreninduzierende Toxinaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur bei zwei Überständen aus Bakterienkulturen von *L. monocytogenes* WT (Abb. 10) und *L. monocytogenes hly*C484S im Vergleich. *Ordinate:* Latenzzeit von der Applikation der 5% toxinhaltigen Überstände zu den HEK293-Zellen bis zur Registrierung der ersten Porenöffnung in Sekunden, *Abszisse:* Temperatur der Badlösung in °C. Membranpotential -50 mV, Pro Datenpunkt n=5.

Das Resultat der Messungen war, dass bei der LLO-Mutante *hly*C484S aufgrund ihrer hohen poreninduzierenden Potenz die Temperaturabhängigkeit fast gar nicht zum Tragen kommt, während sich für den LLO-Wildtyp wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben eine exponentielle Kurve ergibt. Die hohe poreninduzierende Potenz des mutierten LLO *hly*C484S bedingt, dass die minimale Latenzzeit (definiert als die Diffusionszeit der Toxinmoleküle vom Applikationsort im Zellbad zur Zellmembranoberfläche) auch bei Raumtemperatur beinah erreicht ist.

Um auszuschliessen, dass die erhebliche Potenzierung der Porenbildung bei mutiertem LLO *hly*C484S auf eine Veränderung der Porenstromamplituden zurückzuführen ist, wurde die Amplitudenhäufigkeitsverteilung der hlyC484S-induzierten Porenströme bestimmt. Das Amplitudenhistogramm (Abb. 13) stellt die Verteilung von 331 Porenstromamplituden dar, die bei Verwendung unverdünnter Überstände aus *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkulturen bis zu einem Gesamtmembranstrom von -1 nA registriert wurden.

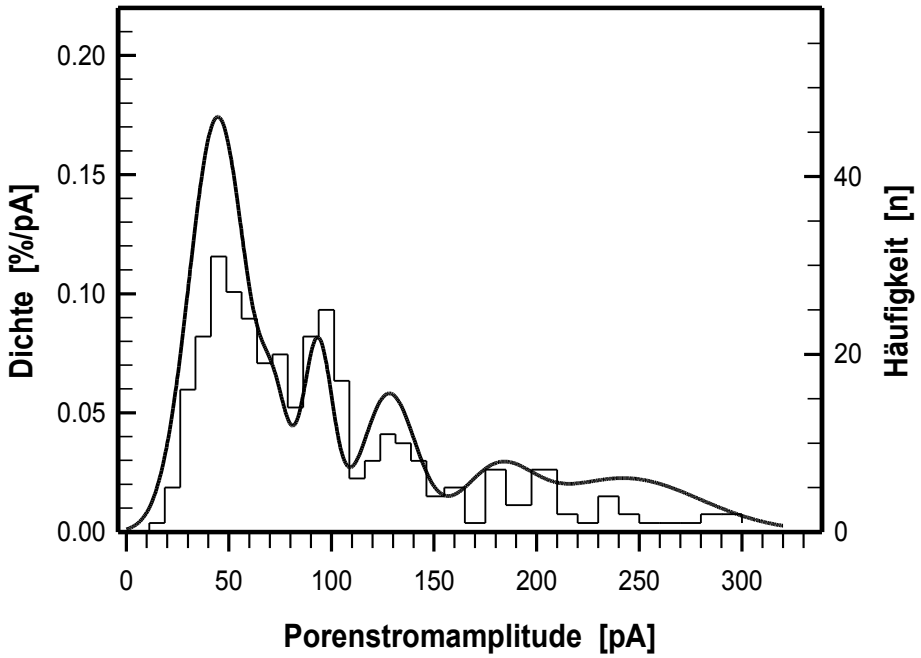

Abb. 13: Amplitudenhistogramm der Porenströme (n=331) nach Applikation unverdünnter Überstände aus *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkulturen. Die Abszisse zeigt die Porenstromamplituden, die rechte Ordinate deren absolute Häufigkeit bei einer Klassenbreite von 10 pA. Die linke Ordinate zeigt die Dichte der angepassten Normalverteilungen. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Das erste Maximum befindet sich bei 44 pA, weitere Maxima liegen bei 73 pA, 93 pA, 128 pA, 180 pA bzw. 243 pA. Somit zeigt die Mutante *L. monocytogenes hly*C484S im Vergleich zu ihrem Wildtyp nahezu die gleiche Häufigkeitsverteilung der Porenstromamplituden im Bereich von etwa 10 pA bis 290 pA. Registrierte man die Strom-Spannungskurven während der Porenöffnungen, so betrug das Umkehrpotential der gemessenen Porenströme +3 mV ±9 mV (n=21). Dies deutet ebenfalls auf eine nichtselektive Permeabilität der *hly*C848S-induzierten Poren für monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ hin.

Aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Lanthan und Eosin Yellow jeweils eine porenblockierende Wirkung gegenüber gereinigtem LLO aus *L. monocytogenes* WT aufweist (Bittenbring 2006). Die Messungen dieser Arbeit zeigten, dass auch Porenströme, die durch die toxinhaltigen Überstände aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S hervorgerufen wurden, durch Lanthan ($LaCl_3$) und ebenso durch Eosin Yellow vollständig blockiert werden konnten. Abbildung 14 zeigt als Beispiel ein elektrophysiologisches Experiment mit dem Überstand aus der Bakterienkultur der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S und die blockierende Wirkung von 100 µM Lanthanchlorid $LaCl_3$ (n=7). Der durch die Poren fließende Strom wurde nach Applikation von 100 µM Lanthanchlorid sehr schnell vollständig blockiert.

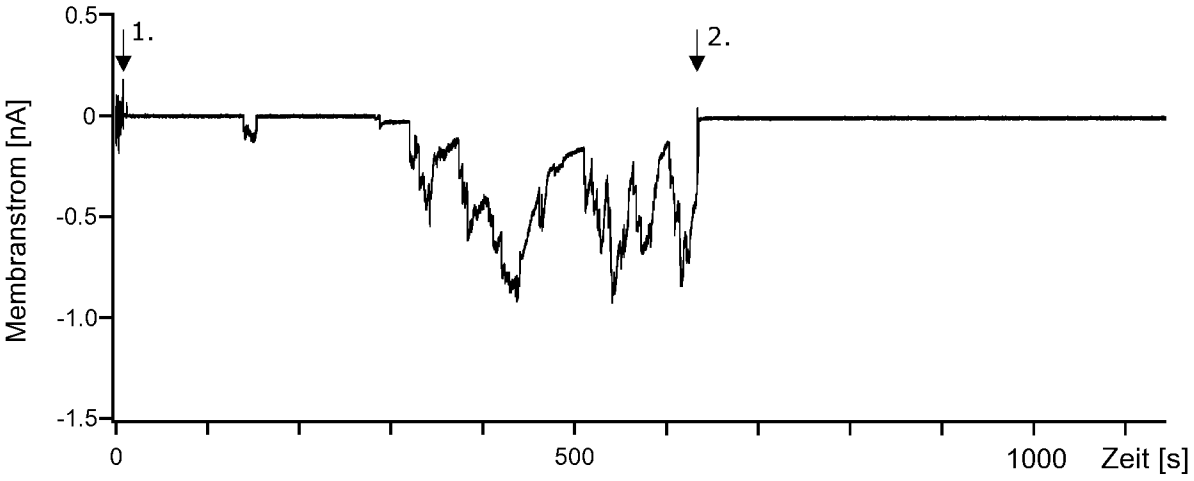

Abb. 14: Blockade des durch den toxinhaltigen Überstand aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S induzierten Porenstroms durch Lanthanchlorid ($LaCl_3$). 1. Pfeil: Applikation des 5% toxinhaltigen Überstands. Die Porenbildung wurde abgewartet. 2. Pfeil: Applikation von 100 µM $LaCl_3$ Endkonzentration. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Eosin Yellow in einer Endkonzentration von 100 µM bewirkte ebenfalls eine vollständige Blockade des registrierten Porenstroms, der durch die toxinhaltigen Überstände aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S induziert wurde (Abb. 15, n=8). Die Blockade erfolgte jedoch nicht so schnell wie durch Lanthanchlorid, sondern benötigte eine Zeit von 1-2 Minuten. Der porenblockierende Effekt des Eosin Yellow konnte durch eine Badperfusion aufgehoben werden, so dass die toxininduzierten Porenöffnungen und -schliessungen wieder registriert werden konnten.

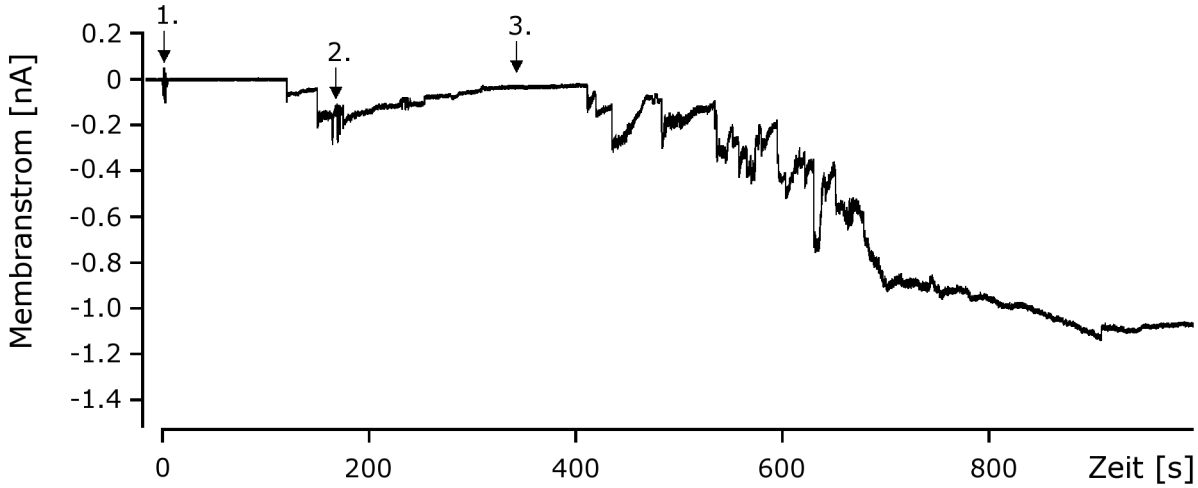

Abb. 15: Blockade des durch den toxinhaltigen Überstand aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S induzierten Porenstroms durch Eosin Yellow, sowie Fortschreiten der Porenöffnungen und -schliessungen nach einem Auswaschvorgang. 1. Pfeil: Applikation des 5% Überstands. Die Porenbildung wurde abgewartet. 2. Pfeil: Applikation von 100 µM Eosin Yellow Endkonzentration. Vollständige Porenblockade wurde abgewartet. 3. Pfeil: Auswaschvorgang wurde gestartet. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Aus den Ergebnissen kann man schliessen, dass der Cysteinrest im LLO-Molekül bei der Blockade des Porenstroms durch Lanthan und Eosin Yellow keine Rolle spielt, weil auch die Poren, die durch das mutierte LLO *hly*C484S induziert werden, blockiert werden können. Dieselbe porenstromblockierende Wirkung der beiden Substanzen Lanthanchlorid ($LaCl_3$) und Eosin Yellow wurde auch bei höheren Temperaturen bis 37°C beobachtet.

