

**Pharmakologische Modulation der durch α -Hämolyisin von
Escherichia coli an humanen embryonalen Nierenzellen
gebildeten Poren**

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

vorgelegt von Baris Ünver
aus Gießen

Gießen 2006

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Gf. Direktor: Prof. Dr. F. Dreyer

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 21.05.2007

Meinen Eltern und meinem Bruder

„Das schönste Erlebnis ist die Begegnung mit dem Geheimnisvollen. Sie ist der Ursprung jeder wahren Kunst und Wissenschaft. Wer nie diese Erfahrung gemacht hat, wer keiner Begeisterung fähig ist und nicht starr vor Staunen dastehen kann, ist so gut wie tot: seine Augen sind geschlossen.“

Albert Einstein (1879 - 1955)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Escherichia coli</i>	1
1.2	α -Hämolysin von <i>Escherichia coli</i>	2
1.3	Aufgabenstellung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Zellkultivierung	7
2.2	Elektrophysiologische Messungen	8
2.2.1	Aufbau des Patch-Clamp Messstandes	8
2.2.2	Patchpipetten-Herstellung	10
2.2.3	Badperfusion	10
2.2.4	Verwendete Ionenlösungen	11
2.2.5	Whole-Cell-Messkonfiguration	12
2.2.6	Korrektur der Liquid-Junction Potentiale	13
2.3	α -Hämolysin und Mutanten	14
2.4	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	14
2.5	Substanzliste	15
3	Ergebnisse	17
3.1	Porenbildung durch α -Hämolysin	17
3.2	Abhängigkeit der Porenbildung von der α -Hämolysin-Konzentration	19
3.3	Elementare Porenströme	22
3.4	Einfluss verschiedener α -Hämolysin Punktmutationen auf die Porenbildung	23

3.5	Reversibilität der α -Hämolysin-Porenbildung	27
3.5.1	Spülung mit E ₁ -Lösung	27
3.5.2	Spülung mit calciumfreier E _{1Ba} -Lösung	28
3.5.3	Einfluss zytoskelettaler Komponenten	30
3.6	Kinase-Inhibitoren	34
3.7	Blockade der α -Hämolysin-Porenströme	35
3.7.1	Farbstoffe	35
3.7.2	Dihydropyridine	36
3.7.3	Lanthanoide	36
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	50
	Danksagung	56
	Lebenslauf	57

1 Einleitung

1.1 *Escherichia coli*

Theodor Escherich entdeckte 1885 das später nach ihm benannte Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als erstes spezifisches Darmbakterium. *E. coli* ist ein gramnegatives, sporenloses, peritrich begeißeltes und deswegen bewegliches Stäbchenbakterium. Neben *E. coli* existieren noch drei weitere Escherichia-Spezies (*E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris*). Im Gegensatz zu *E. coli* werden diese aber nur gelegentlich aus menschlichem Untersuchungsmaterial isoliert. *E. coli* ist aufgrund seines regelmäßigen Vorkommens im Darm von Warmblütern ein klassischer Fäkalindikator. Sein Nachweis in Nahrungsmitteln oder Trinkwasser signalisiert eine Verunreinigung mit tierischen oder menschlichen Exkrementen und weist auf ein mögliches Vorhandensein von anderen Erregern (Viren, Bakterien, Protozoen, Würmern) hin (Hof 2000).

E. coli ist der häufigste Erreger bakterieller Infekte (Kayser 1998). Neugeborene können eine Meningitis entwickeln, wenn sie während der Geburt mit *E. coli* der Mutter infiziert werden. Bei Kindern oder Frauen sind die Harnwege sehr häufig von einer *E.coli*-Infektion betroffen. Es kommt zur Urethritis, Zystitis und Pyelonephritis. Ausgangspunkt sind Schmierinfektionen aus der Analregion mit Kontamination des Ostium urethrae. Die Begeißelung ermöglicht es den Bakterien bis in die Blase vorzudringen. Da Frauen eine kürzere Urethra besitzen, leiden sie häufiger an einer Zystitis als Männer. Einige *E. coli* Stämme besitzen P-Fimbrien (auch PAP = **p**yelonephritis **a**ssoziierte **P**ili genannt), mit denen sie sich spezifisch an Epithelzellen der harnableitenden Wege anhaften können. Durch den engen Kontakt, der so zwischen Bakterium und Zellmembran der Epithelzelle zustande kommt, können Bakterientoxine, wie z.B. Hämolsine, die Zellen der Blasenwand schädigen und so die Invasion der Bakterien in diese vorbereiten. *E. coli* ist auch an intestinalen Infektionen beteiligt und kann eine Appendizitis, Peritonitis, Cholangitis und Cholezystitis auslösen. Intestinale Infektionen mit *E. coli* sind häufig durch massive Diarrhöen mit ihren individuellen Folgeerscheinungen gekennzeichnet (Hof 2000).

Extraintestinale *E.coli*-Infektionen können, nach Austestung der Erregerempfindlichkeit, nur mit gezielter Antibiotikatherapie zur Ausheilung gebracht werden. Zur Therapie extraintestinaler *E.coli*-Infektion eignen sich Breitspektrum-penicilline wie z.B. Amoxicillin. Da eine Reihe von *E. coli* Stämmen β -Laktamase bilden können, ist häufig eine Kombination mit einem β -Laktamase-Inhibitor wie, z.B. Clavulansäure notwendig. Harnwegsinfekte werden auch mit einer Kombination aus einem Sulfonamid und Trimethoprim (Cotrimoxazol) erfolgreich behandelt. Bei intestinalen Infektionen steht die Bekämpfung der durch die Diarrhoe bedingten Wasser- und Elektrolytverluste im Vordergrund (Aktories 2005).

1.2 α -Hämolysin von *Escherichia coli*

Zytolysine bzw. Hämolysine sind wichtige Virulenzfaktoren vieler pathogener Bakterien. Die meisten bekannten Zytolysine gehören zu den porenbildenden Proteinen. Diese Toxine zerstören Zellen, indem sie deren Zellmembranen schädigen. Während hohe Konzentrationen dieser Zytolysine zu einer schnellen Zellyse führen, können sublytische Konzentrationen eine Reihe von sekundären Zellreaktionen in den Zielzellen auslösen - so beispielsweise eine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Bakterielle Zytolysine repräsentieren eine heterogene Gruppe von Exotoxinen. Mehrere strukturell und funktionell ähnliche Familien konnten bis heute identifiziert werden. Das von *E. coli* produzierte Zytolysin ist das α -Hämolysin (α Hly). Es ist ein Mitglied der RTX (**R**epeats in **T**oxin) Familie und wird meist von uropathogenen *E. coli* Stämmen produziert (Hacker et al. 1983; Smith & Huggins 1985). Jüngere Studien zeigen jedoch, dass α -Hämolysin (α Hly) auch bei enteropathogenen *E. coli* Stämmen eine Rolle spielt (Elliott et al. 1998).

RTX-Toxine besitzen eine Reihe typischer Eigenschaften (Alouf & Freer 1999). Sie werden als inaktive Proteine mit einer relativen Molmasse von 100 bis 120 kDa synthetisiert. Diese Proteine besitzen als charakteristisches Merkmal am C-terminalen Ende eine hintereinander geschaltete, sich wiederholende Sequenz

von Glycin- und Aspartat-reichen Domänen. RTX-Toxine werden posttranslational von Zytoplasma-Proteinen aktiviert. Die Sekretion von RTX-Toxinen geschieht über Typ-I Sekretion. An der Sekretion sind drei verschiedene Proteine beteiligt. Das ABC-Protein (**A**TP-**B**inding **C**assette), das MF-Protein (**M**embrane **F**usion Proteins) und das OM-Protein (**O**uter **M**embrane Protein) bilden zusammen einen Kanal, über den das Toxin in einem Schritt Zytoplasmamembran und äußere Membran passieren kann. Die Aktivität von RTX-Toxinen ist calciumabhängig. Nach Sekretion müssen sie extrazellulär Calcium binden, um aktiviert zu werden (Alouf & Freer 1999).

Die RTX-Familie umfaßt eine größere Anzahl von Toxinen (Alouf & Freer 1999). In Tabelle 1 sind die bekannten RTX-Toxine aufgeführt.

Tabelle 1: Mitglieder der RTX-Toxin Familie (Alouf & Freer 1999)	
Bakterium	Toxin
<i>Escherichia coli</i>	α -Hämolysin (α Hly) EHEC-Hämolysin (EHEC-Hly,EhxA) EaggEC Exotoxin
<i>Proteus vulgaris</i>	Hämolysin
<i>Morganella morganii</i>	Hämolysin
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Leucotoxin (Lkta)
<i>Pasteurella haemolytica-like</i>	Leucotoxin (Pllkta)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApxI (Hämolysin) ApxII (Hämolysin) ApxIII (Cytotoxin)
<i>Actinobacillus suis</i>	Hämolysin (AshA)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Leucotoxin (LtxA)
<i>Vibrio cholerae</i>	Zytotoxin (RtxA)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenylate cyclase toxin (CyaA)
<i>Moraxella bovis</i>	Hämolysin
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hämolysin

α -Hämolysin (α Hly) von *E. coli* repräsentiert den Prototypen der RTX-Familie und wird von vier Strukturgenen bestimmt, welche an einem Operon angeordnet sind.