3.3.4 Überstand der *Listeria monocytogenes*-Mutante *hly*W492A

Die Experimente mit der Mutante *L. monocytogenes hly*W492A zeigten keine Porenbildung durch den toxinhaltigen Überstand bei einer Temperatur von 21°C, auch wenn unverdünnte Überstände verwendet wurden. Da die im Abschnitt 3.3.2 vorgestellten Experimente mit dem Überstand der *L. monocytogenes* WT gezeigt haben, dass der LLO-haltige Überstand durch Erhöhung der Temperatur im Hinblick auf die poreninduzierende Aktivität sehr viel potenter wird, wurden entsprechende Experimente bei 37°C durchgeführt (Abb. 16). Auch hier konnte innerhalb einer Messzeit von 30 Minuten keine Porenbildung registriert werden (n=13). Dies zeigt, dass LLO der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*W492A seine Fähigkeit zur Porenbildung verloren hat.

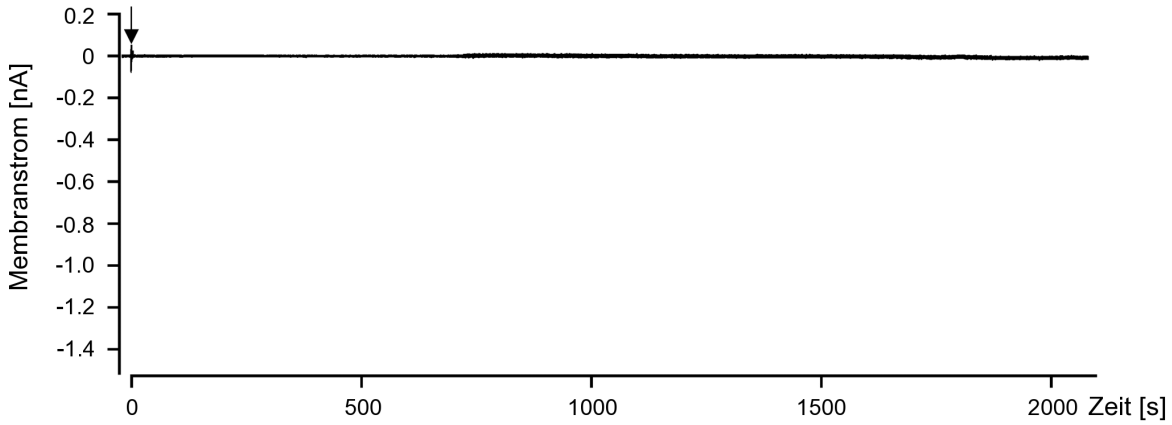

Abb. 16: Elektrophysiologische Ableitung des Membranstroms einer HEK293-Zelle nach Applikation (Pfeil) eines unverdünnten Überstands aus Bakterienkulturen der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*W492A. Porenöffnungen konnten innerhalb einer Messzeit von 30 Minuten nicht beobachtet werden. Temperatur 37°C, Membranpotential -50 mV.

3.4 Pharmakologische Charakterisierung der LLO-induzierten Poren

Im vorangehenden Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum LLO Wildtyp die Substitution des Cysteins 484 durch Serin im LLO-Molekül die Potenz des Toxins im Bezug auf seine Porenbildung bereits bei normaler Messtemperatur von 21°C erheblich steigert. Aus diesen Ergebnissen ergab sich ein neuer Ansatz für die weiteren Untersuchungen. Es sollte nach solchen chemischen Substanzen gesucht werden, die mit dem einzigen Sulfhydrylrest (-SH) im LLO-Molekül reagieren können und möglicherweise dadurch die Toxineigenschaften hinsichtlich der Porenbildung verändern.

3.4.1 Wirkung von Dithiothreitol

Es ist bekannt, dass die Hämolyseaktivität der CDTXs in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) gesteigert wird (Alouf & Geoffroy 1984). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob DTT die poreninduzierende Wirkung von LLO in toxinhaltigen Überständen aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen erhöhen kann.

In den Patch-Clamp Experimenten sollte DTT in einer Konzentration von 100 µM angewendet werden. Um dies zu erreichen, musste DTT in einer Konzentration von 4 mM appliziert werden (50 µl von 4 mM DTT-Lösung zu 1950 µl Zellbadvolumen). In den ersten Experimenten stellte sich heraus, dass die Applikation einer 4 mM DTT-Lösung aufgrund der hohen Viskosität dieser Lösung sofort zu einem Verlust der Whole-Cell Messkonfiguration führte. Daher wurde DTT *vor* der Herstellung der Whole-Cell Messkonfiguration in die Badlösung vorgelegt und erst danach wurde der Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen appliziert (2,5%ge Verdünnung, v/v-Verhältnis Überstand zu Lösungsmittel wie 1:40). Als Kontrolle wurden Experimente ohne Vorinkubation mit 100 µM DTT durchgeführt. Als Maß für die Toxinwirkung wurde die Zeit von der Applikation des LLO-haltigen Überstands bis zum Auftreten der ersten Porenöffnung genommen (Latenzzeit). Abbildung 17 zeigt in Form eines Balkendiagramms einen Vergleich der Wirksamkeit von bakteriellem

Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen ohne (Toxin 1) und in Anwesenheit von 100 µM DTT in der Badlösung (Toxin 2). Das Resultat dieser Messungen war, dass DTT bei einer Temperatur von 21°C ein um den Faktor 3,5 schnelleres Auftreten der ersten Porenöffnung bewirkte.

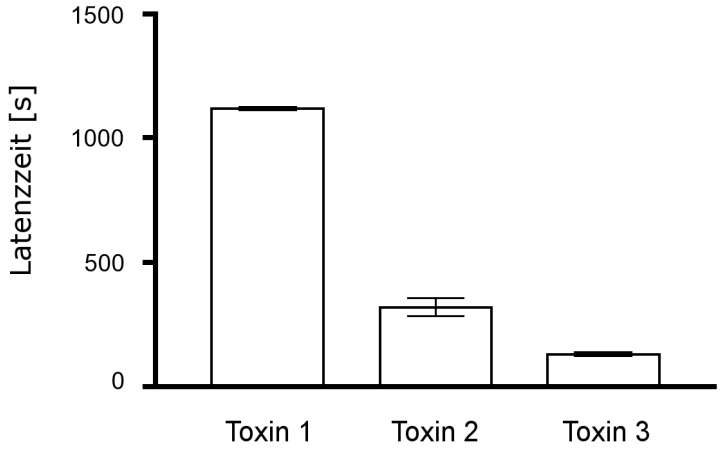

Abb. 17: Messung der Wirkung LLO-haltiger Überstände im Bezug auf die Zeit von der Überstandsapplikation bis zur Registrierung der ersten Porenöffnung (Latenzzeit).
Toxin 1 = LLO-haltiger Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen, **Toxin 2** = LLO-haltiger Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen in Anwesenheit von 100 µM DTT in der Badlösung, **Toxin 3** = mutiertes LLO im Überstand aus *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkulturen. Verdünnung der toxinhaltigen Überstände jeweils 2,5%. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV. Pro Datenpunkt n=5.

Mitdargestellt in der Abb. 17 ist die Zeit bis zum Auftreten der ersten Porenbildung, die durch die Überstände aus *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkulturen hervorgerufen werden, die ebenfalls auf 2,5% verdünnt wurden (Toxin 3). Alle drei gewählten toxinhaltigen Überstände weisen in der Reihenfolge der Aufzählung zueinander eine signifikant ($p<0,001$) höhere poreninduzierende Aktivität auf. Diese vergleichenden Experimente ergeben, dass Cystein im Listeriolysinmolekül eine große Rolle für die poreninduzierende Wirkung von LLO spielt. Seine Reduzierung durch DTT oder sogar seine Substitution durch Serin erhöht die poreninduzierende LLO-Wirkung bis zu einem Faktor 10.
Ein vergleichbarer DTT-Effekt wurde auch in elektrophysiologischen Messungen mit Anwendung solcher Überstände beobachtet, die ohne FAFBSA hergestellt worden

waren, so dass der gezeigte DTT-Effekt nicht durch die Anwesenheit des FAFBSA beeinflusst wurde.

3.4.2 Wirkung von Captopril

Im vorangehenden Abschnitt 3.4.1 wurde gezeigt, dass das Reduktionsmittel Dithiotreitol die poreninduzierende Wirkung der LLO-haltigen Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen signifikant steigert. Daher wurde nach weiteren chemischen Substanzen gesucht, die wie DTT SH-Gruppen besitzen und diese für ihre Wirkung benötigen. In Frage kam als typischer Vertreter der ACE-Hemmstoffe (Angiotensin Converting Enzyme) das Captopril, dessen Sulfhydryl-gruppe (Thiolgruppe) eine hohe Affinität zu Zn^{2+}-Ionen des ACE aufweist und dadurch die inhibitorische Potenz des Captoprils gegenüber ACE bedingt (Lima 1999).

Bei der Herstellung der für die Experimente benötigten Lösungen stellte sich heraus, dass das Captopril in E1-Lösung sehr schwach löslich war. Aus diesem Grund wurde DMSO anstatt von E1-Lösung als Lösungsmittel gewählt. Zunächst wurde eine 1000fach höher konzentrierte Captoprillösung mit DMSO angesetzt. Analog zur Konzentration bei den Experimenten mit DTT war eine Captopril-Endkonzentration von 100 µM gewünscht. Es wurde daher eine 100 mM Konzentration hergestellt, wofür 2,17 mg Captopril in 100 µl DMSO aufgelöst wurden. Im Experiment wurden 2 µl der 100 mM Captoprillösung in 1998 µl Badvolumen hinzugegeben, was einer Verdünnung mit dem Faktor 1000 entsprach. Das DMSO wurde ebenso um den Faktor 1000 verdünnt, und somit befand sich DMSO in einer Endkonzentration von 1 mM in der Badlösung, die sich in Kontrollexperimenten als nicht schädigend für die Zellmembranen erwies.

In den Patch-Clamp Experimenten wurde ein Verdünnungsgrad des LLO-haltigen Überstands aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkultur von 2% gewählt. Die Applikation dieses Überstands führte selten zur Porenbildung (Abb. 18A, n=5). Im verglei-

chenden Experiment wurden die HEK293-Zellen mit 100 µM Captopril 5 Minuten vorinkubiert. Nach anschliessender Applikation des 2%gen Überstands zum mit Captopril vorinkubierten Zellbad traten LLO-Poren früher und häufiger auf (Abb. 18B). Mit diesen Experimenten (n=5) konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation des LLO-haltigen Überstands mit Captopril eine höhere poreninduzierende Potenz des LLO bewirkte.

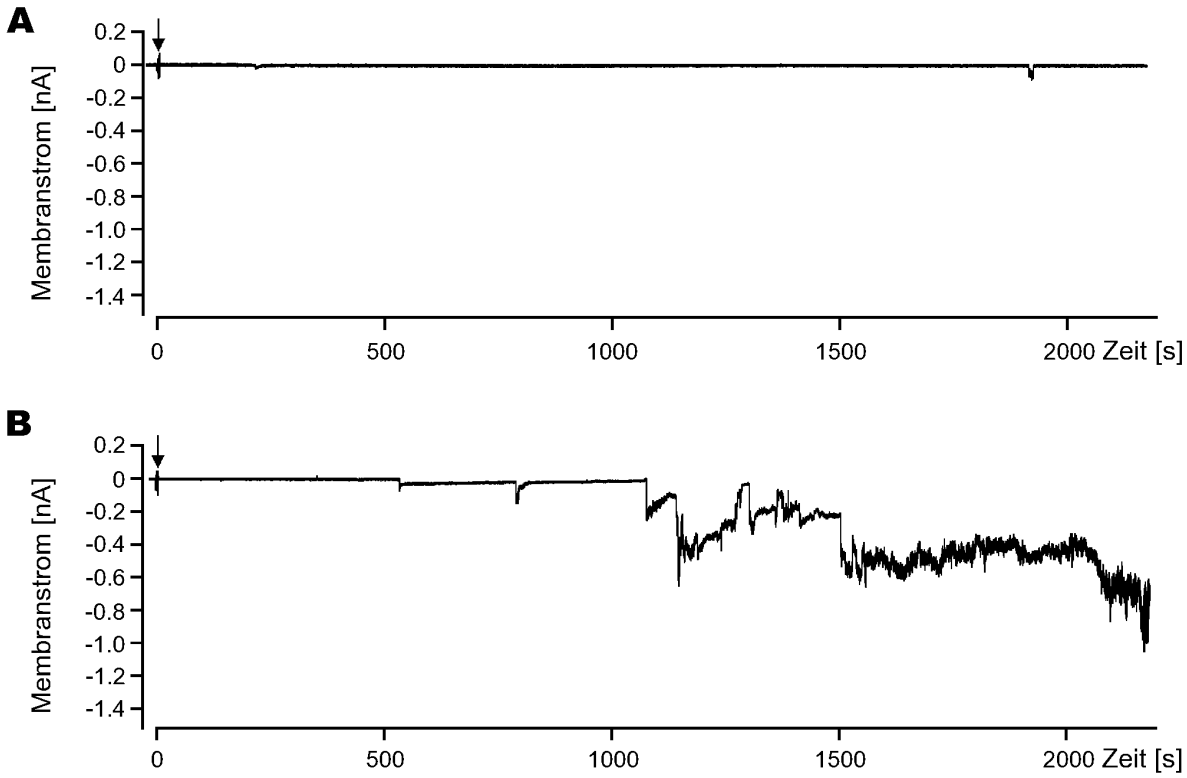

Abb. 18: Potenzsteigende Wirkung von Captopril auf den toxinhaltigen Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkultur. (**A**) Bei einer Verdünnung des Überstands von 2% ist die porenbildende Wirkung sehr schwach ausgeprägt. Pfeil: Applikation des Überstands. **(B)** Steigerung der poreninduzierenden Wirkung desselben Überstands nach der 5-minütigen Vorinkubation der HEK293-Zellen mit 100 µM Captopril. Pfeil: Applikation des Überstands. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Die analogen Experimente wie zur Abb. 18 beschrieben, wurden mit einer Mutante der *L. monocytogenes* durchgeführt, bei der das einzige Cystein im LLO-Molekül durch ein Serin ersetzt worden war. Das Ergebnis dieser Experimente (n=8) war, dass die Vorinkubation des Überstands von *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S mit Captopril die Porenbildung nicht weiter verstärkt. Daraus lässt sich entnehmen,

dass die aktivierende Wirkung des Captoprils auf die LLO-induzierte Porenbildung durch das einzige Cystein an der Stelle 484 des LLO-Moleküls vermittelt wird.
In einem weiteren Experiment wurde zunächst ein auf 20% verdünnter Überstand appliziert (d.h. v/v-Verhältnis Überstand zu Lösungsmittel wie 1:5), so dass die Porenbildungen und -schliessungen gut beobachtet werden konnten. Zunächst wurde die Porenbildung abgewartet und dann 100 µM Captopril appliziert (Abb. 19). Bei insgesamt 10 Experimenten kam es zu keiner veränderten Kinetik der Porenöffnungen und -schliessungen, was darauf hinweisen könnte, dass LLO-Moleküle bereits an der Zellmembran gebunden haben bzw. in der Membran verankert sind und für die Wirkung des Reduktionsmittels nicht mehr zugänglich sind.

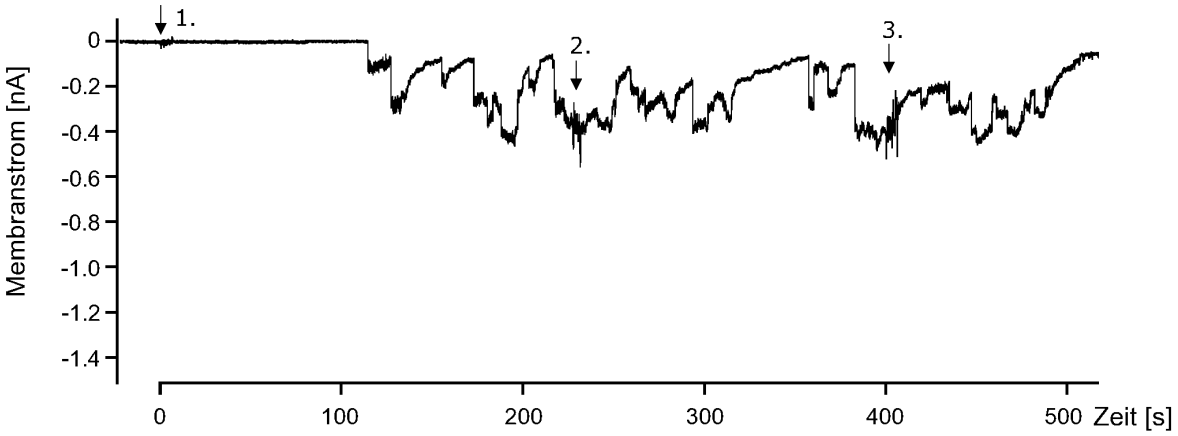

Abb. 19: Fehlen des verstärkenden Captoprileffekts auf die poreninduzierende Wirkung von LLO, wenn die LLO-Moleküle bereits an der Zellmembran gebunden waren bzw. in der Membran verankert sind. 1. Pfeil: Applikation des 20%gen Überstands aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkultur. Die Porenbildung wurde abgewartet. 2. und 3. Pfeil: Applikation von jeweils 100 µM Captopril ins Zellbad während der Porenöffnungen- und schliessungen. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Zusammenfassend kann zum Captopril gesagt werden, dass diese SH-haltige Substanz signifikant die LLO-induzierte Porenbildung der Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen verstärkt. Aus der Tatsache, dass Captopril eine solche Steigerung der poreninduzierenden LLO-Wirkung *nur* bei den Überständen aus *L. monocytogenes* WT bewirkte und nicht bei den entsprechenden Überständen aus *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S, die keinen Cysteinrest besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung des Captoprils über das einzige Cystein an der Stelle 484 des LLO vermittelt wird.

3.4.3 Wirkung von Protamin

Nach den Experimenten mit DTT und Captopril wurde in der Literatur nach weiteren Substanzen gesucht, die ebenfalls eine oder mehrere Thiolgruppen in ihrer Primärstruktur und somit reduzierende Eigenschaften besitzen. Lachsprotamin wurde gewählt, weil es 6-9 Cysteinreste pro Molekül in seiner primären Struktur besitzt.

Von Protamin ist bekannt, dass es Porenbildung an Lipidbilayers induziert (Johansen et al. 1997; Kagan et al. 1990; Uyttendaele & Debevere 1994). Abbildung 20 zeigt, dass bei einer Protaminkonzentration von 500 nM nach ca. 2 Minuten Porenöffnungen und -schliessungen registriert wurden. Konzentrationswirkungskurven zeigten, dass die Protaminkonzentration über 300 nM liegen musste, um Poren zu induzieren.

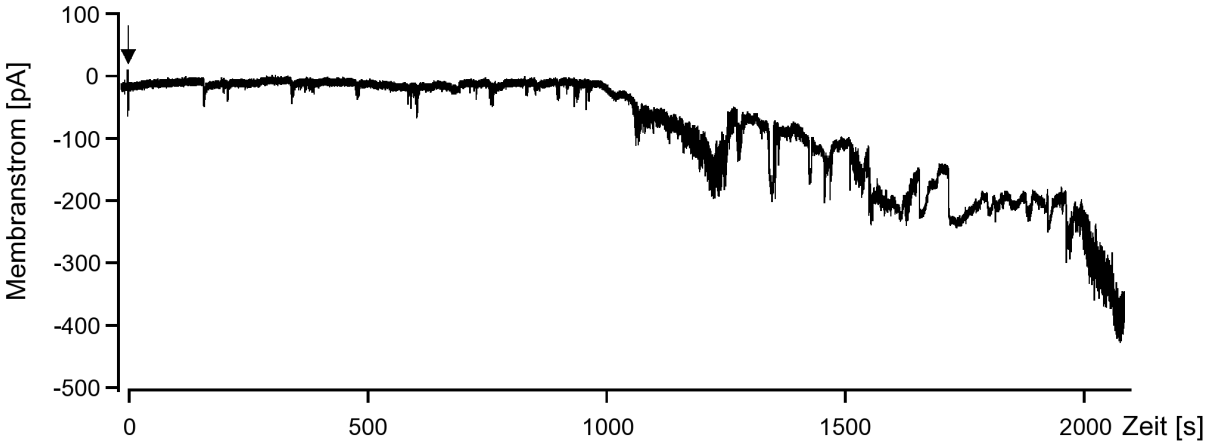

Abb. 20: Protamininduzierte Porenbildung in der Zellmembran einer HEK293-Zelle. Pfeil: Applikation von Protamin, Endkonzentration 500 nM. Temperatur 21°C, Membranpotential -50 mV.

Um eine eventuelle Erhöhung der poreninduzierenden Potenz von LLO (durch eine Reduktion des im LLO-Molekül einzigen Cysteinrests) mittels Protamin elektrophysiologisch störungsfrei messen zu können, musste der poreninduzierende Protamineigeneffekt „ausgeschaltet“ werden. Es wird in der Literatur postuliert, dass Protamin die poreninduzierende Wirkung erst dann entfalten kann, wenn es sich als kationisches Molekül an die negativ geladene Membran lebender Zellen anlagern kann (Johansen et al. 1997). Um dies zu überprüfen, wurden folgende Patch-Clamp

Experimente durchgeführt. Nach Herstellung der Whole-Cell Ableitungskonfiguration wurde ein Membranpotential von -50 mV an die Zellmembran angelegt. In die Badlösung wurde Protamin in einer solchen Konzentration hinzugegeben, die sicher zur Porenbildung führt (20 µM). Nach dem Auftreten von Poren wurde das Membranpotential der Zelle sprunghaft von -50 mV auf +40 mV umgeladen (Abb. 21, n=5). Der protamininduzierte Membranstrom nimmt nach dem Umladen des Membranpotentials von -50 mV auf +40 mV ab und es kommt zu keiner weiteren Porenbildung.

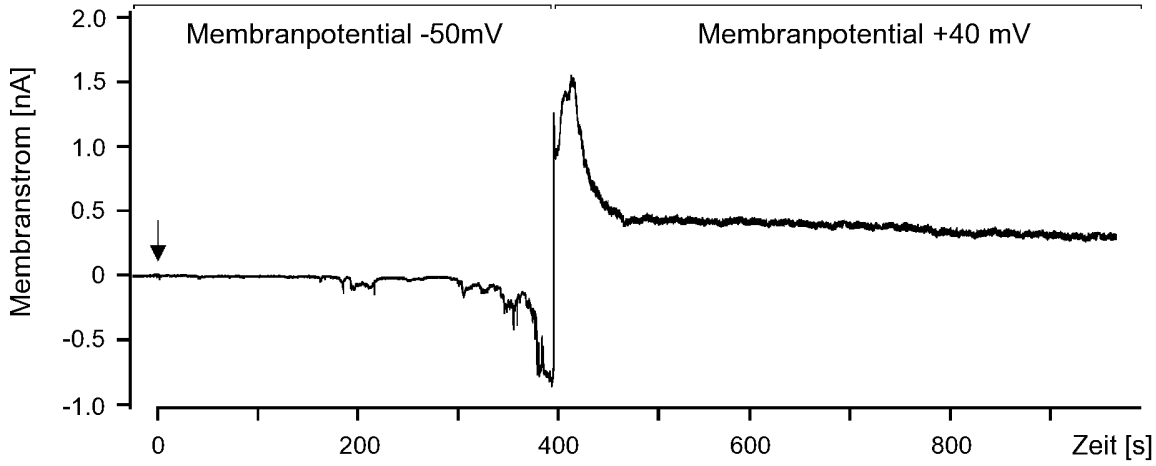

Abb. 21: Nach einem sprunghaften Verändern des Membranpotentials von -50 mV auf +40 mV nimmt der bereits vorhandene protamininduzierte Porenstrom langsam ab und es bilden sich keine neuen Poren im weiteren Verlauf der Messung. Pfeil: Applikation von Protamin, Endkonzentration 20 µM. Temperatur 21°C.

Anhand dieser Ergebnisse aus einleitenden elektrophysiologischen Experimenten mit Protamin kann also bestätigt werden, dass Protamin in einer Konzentration von über 300 nM an der Membran einer HEK293-Zelle eine Porenbildung induziert, und dass dieser Protamineffekt vom Membranpotential der Zelle abhängig ist.

Nachdem (durch das Anlegen eines positiven Membranpotentials) eine Möglichkeit zum Verhindern des poreninduzierenden Protamineffekts gefunden wurde, sollte die Wirkung von Protamin auf die LLO-induzierten Poren untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob Protamin, als eine SH-haltige Substanz, die porenbildende Wirkung von LLO in den Überständen aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen analog zum DTT und Captopril verstärkt. Butterworth und Mitarbeiter (2002)

konnten mit Hilfe der high-performance liquid chromatography die Protaminkonzentration im menschlichen Plasma bestimmen. Sie zeigten, dass der Protaminplasmaspiegel bis auf ca. 100 nM ansteigt, wenn Protamin in klinisch relevanten Konzentrationen von 0,5 mg/kg Körpergewicht i.v. appliziert wird. In den Patch-Clamp Experimenten konnte keine Steigerung der porenbildenden Potenz von LLO durch 100 nM Protamin nachgewiesen werden. Dies machte eine Erhöhung der Protaminkonzentration notwendig, wobei die Endkonzentration (analog zu Experimenten mit DTT und Captopril) bis zu 100 µM angestrebt wurde. Um den poreninduzierenden Eigeneffekt von Protamin zu vermeiden, wurde, wie oben erläutert, das Membranhaltepotential von +40 mV gewählt. Die toxinhaltigen *L. monocytogenes* Wildtyp-Überstände wurden mit Protamin gemischt und ins Bad mit den zu messenden HEK293-Zellen appliziert. Überraschenderweise führte Protamin zu keiner Erhöhung der poreninduzierenden Potenz von LLO. Die Abbildung 22 zeigt, dass bei einer Protaminkonzentration von 10 µM die Porenbildung durch die unverdünnten, LLO-haltigen Überstände aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen verhindert wird (n=7).

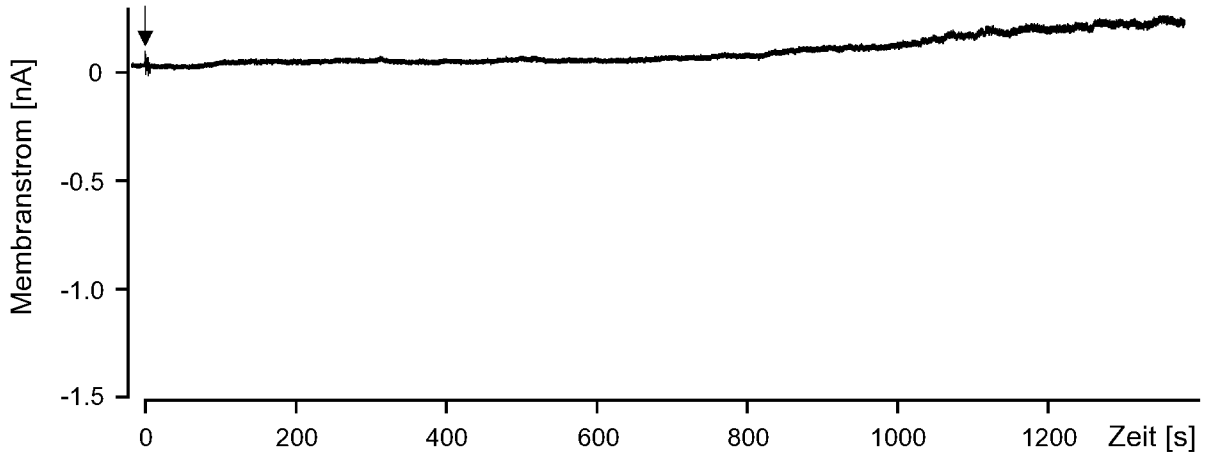

Abb. 22: Protamin verhindert die LLO-induzierte Porenbildung. Pfeil: Applikation von mit Protamin gemischtem, unverdünntem Überstand aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkultur, Protaminendkonzentration 10 µM. Das Membranpotential von +40 mV wurde gewählt, um den poreninduzierenden Effekt von Protamin selbst zu vermeiden. Temperatur 21°C.

Das Resultat dieser Patch-Clamp Messungen war also, dass Protamin den LLO-induzierten porenbildenden Effekt nicht wie angenommen verstärkt, sondern blockiert.

Diese porenblockierende Protaminwirkung auf LLO-Poren wurde dann auch bei einem physiologischen Membranpotential von -50 mM untersucht. Dazu wurde der LLO-haltige, unverdünnte Überstand aus *L. monocytogenes* WT-Bakterienkulturen mit Protamin gemischt (Protaminendkonzentration in der Zellbadlösung 10 µM) und bei einem angelegten Membranhaltepotential von -50 mV ins Zellbad appliziert. Zu einer weiteren Überraschung konnte auch bei diesen experimentellen Bedingungen keine LLO-induzierte Porenbildung registriert werden (Abb. 23, n=6).

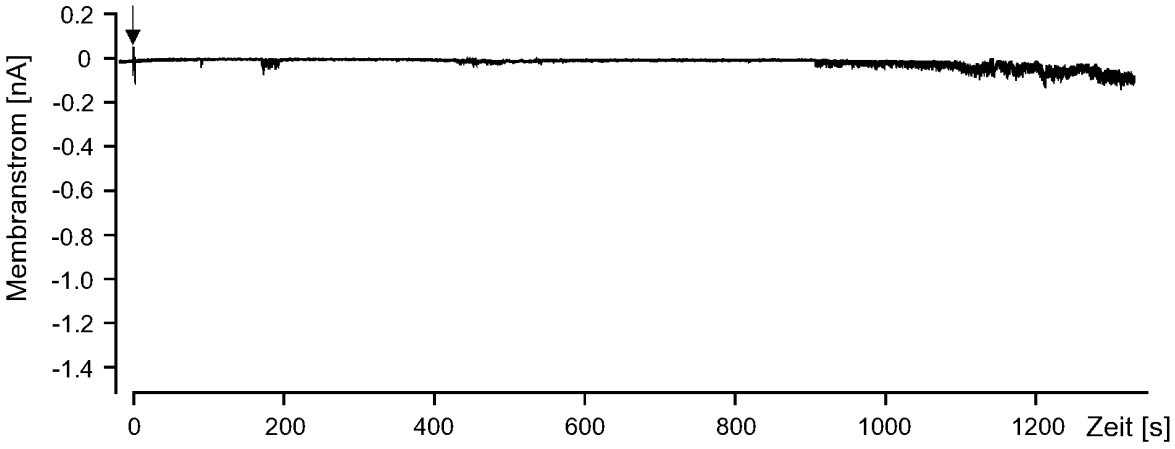

Abb. 23: Protamin verhindert die LLO-induzierte Porenbildung. Pfeil: Applikation von mit Protamin gemischtem, unverdünntem Überstand aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkultur, Protaminendkonzentration 10 µM. Bei einem Membranhaltepotential von -50 mV Registrierung eines unspezifischen Membranstroms, der für die LLO-Poren nicht typisch, jedoch mit Protamineffekt vergleichbar ist. Temperatur 21°C.

Auch nach Applikation von mit Protamin gemischten Überständen aus *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S-Bakterienkulturen konnte keine für diesen Bakterienstamm typische Poreninduktion beobachtet werden. Abbildung 24 zeigt eine deutlich abgeschwächte Porenbildung, die durch das mutierte LLO *hly*C484S hervorgerufen wird, wenn dieser unverdünnte, mit 10 µM Protamin gemischte Überstand zu den HEK293-Zellen appliziert wird. Im Vergleich zu den in den Abb. 11B, 14 oder 15 abgebildeten Experimenten, bei denen die auf 5% verdünnten Überstände aus *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S-Bakterienkulturen verwendet wurden und innerhalb kurzer Zeit eine Membranstromzunahme bis auf 1 nA beobachtet werden konnte, ist die Porenbildung in der Abb. 24 trotz des unverdünnten Überstands sehr schwach ausgeprägt.

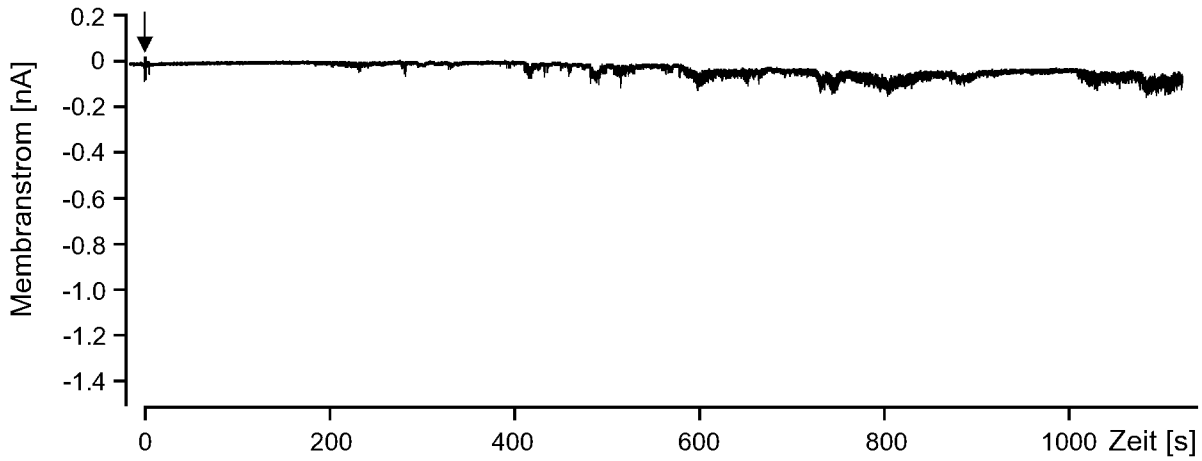

Abb. 24: Abnahme der poreninduzierenden Potenz des mutierten LLO *hly*C484S im toxinhaltigen Überstand aus der Bakterienkultur der *L. monocytogenes*-Mutante *hly*C484S durch Protamin. Pfeil: Applikation von mit Protamin gemischtem, unverdünntem Überstand aus *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkultur, Protaminendkonzentration 10 µM. Bei einem Membranhaltepotential von -50 mV Registrierung der Öffnungen und Schliessungen einzelner LLO *hly*C484S-Poren sowie eines unspezifischen Membranstroms, der mit Protamineffekt vergleichbar ist. Temperatur 21°C.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der einzige Cysteinrest im LLO-Molekül für den porenblockierenden Effekt von Protamin nicht notwendig ist, da bei der *L.m.*-Mutante *hly*C484S dieses Cystein durch Serin ausgetauscht ist und lässt die Annahme zu, dass Protamin die beiden Toxine (LLO WT und seine mutierte Form *hly*C484S) unspezifisch bindet.

4 Diskussion

Das Peptidtoxin Listeriolysin O (LLO) wird vom grampositiven, fakultativ intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* gebildet und gehört zur Zytolysin-Familie CDTX (cholesterol dependent toxins). LLO ist ein essentieller Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* (Guzman et al. 1996). Seine porenbildende Aktivität konnte an lebenden, eukaryontischen Zellen elektrophysiologisch in Echtzeit demonstriert werden (Repp et al. 2002). In den letzten Jahren gelang es unserer Arbeitsgruppe, die porenbildende Aktivität des LLO weitestgehend zu charakterisieren. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Aminosäuresubstitutionen im Listeriolysin O-Gen von *L. monocytogenes* auf die porenbildende Toxinaktivität mit Hilfe der Patch-Clamp Technik.

Von den beiden zu untersuchenden DNA-Mutanten *L. monocytogenes hly*W492A und *L. monocytogenes hly*C484S existierten bis dato keine gereinigten Toxine. Daher musste zunächst eine Methode etabliert werden, mit der sich die für die elektrophysiologischen Messungen notwendigen Toxinmengen schnell, einfach und reproduzierbar gewinnen ließen. Zudem standen vom gereinigten Wildtyp-LLO für die vergleichenden Experimente nur Chargen mit geringen Toxinmengen verschiedener biologischer Aktivität zur Verfügung, die im Erythrozytenhämolyse-Test bis zu einem Faktor von drei variierte. Die bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Butler 2005; Bittenbring 2006) verwendeten Isolationstechniken waren für die geplanten Messungen nicht optimal, da die isolierten Überstände nicht steril waren und noch Bakterienzellen enthielten. Es war somit davon auszugehen, dass die im Überstand noch vorhandenen Bakterien ihre Toxine auch nach der Isolation freisetzen und somit die Toxinkonzentration im Überstand kontinuierlich erhöhen könnten. Die in dieser Arbeit beschriebene Isolationstechnik beinhaltet deshalb im letzten Protokollschritt eine Filtration. Da die Isolate nach der Filtration zwar bakterienfrei waren, aber sich leider zunächst auch als nicht mehr porenbildend herausstellten, musste zu den Isolaten *vor* der Filtration FAFBSA (fatty acid free bovine serum albumin) als „Trägersubstanz“ für Toxinmoleküle eingeführt werden, um die unspezifische Bindung an der für die Filtration verwendeten Filtermembran zu mini-

mieren. Die „Transporter“-Funktion des Albumins für verschiedene Moleküle in lebenden Organismen ist seit langem bekannt (Rothschild et al. 1975; Gekle 2005).

Mit Hilfe der herausgearbeiteten Isolationstechnik wurden zunächst LLO-haltige, bakterienfreie Überstände aus *L. monocytogenes* Wildtyp-Bakterienkulturen hergestellt und elektrophysiologisch charakterisiert. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Repp et al. 2002; Butler 2005) konnte demonstriert werden, dass die hergestellten Isolate in Bezug auf ihre poreninduzierende Aktivität identische Eigenschaften aufwiesen wie das gereinigte LLO. So waren die durch den Überstand hervorgerufenen Poren für monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ unselektiv permeabel. Ebenfalls traten die bekannten Porenschlusskinetiken (Butler 2005) in der gleichen Verteilung auf. Eine Übereinstimmung der durch LLO und den Überstand induzierten Porenströme zeigte sich auch im jeweiligen Amplitudenhistogramm. Das Auftreten mehrerer höherer Porenleitfähigkeiten, die ganzzahlige Vielfache der Leitfähigkeit der beschriebenen „Grundpore“ (Repp et al. 2002) darstellten, wies auch in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass sich höchstwahrscheinlich Cluster von LLO-Poren in der Zellmembran bilden und sich synchron öffnen können, was zu den beobachteten größeren Porenstromamplituden führt.

Die poreninduzierende Aktivität des unverdünnten Überstands aus Bakterienkulturen von *L. monocytogenes* wurde mit der Wirkung des gereinigten LLO verglichen. Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass das gereinigte LLO eine sehr steile Konzentrationswirkungskurve mit einem Hill-Koeffizienten von 2,3 besitzt, so dass sich die Toxinkonzentration für die porenbildende Listeriolysinwirkung zwischen 0 und 100% im Bereich von nur einer Zehnerpotenz bewegt (Repp et al. 2002). Als Messparameter wurde hierbei die Latenzzeit bis zur Bildung der ersten Pore gewählt. Beim Vergleich des bakterienfreien Überstands und des gereinigten LLO zeigte sich, dass der 100%ige Überstand in etwa der Wirkung von 10-100 ng/ml LLO entsprach. Mit dem bakterienfreien Überstand ließen sich also Poren in der Membran von HEK293-Zellen erzeugen, die die identischen Charakteristika besaßen wie diejenigen Poren, die durch aufgereinigtes LLO induziert wurden. Damit stand eine Präparationstechnik zur Verfügung, die es erlaubte, auch die porenbildenden Eigen-

schaften mutierter LLO-Moleküle zu untersuchen und zu vergleichen, ohne dass hierfür eine aufwendige chromotographische Aufreinigung und Isolation von LLO auf Proteinebene nötig war.

Erstmals konnte mit der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die LLO-induzierte Porenbildung stark temperaturabhängig ist. Mit steigender Temperatur zeigten die LLO-haltigen Überstände eine steigende porenbildende Aktivität, wobei sich die Temperaturabhängigkeit der Porenbildung mit einer exponentiellen Kurve mit einem Q_{10}-Wert von 3-4 beschreiben lässt. Im Vergleich zu 21°C war die porenbildende Potenz von LLO bei 37°C mindestens um den Faktor drei größer. Es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* die Expression und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1α/β, Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor-α in humanen Monozyten induziert (Bhakdi et al. 1991). Diese fiebersteigernden Faktoren sind beim Menschen eng in die Regulation der Körpertemperatur eingebunden. Der Körpertemperaturanstieg während einer Listerioseerkrankung führt dementsprechend zu einer Steigerung der porenbildenden Aktivität von LLO. Für den klinischen Alltag ist daraus abzuleiten, dass die Fiebersenkung im Krankheitsverlauf der Listeriose eine einfache und zugleich effektive Therapieoption darstellen könnte.

Die Gruppe der cholesterolabhängigen Zytolysine (CDTX) besteht aus 23 Mitgliedern. Den meisten CDTX ist eine konservierte Sequenz von 11 Aminosäuren (ECTGLAWEWWR) im carboxyterminalen Abschnitt gemeinsam, die als Undekapeptid bezeichnet wird. Die Funktion dieses Molekülabschnitts ist bis jetzt nicht bekannt. Die Tryptophanreste (W) in diesem Genabschnitt scheinen jedoch essentiell für die hämolytische Aktivität zu sein (Alouf 2000; Billington et al. 2000). Die Substitution der Aminosäure Tryptophan in Position 492 des LLO-Moleküls durch Alanin führte zum Virulenzverlust von *L. monocytogenes* (Michel et al. 1990). Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Butler 2005) konnten mit Hilfe der Patch-Clamp Technik zeigen, dass die Substitution dieses Tryptophans im LLO-Molekül durch Alanin zum starken Verlust der poreninduzierenden Aktivität des Listeriolysins O bei 21°C führt. Wegen der offensichtlichen Temperaturabhängigkeit porenbildender Akti-

vität des LLO wurde in der vorliegenden Arbeit bei 37°C gemessen. Es wurde vermutet, dass die bei 21°C fast vollständig fehlende poreninduzierende Aktivität des mutierten LLO aus *L. monocytogenes hly*W492A-Bakterienkulturen mit steigender Temperatur registrierbar wird. Jedoch zeigte das isolierte LLO aus Bakterienkulturen der Mutante *L. monocytogenes hly*W492A auch bei dieser für Menschen physiologischen Temperatur keine porenbildende Aktivität. Diese Daten unterstützen somit die von Butler (Butler 2005) formulierte Hypothese, dass die stark hydrophobe Aminosäure Tryptophan in Position 492 im LLO-Molekül für die Ausbildung der LLO-Pore essentiell ist. Welcher der drei Schritte im Prozess der Porenbildung verhindert wird (Membranbindung, Membraninsertion oder Oligomerisation), konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Unfähigkeit zur Porenbildung dieses mutierten LLO *hly*W492A könnte jedoch klinisch bedeutsam sein, denn hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit zur Entwicklung einer Vakzine gegen humane Listeriose. Trotz der Tatsache, dass *L. monocytogenes* ein intrazellulärer Parasit ist und sich nach gängiger Meinung dem Antikörperangriff des Wirts entzieht, konnte im Mausversuch gezeigt werden, dass intraperitoneal applizierte monoklonale Antikörper gegen LLO die Resistenz gegenüber *L. monocytogenes* Wildtyp signifikant erhöhen (Edelson et al. 1999). Da das mutierte LLO *hly*W492A keine Poren induziert, könnte es im Säugetierorganismus zur Induktion der Antikörperbildung führen, ohne die Membran von Zellen zu beschädigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die porenbildende Aktivität von LLO aus der Mutante *L. monocytogenes hly*C484S näher charakterisiert und mit der poren-induzierenden Aktivität von LLO, das aus Bakterienkulturen von *L. monocytogenes* WT isoliert wurde, verglichen werden. Bei dieser Mutante ist das einzige Cystein im LLO-Molekül gegen Serin ausgetauscht, wobei die Position 484 innerhalb des (für CDTXs spezifischen) hoch konservierten Undekapeptids lokalisiert ist. Verschiedene Autoren schreiben diesem Cystein innerhalb des Undekapeptids eine Schlüsselrolle bei der Thiolaktivierung der CDTXs zu. So konnte im Streptolysin nach der Punkt-substitution des Cysteins durch Alanin eine fehlende Sensitivität des Toxins gegen-über Oxidation festgestellt werden (Pinkney et al. 1989). Zwei weitere Vertreter der

CDTX-Gruppe, Pyolysin und Intermedilysin O, die kein Cystein innerhalb des Undekapeptids aufweisen, zeigen keine Thiolaktivierung (Billington et al. 2000).
Zum Vergleich der Toxinaktivität wurden nach dem erarbeiteten Isolationsprotokoll die Überstände aus dem mutierten Bakterienstamm *L. monocytogenes hly*C484S isoliert. Bei der Untersuchung der porenbildenden Eigenschaften zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen Wildtyp- und LLO C484S in folgenden Punkten: Bei beiden Bakterienstämmen waren die toxininduzierten Poren für monovalente Ionen wie Na^+ und K^+ nicht-selektiv permeabel. Identisch waren auch die Häufigkeitsverteilungen der Amplituden der toxininduzierten Porenströme. Beim Vergleich der Temperaturabhängigkeiten fand sich allerdings ein signifikanter Unterschied: Die toxininduzierte porenbildende Aktivität der Mutante *L. monocytogenes hly*C484S war im Vergleich zum Wildtyp bei 21°C in Bezug auf die Schnelligkeit der ersten Porenöffnung mindestens um den Faktor zwei potenter und deutlich weniger temperaturabhängig. Dies zeigt, dass die Aminosäure Cystein in Position 484 des LLO-Moleküls eine Schlüsselfunktion für die poreninduzierende Wirkung besitzt.

Für die signifikant stärkere Porenbildung durch LLO C484S im Vergleich zum Wildtyp-LLO bieten sich folgende Erklärungsmodelle an: Einerseits könnten die eukaryontischen Zellen im Laufe der Evolution „gelernt“ haben, den hoch konservierten Bereich der CDTXs zum eigenen Vorteil (als Schutzmechanismus) zu nutzen. Durch Oxidation der Sulfhydrylgruppe des Cysteins (-SH) könnten sie die porenbildende Aktivität der „angreifenden“ Toxine herabsetzen. Eher wahrscheinlich ist jedoch, dass zwei LLO Moleküle *vor* Kontakt mit der Zellmembran untereinander spontan eine Disulfiddoppelbindung ausbilden und dieses Dimer nicht mehr zum Porenaufbau beitragen kann. Es ist seit Langem bekannt, dass die Ausbildung einer Disulfiddoppelbindung *in vivo* nicht nur enzymatisch, sondern auch spontan möglich ist, was allerdings langsamer vonstatten geht (Saxena & Wetlaufer 1970; Anfinsen 1973). Für PFO (Perfringolysin O, ein weiterer Vertreter der CDTX-Familie) wurde bereits gezeigt, dass das Toxinmolekül zum Zeitpunkt der Membranbindung in Monomer-Form vorliegt und erst später mit weiteren PFO-Monomeren zu einer Pore oligomerisiert (Ramachandran et al. 2004). Die 3D-Kristallstruktur des Undekapeptids im PFO ist bekannt (Rossjohn et al. 1997). Danach bildet die Domäne IV ein

kompaktes „β-Sandwich“ (zwei aufeinander liegende β-Blätter). Das Undekapeptid ist auf eine solche Weise gefaltet, dass der Cysteinrest an der Spitze der Domäne IV zu liegen kommt und die Tryptophanreste eine 3D-Schleife bilden. In dieser nach außen rotierten Lokalisation wäre der Cysteinrest für einen Reaktionspartner zum spontanen Ausbilden einer Doppelbindung sterisch zugänglich. Für LLO und PFO ist auf DNA-Ebene gezeigt worden, dass die beiden CDTXs eine sehr hohe Strukturähnlichkeit aufweisen (Decatur & Portnoy 2000). Die Annahme, dass eine nicht zur Porenbildung fähige Dimerform des LLO existieren könnte, wird durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Dithiothreitol als Disulfiddoppelbindung-spaltendes Reduktionsmittel war tatsächlich in der Lage, die Porenbildung durch LLO deutlich zu verstärken.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte daher nach Substanzen gesucht werden, die ähnlich wie DTT eine oder mehrere Thiolgruppen besitzen und damit eine Reduktion der Sulfhydrylgruppe des einzigen Cysteins im LLO-Molekül hervorrufen könnten. Dabei gelang es, mit dem thiolhaltigen Arzneimittel Captopril ein weiteres „Reduktionsmittel“ zu identifizieren, das die poreninduzierende Potenz von LLO erhöht. Interessanterweise trat dieser potenzierende Effekt bei der LLO-Mutante *hly*C484S, bei der das einzige Cystein im LLO-Molekül durch Serin ersetzt ist, nicht auf. Dies bestärkt die Vermutung, dass der einzige Cysteinrest im LLO-Molekül für den beobachteten potenzierenden „Captoprileffekt“ notwendig ist. Die vorliegenden Ergebnisse lassen annehmen, dass Captopril den klinischen Verlauf einer Listeriose verschlechtern könnte, da LLO mit seiner durch Captopril gesteigerten porenbildenden Potenz die menschliche Zellmembranen stärker schädigen könnte.
Eine weitere Substanz, die im Hinblick auf eine LLO-Aktivierbarkeit durch Reduktion seiner einzigen Sulfhydrylgruppe untersucht wurde, war das in der Tierwelt vorkommende Protein Protamin, das mehrere Cysteinreste besitzt. In dieser Arbeit konnte zunächst elektrophysiologisch gezeigt werden, dass Protamin in Konzentrationen von über 300 nM eine Bildung von Poren in den Membranen der HEK293-Zellen hervorruft. Dieser poreninduzierende Effekt ist für Protamin bereits an Lipidbilayers *indirekt* mit nicht-elektrophysiologischen Methoden untersucht und beschrieben

worden (Johansen et al. 1996). Eine klare Darstellung der Poreninduktion in der Membran einer lebenden eukaryontischen Zelle lieferten jedoch erst die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Die bei einem Membranpotential von -50 mV vorhandene poreninduzierende Wirkung von Protamin verschwindet allerdings, wenn die Zellmembran im Patch-Clamp Experiment auf +40 mV „umpolarisiert“ wird. Damit konnte erstmalig experimentell demonstriert werden, dass das negative Membranpotential der Zelle eine Voraussetzung für die poreninduzierende Wirkung von Protamin ist. Ein möglicher Einfluss der Membranladung auf diesen Eigeneffekt von Protamin ist in der Literatur schon vermutet worden, konnte aber bis jetzt nur indirekt anhand von pH-Wert-Messungen gezeigt werden (Johansen et al. 1997). Neben seiner Fähigkeit, in höheren Konzentrationen selbst Poren zu induzieren, zeigte Protamin jedoch auch einen blockierenden Effekt auf die Porenbildung durch LLO. Dieser Sachverhalt ist recht überraschend, da man aufgrund der Cysteinreste im Protaminmolekül eher eine LLO-reduzierende und somit analog zu den Ergebnissen mit DTT und Captopril eine Erhöhung der poreninduzierenden LLO-Potenz erwarten würde. Einen möglichen Erklärungsansatz für Hemmung der poreninduzierenden LLO-Wirkung durch Protamin bietet der klinisch-pharmakologisch ausgenutzte Effekt des Protamins als Antidot bei einer Heparinüberdosierung bzw. als Zusatz zum NPH(neutrales Protamin-Hagedorn)-Verzögerungsinsulin. So wird das Mucopolysaccharid Heparin durch Bildung eines inaktiven Komplexes mit Protamin neutralisiert; eine verzögerte Freisetzung des Insulins aus dem subkutanen Depot wird durch Bindung an Protamin bewirkt (Daunderer 1993). Einen ähnlichen Wirkmechanismus von Protamin lässt sich auch auf LLO übertragen. Diese Ergebnisse machen Hoffnung, dass Protamin in der Pharmakotherapie der Listeriose als Toxinantidot Anwendung finden könnte, indem es die Membranschädigung humaner Zellen durch LLO reduziert.

Mit Hilfe der herausgearbeiteten Methode zur Isolation toxinhaltiger und bakterienfreier Überstände konnte in den durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Reduktion des einzigen Cysteinrests im LLO-Molekül zu einer Erhöhung der poreninduzierenden Potenz von LLO führt. Als ein solches Reduktionsmittel wurde das Arzneimittel Captopril identifiziert. Dieser ACE

(angiotensin-converting enzyme)-Hemmer ist sehr kostengünstig und findet eine breite klinische Anwendung in der humanen Pharmakotherapie. Auf Basis der Daten der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass die pharmakotherapeutische Anwendung von Captopril während einer Listeriose den klinischen Verlauf der Listeriose verschlechtern könnte. Darüber hinaus existieren noch viele weitere klinisch eingesetzte Substanzen mit Thiolgruppen, für die ebenfalls eine Modulation der porenbildenden Aktivität von LLO angenommen werden darf. Beispiele für solche thiolhaltigen Substanzen sind 5-Thiopyridoxin, Thiopronin, Piroxicam, Thiamazol, Tocopherol, D-Penicillamin, Penicillin und seine Derivate, Vitamin C, Oltipraz, 6-Mercaptopurin und Cephalosporine. Ihre Wirkung auf die LLO-induzierte Porenbildung könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Andererseits konnte Protamin als LLO-Porenblocker identifiziert werden. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich intensiver mit der Protaminwirkung auf die LLO-induzierte Porenbildung und zeigten, dass auch die Invasion von Listerien durch Protamin beeinflusst wird (Bennert 2007).

Damit zeigt die vorliegende Arbeit, dass klinisch genutzte „Thio-Arzneimittel“ einerseits das Potential besitzen, den Verlauf einer Listeriose zu verschlechtern und andererseits auch in der Lage sein könnten, einer Listeriose-Infektion entgegenzuwirken.

5 Zusammenfassung

Das Peptid Listeriolysin O (M_r=58 kD) ist der wichtigste Virulenzfaktor von *L. monocytogenes.* Es ist eines von 23 Mitgliedern aus der Familie der cholesterolabhängigen und thiolaktivierbaren Zytolysine (CDTXs, cholesterol-dependent toxins). Neben der Modulation verschiedener zellulärer Signalkaskaden weist das Toxin Listeriolysin O eine an lebenden, eukaryontischen Zellen elektrophysiologisch messbare poreninduzierende Wirkung auf. Die Porenbildung in der eukaryontischen Zellmembran spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes*.

Zunächst wurde eine Methode etabliert, mit der sich die für die elektrophysiologischen Messungen notwendigen Toxinmengen schnell, einfach und reproduzierbar gewinnen ließen. Mit Hilfe des herausgearbeiteten Isolationsprotokolls wurde die poreninduzierende Kinetik von zwei Listeriolysin O-DNA-Mutanten aus *L. monocytogenes hly*W492A- und *L. monocytogenes hly*C484S-Bakterienkulturen, von denen bis zu diesem Zeitpunkt keine gereinigten Toxinformen existierten, gewonnen und elektrophysiologisch charakterisiert. Erstmalig konnte eindrucksvoll eine Steigerung der poreninduzierenden Bildung von LLO mit Steigerung der Temperatur (Q_{10}-Wert von 3-4) demonstriert werden. Die nicht poreninduzierende LLO-DNA Mutante *hly*W492A zeigte auch bei einer Messtemperatur von 37°C keine Poreninduktion. Für die LLO-DNA-Mutante *hly*C484S konnte gezeigt werden, dass diese Toxinform eine bis um den Faktor 10 höhere poreninduzierende Potenz aufweist als LLO-WT. Diese Untersuchungen veranschaulichten die große Rolle des einzigen Cysteinrests in der Primärstruktur des LLO-Moleküls, die in der Literatur als Thiolaktivierung bekannt ist.

Für das thiolhaltige Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) konnte gezeigt werden, dass es die poreninduzierende Potenz von LLO um den Faktor 3,5 steigert. Ebenfalls konnte eine Steigerung der porenbildenden Potenz von LLO durch den thiolhaltigen ACE-Hemmer Captopril demonstriert werden. Überraschenderweise wurde Protamin, eine weitere thiolhaltige Substanz, als Blocker der LLO-induzierten Poren identifiziert. Für Protamin konnte erstmalig elektrophysiologisch gezeigt werden, dass diese Substanz eine eigene poreninduzierende Wirkung aufweist und dass dieser Effekt stark vom Membranhaltepotential der Zelle abhängt.

6 Summary

The peptide toxin listeriolysin O (LLO; Mw = 58 kDa) is an essential virulence factor of the gram-positive, facultative intracellular bacterium *L. monocytogenes*. It is one of 23 members of the family of cholesterol-dependent and thiol-activated cytolysins (= CDTXs, cholesterol-dependent toxins). Further to its ability to modulate various cellular signalling events, LLO forms pores in the plasma membrane of viable eukaryotic cells, which can be detected electrophysiologically. The pore forming ability of LLO plays a key role in the pathogenicity of *L. monocytogenes*.

The present work established a method that allows rapid, easy and reproducible preparation of LLO amounts sufficient for a number of electrophysiological measurements. Due to this preparation method it became possible to characterize the kinetics of pore formation and further properties of two LLO mutants from *L. monocytogenes hly*W492A and *hly*C484S, which were not available as purified toxins. For the first time it was demonstrated that the pore formation by LLO strongly depends on temperature and is significantly increased at physiological body temperature compared to room temperature. In contrast, no increase in pore-forming activity by elevation of the temperature to 37 °C was observed for the LLO mutant *hly*W492A, which already has a strongly reduced pore forming potency at room temperature, compared to wild-type LLO. On the other hand, an about tenfold increase in pore forming activity compared to wild-type LLO was found for the LLO mutant *hly*C484S, relating to the latency between toxin application and the registration of the first pore. This showed that the single cysteine residue in the LLO molecule attenuates pore formation, possibly by provoking LLO molecules to accumulate as dimers with reduced pore forming potency.

The phenomenon of thiol activation of LLO was also investigated in the present work. The thiol-containing reducing agent dithiothreitol led to a marked increase in pore formation by LLO. This was also observed for the thiol-containing angiotensin-converting-enzyme inhibitor captopril. In contrast, protamine, a thiol-containing peptide, turned out to be a blocker of LLO-induced pores. In addition, it was demonstrated for the first time that protamine itself in higher concentrations can induce pores. This effect strongly depends on the membrane holding potential.

7 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995) Protein-Struktur: 128-149. In: *Molekularbiologie der Zelle. (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim*.

Alouf, J.E. (1999) Introduction to the family of the structurally related cholesterol-binding cytolysins (`sulfhydryl-activated´ toxins) : 443-456. In: *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins.(Alouf J. E. & Freer J. H., ed.), Academic Press London*.

Alouf, J. E. (2000) Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* **290**: 351-356.

Alouf, J. E. and Geoffroy, C. (1984) Structure activity relationships in sulfhydryl-activated toxins: 165-171 In: *Bacterial Protein Toxins. (Alouf, J. E., Fehrenbach, F. L., Freer, J. H., Jeliaszewicz, J., ed.), Academic Press London*.

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.

Aureli, P., Fioruci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S. (2000) An outbreak of febrile gasroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* **342**: 1236-1241.

Barry, P. H. and 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.

Beedle, A. M., Hamid, J., Zamponi, G. W. (2002) Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J Membr Biol* **187**: 225-238.

Bennert, A. (2007) Charakterisierung und Modulation der porenbildenden, hämolytischen und Invasions-vermittelnden Wirkung von Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes*. *Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Giessen.* URL: http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4800/pdf/BennertAnke-2007-07-03.pdf.

Berjukow, S., Doring, F., Froschmayr, M., Grabner, M., Glossmann, H., Hering, S. (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Br J Pharmacol* **118**: 748-754.

Bhakdi, S., Klonisch, T., Nuber, P., Fischer, W. (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* **59**: 4614–4620.

Bille, J. (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak: 71-74. In: *Foodborne listeriosis. (Miller, A. J., Smith, J. L., Somkuti, G. A., ed.), Elsevier, New York, N.Y.*

Billington, S. J., Jost, B. H., Songer, J. G. (2000) Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 197-205.

Bittenbring, J.T. (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin-induzierten Membranporen. *Inauguraldissertation zur Erlangung eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.* URL: http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/3137/ oder URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-31374.

Bryan-Lluka, L. J. and Bonisch, H. (1997) Lanthanides inhibit the human noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **355**: 699-706.

Butler, R. S. (2005) Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* und chromosomaler Punktmutanten induzierten Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen. *Inauguraldissertation zur Erlangung eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.* URL: http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2121/ oder URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-21212.

Butterworth, J., Lin, Y.A., Prielipp, R., Bennett, J., James, R. (2002) The pharmokinetics and cardiovascular effects of a single intravenous dose of protamine in normal volunteers. *Anesth Analg* **94**: 514-522.

Cai, Z. and Sheppard, D. N. (2002) Biphasic effects of the fluorescein derivate eosin Y on the human CFTR Cl^- channel. *J Physiol* **544**: 201.

Carafoli, E. (1991) The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu Rev Physiol* **53**: 531-547.

Chakraborty, T., Hain, T., Domann, E. (2000) Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* **290**: 167-174.

Chernysh, I. H. (1999) Mechanism of eosin Y action of activity of solubilized Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase. *Ukr Biokhim Zh* **71**: 123-126.

Chernysh, I. H. and Slinchenko, N. M. (1999) Effect of eosin Y on Ca^{2+}-dependent activity of Ca^{2+}-, Mg^{2+}-ATPase in smooth muscle. *Ukr Biokhim Zh* **71**: 86-89.

Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. *Biochemistry* **3**: 480-482.

Coconnier, M. H., Dlissi, E., Robard, M., Laboisse, C. L., Gaillard, J. L., Servin, A. L. (1998) *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of Listeriolysin O. *Infect Immun* **66**: 3673-3681.

Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Berche, P. (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **57**: 3629-3636.

Cossart, P. and Sansonetti, P. J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.

Daniels, J. J. D., Autenrieht, I. B., Goebel, W. (2000) Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol Lett* **190**: 323-328.

Darji, A,. Chakraborty, T., Wehland, J., Weiss, S. (1995) Listeriolysin generates a route for presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex class I. *Eur J Immunol* **25**: 2967-2971.

Daunderer, M. (1993) Gegengifte. In: *Klinische Toxikologie: Giftinformation, Giftnachweis, Vergiftungstherapie, Ecomed Verlag Landsberg, Lech, Losebl.-Ausg., Band 2.*

Decatur, A. L. and Portnoy, D. A. (2000) A PEST-like sequence in Listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**: 992-995.

Domann, E. (1992) Molekulargenetische Untersuchungen der Virulenzfaktoren Phospholipase (PlcA), Listeriolysin (LisA), Protease (Mpl) und Aktin-Bindung (ActA) und deren koordinierte Regulation durch den positiven Regulatorfaktor PrfA von *Listeria monocytogenes*. Dissertation, Würzburg.

Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W., Chakraborty, T. (1991) Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the Listeriolysin gene. *Infect Immun* **59**: 65-72.

Dramsi, S. and Cossart, P. (2003) Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human hep-2 epithelial cell line. *Infect Immun* **71**: 3614-3618.

Dreyer, F., Maric, K., Lutz, F. (1990) The use of patch clamp technique for the study of the mode of action of bacterial toxins. *Bacterial Protein Toxins*, *Zbl Bakt Suppl* **19**: 227-234.

Edelson, B.T., Cossart, P., Unanue, E.R. (1999) Cutting edge: Paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol* **163**: 4087-4090.

Fegeler, W. and Böcker, W. (2000) Infektionen durch grampositive Stäbchenbakterien: 1076. In: *Pathologie. (Boecker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U.), Urban & Fischer Verlag München, Jena*.

Ferreira, J., Tapia, G., Videla, L. A. (1998) Effects of the Kupffer cell inactivator gadolinium chloride on rat liver oxygen uptake and content of mitochondrial cytochromes. *FEBS Lett* **426**: 263-265.

Fleming, D. W., Cochi, M. D., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V., Reingold, A. L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* **312**: 404-407.

Gekle, M.D. (2005) Renal Tubule Albumin Transport. *Annu Rev Physiol* **67**: 573-594.

Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf J. E., Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated haemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.

Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J. L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.-A., Alouf, J. E., Berche, P. (1991) Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **59**: 2382-2388.

Goldfine, H. and Wadsworth, S. J. (2002) Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **4**: 1335-1343.

Gonzalez-Zorn, B., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Ripio, M. T., Vega, Y., Novella, S., Vazquez-Boland, J.-A. (1999) The *smc*L gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol* **33**: 510-523.

Gonzalez-Zorn, B., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Ripio, M. T., Vega, Y., Novella, S., Rodriguez, A., Chico, I., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A. (2000) SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **290**: 369-374.

Gregory, S. H. and Wing, E. J. (2002) Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol* **72**: 239-248.

Guzman, C. A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S. (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **20**: 119-126.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**: 85-100.

Hansen, L. T., Austin, J. W., Gill, T. A. (2001) Antibacterial effect of protamine in combination with EDTA and refrigeration. *Int J Food Microbiol* **66**: 149-161.

Hirsch, J. G. (1958) Bactericidal action of histone. *J Exp Med* **108**: 925-944.

Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M., Normark, S. (2002) Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **3**: 1033-1040.

Huettner, J. E., Stack, E., Wilding, T. J. (1998) Antagonism of neuronal kainate receptors by lanthanum and gadolinium. *Neuropharmacology* **37**: 1239-1247.

Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A., Ravasi, T. (2002) The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* **72**: 621-627.

Islam, N. M. D., Itakura, T., Motohiro, T. (1984) Antibacterial spectra and minimum inhibition concentration of clupeine and salmine. *Bull Jpn Soc Sci Fish* **50**: 1705-1708.

Jacobs, T., Darji, A., Weiss, S., Chakraborty, T. (1999) Listeriolysin, the thiol-activated haemolysin of *Listeria monocytogenes*: 511-521. In:*The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins (Alouf, J. E. & Freer, J. H., ed.), Academic Press London.*

Jaradat, Z. W. and Bhunia, A. K. (2002) Glucose and nutrient concentrations affect the expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4876-4883.

Johansen, C., Gill, T., Gram, L. (1995) Antibacterial effect of protamine assayed by impedimetry. *J Appl Bacteriol* **78**: 297-303.

Johansen, C., Gill, T., Gram, L. (1996) Changes in the cell morphology of *Listeria monocytogenes* and *Shewanella putrefaciens* by the acton of protamine. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1058-1064.

Johansen, C., Verheul, A., Gram, L., Abee, T. (1997) Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1155-1159.

Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., Berche, P. (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NK-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**: 1709-1722.

Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T., Lehrer, R. I. (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependet ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 210-214.

Koschinski, A. (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. *Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen.*

Krull, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., Suttorp, N. (1997) *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immuniol* **159**: 1970-1976.

Leimeister-Wachter, M. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**: 947-952.

Lewis, J. D., Song, Y., Jong, M. E. D., Bagha, S. M., Ausio, J. (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**: 473-482.

Lima, D. P. (1999) Synthesis of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: an important class of antihypertensive drugs. *Quimica Nova* **22**: 375-381.

Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A., Broome, C. V. (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med* **319**: 823-828.

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.

Ma, J. Y. and Narahashi, T. (1993) Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated chloride channel currents by lanthanides in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **13**: 4872-4879.

Mackaness, G. B. (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**: 381-406.

Marks, P. W. and Maxfield, F. R. (1991) Preparation of solution with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid. *Anal Biochem* **193**: 61-67.

McLauchlin, J. (1991) Epidemiology of listeriosis in Britain: 38-47. In: *Proceedings of the International Conference on Listeria and Food Safety. Aseptic Processing Association. (Amgar, A., ed.), Laval, France*.

McLauchlin, J. and Low, J. C. (1994) Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet Rec* **135**: 615-617.

McLauchlin, J., Greenwood, M. H., Pini, P. N. (1990) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *Int J Food Microbiol* **10**: 255-262.

McLauchlin, J., Hall, S. M., Velani, S. K., Gilbert, R. J. (1991) Human listeriosis and pate: a possible association. *Br Med J* **303**: 773-775.

Mengaud, J., Chenevert, J., Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Cossart, P. (1987) Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* **56**: 766-772.

Metchnikoff, E. (1892) The struggle for existence between parts of the animal organism: 207-216. In: *The Evolutionary Biology Papers of Elie Metchnikoff (Gourko, H., Williamson, D. I., Tauber, A. I., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.

Michel, E., Reich, K. A., Favier, R., Berche, P., Cossart, P. (1990) Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol Microbiol* **4**: 2167-2178.

Milon, G. (1997) *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infectious and pathogenic processes controllable by regulated protective immune responses. *Immunol Rev* **158**: 37-46.

Murray, E. G. D., Webb, R. A., Swann, M. B. R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed baccilus: *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol* **29**: 407-439.

Narahashi, T., Ma, J. Y., Arakawa, O., Reuveny, E., Nakahiro, M. (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol* **14**: 599-621.

Neher, E. (1992) Correction for liquid juncton potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**: 121-131.

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.

Ordway, J. R., Petrou, S., Kirber, M. T., Walsh, J. V. Jr., Singer, J. J. (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K^+ channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol* **484**: 331-337.

Palmer, M. (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**: 1681-1689.

Petrou, S., Ordway, R. W., Kirber, M.T., Dopico, A. M., Hamilton, J. A., Walsh, J. V. Jr., Singer, J. J. (1995) Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**: 173-178.

Pinkney, M., Beachey, E., Kehoe, M. (1989) The thiol-activated toxin Streprolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect Immun* **57**: 2553-2558.

Pirie, J. H. H. (1927) A new disease of veld rodents, Tiger River disease. *Publ S Afr Inst Med Res* **3**: 163-186.

Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., Berche, P. (1993) The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **61**: 1576-1580.

Ramachandran, R., Tweten, R. K., Johnson, A. E. (2004) Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit β–strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 697-705.

Rangel-Gonzalez, F. J., Garcia- Colunga, J., Miledi, R. (2002) Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by La^{3+}. *Eur J Pharmacol* **441**: 15-21.

Repp, H., Pamukci, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., Dreyer, F. (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca^{2+}-permeable pores leading to intracellular Ca^{2+} oscillations. *Cell Microbiol* **4**: 483-491.

Revenu, C., Athman, R., Robine, S., Louvard, D. (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1-12.

Rocourt, J. (1996) Risk factors for listeriosis. *Food Control* **7**: 195-202.

Rosenberger, C. M. and Finlay, B. B. (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 385-396.

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.

Rothschild, M. A., Oratz, M., Schreiber, S. S. (1975) Regulation of albumin metabolism. *Annu Rev Med* **26**: 91-104.

Saxena, V. P. and Wetlaufer, D. B. (1970) Formation of three-dimensional structure in proteins. I- Rapid nonenzymic reactivation of reduced lyzozyme. *Biochemistry* **9**: 5015-5022.

Schlech III, W. F. (2000) Foodborne Listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**: 770-775.

Schuchat, A. and Broome, C. V. (2003) Infektionen mit *Listeria monocytogenes*: 1009-1011. In: *Harrisons Innere Medizin. (Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttorp, N., Hrsg.), ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin, Leiben*.

Sibelius, U., Chakraborty, T., Kroegel, B., Wolf, J., Rose, F., Schmidt, R., Wehland, J., Seeger, W., Grimminger, F. (1996) The listerial exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergize to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J Immunol* **157**: 4055-4060.

Slinchenko, N. N., Bratkova, N. F., Kosterin, S. A., Zimina, V. P., Chernysh, I. G. (1998) Effects of eosin Y on the catalytic and functional activities of Mg^{2+}, ATP-dependent calcium pump of smooth muscle cell plasma membrane. *Biochemistry (Mosc)* **63**: 685-690.

Slinchenko, N. M., Chernysh, I. H., Kosterin, S. O. (2003) Effect of eosin Y on Ca^{2+}-, Mg^{2+}-ATPase of the smooth muscle sacrolemma. *Ukr Biokhim Zh* **75**: 50-53.

Smith, K. J., Skelton, H. G. 3rd, Angritt, P., James, W. D., Yeager, J., Wagner, K. (1991) Cutaneous lesions of listeriosis in a newborn. *J Cutan Pathol* **18**: 474-476.

Swanson, J. A. and Baer, S. C. (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* **5**: 89-93.

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.

Uyttendaele, M. and Debevere, J. (1994) Evaluation of the antimicrobial activity of protamine. *Food Microbiol* **11**: 417-427.

Vazquez-Boland, J. A., Dominguez, L., Rodriguez-Ferri, E. F., Fernandez-Garayzabal, J. F., Suarez, G. (1989) Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiol Letters* **65**: 95-100.

Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P.,Chakraborty, T., Dominquez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B.,Wehland J., Kreft, J. (2001a) *Listeria* pathogenesis and molecular virulens determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.

Vazquez-Boland, J. A., Dominguez-Bernal, G., Gonzalez-Zorn, B., Kreft, J., Goebel, W. (2001b) Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* **3**: 571-584.

Watanabe, S. and Sato, T. (1996) Effects of free fatty acids on the binding of bovine and human serum albumin with steroids hormones. *Biochem Biophys Acta* **1289**: 385-396.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer für die Überlassung des Promotionsthemas und seine Unterstützung während der Vorbereitung dieser Arbeit - insbesondere beim Korrekturlesen - bedanken. Seine besondere Art im Umgang mit Menschen und die Fähigkeit zu motivieren waren mir eine große Lehre.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Koschinski dafür, dass er mir das “Patchen” beigebracht hat. Er war für uns Doktoranden buchstäblich immer sofort da, wenn man Hilfe brauchte - dafür ein ganz besonderer Dank! Herrn Dr. Holger Repp danke ich für seine brillianten Forschungsideen und Vorschläge sowie für die Hilfe beim Verfassen dieser schriftlichen Arbeit.

Danke an Frau Christiane Zibuschka, von der ich viel über Zellkulturen lernen konnte. Ohne sie hätten meine HEK-Zellen mich nicht überlebt.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und für die interessante Führung im Sanofi-Aventis Labor danke ich Prof. Dr. Brockmeier.

Allen Mitdoktoranden und Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundschaftliche Stimmung, für die gegenseitige Unterstützung, für tolle gemeinsame Ausflüge und einfach für ihr Dasein in schwierigen Situationen.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Mutter Nina Kaschinski, die mir das Medizinstudium erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stanislav Kaschinski, geb. Kovechnikov
geboren am 13. Mai 1975 in Andischan/Russland
deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung

09/1982 - 04/1992	Gagarin-Schule Nr. 14, Moskau/Russland
06/1992 - 06/1997	Ernst-Kalkuhl-Gymnasium Bonn, Abschluss Abitur

Hochschulstudium

04/1999 - 10/2005	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
10/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Arzt

Dissertation

seit 10/2002	Doktorand am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Berufstätigkeit

01/2006 - 09/2007	Assistenzarzt im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie im PIUS-Hospital Oldenburg (Oldb)
seit 10/2007	Assistenzarzt im Institut für Radiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, 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 oder nicht veröffentlichen 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.

Stanislav Kaschinski