Es sind die Strukturgene hlyA, hlyB, hlyC und hlyD (Felmlee et al. 1985). Sie codieren für Proteine mit einer relativen Molmasse von 20, 110, 80 und 55 kDa. Das hlyA Gen codiert für das inaktive Protoxin des α -Hämolyisin. HlyC codiert für das zytoplasmatische Protein, welches für die Überführung vom inaktiven Pro- α -Hämolyisin in die hämolytische Form des Toxins notwendig ist. Dies geschieht durch Fettsäure-Acylierung an den Lysin-Resten Lys564 und Lys690 (Stanley et al. 1994; Ludwig et al. 1996; Stanley et al. 1998). Die Gene hlyB und hlyD sind für die Codierung der Transportproteine an der inneren Zytoplasmamembran von *E. coli* zuständig. Diese Transporter sind für die Sekretion von α -Hämolyisin (α Hly) verantwortlich (Goebel & Hedgpeth 1982; Wagner et al. 1983).

Das α -Hämolyisin-Protein besteht aus 1024 Aminosäuren (Menestrina 2003). Man konnte verschiedene funktionelle Regionen identifizieren. Dazu gehört ein Sekretionssignal aus 50 bis 60 Aminosäuren, das notwendig ist, damit Transporter das α -Hämolyisin-Protein erkennen. Dieses befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins (Jarchau et al. 1994; Kenny et al. 1994). Zusätzlich existiert auf der C-terminalen Hälfte des Proteins eine Calcium-bindende Region. Die Bindung von Calcium an diese Region und die daraus resultierende Konformationsänderung des α -Hämolyisin soll wiederum erst die Bindung des Toxins an die Membran der Zielzelle erlauben (Boehm et al. 1990a,b). Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich die porenbildende Domäne. Sie besteht aus vier hydrophoben α -Helices (Stanley et al. 1998).

α -Hämolyisin (α Hly) interagiert in verschiedenen Schritten mit der eukaryonten Zellmembran. Das Binden an die Zellmembran und die Membraninsertion des α -Hämolyisins (α Hly) sind zwei separate Schritte (Bauer & Welch 1996). Der Übergang von der membranbindenden in die membraninsertierende Form des α -Hämolyisin-Proteins geht mit einer Konformationsänderung einher (Moayeri & Welch 1997). Ob α -Hämolyisin (α Hly) spezifisch an Rezeptoren an der Zelloberfläche oder unspezifisch bindet ist noch nicht eindeutig geklärt. Lally et al. (1997) vermuten, dass LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), ein Mitglied der β 2-Integrin Familie, als Rezeptor für das α -Hämolyisin (α Hly) von *E. coli* dient. Die Insertion des α -Hämolyisin (α Hly) in die Zellmembran führt zu Bildung einer transmembranen Pore, die zur Zelllyse führen kann (Alouf & Freer

1999). Ob α -Hämolysin-Poren durch Monomere oder Oligomere geformt werden, ist noch nicht eindeutig geklärt (Bhakdi et al. 1986; Benz et al. 1989). Erythrozyten, die durch hohe Konzentrationen von α -Hämolysin (α Hly) lysiert wurden, weisen keine elektronenmikroskopisch sichtbaren Poren auf.

Die pathophysiologische Bedeutung von α -Hämolysin (α Hly) bei extraintestinalen Infektionen durch *E. coli* ist vielschichtig. α -Hämolysin (α Hly) lysiert Erythrozyten von sehr vielen Spezien. Ferner hat es eine hohe zytotoxische und zytolytische Wirkung bei einer großen Anzahl von kernhaltigen Zellarten. Insbesondere führt es zur Lyse von Immunzellen wie mehrsegmentkernigen Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten (Gadeberg & Orskov 1984; Bhakdi et al. 1989; Bhakdi et al. 1990). Außerdem ist α -Hämolysin (α Hly) in der Lage Gewebszellen zu zerstören (Moblely et al. 1990). Die Ausbreitung einer *E.coli*-Infektion wird durch die Wirkung von α -Hämolysin (α Hly) auf verschiedene Zelltypen gefördert. Das durch die Hämolyse freigesetzte Eisen fördert zusätzlich das Bakterienwachstum. Neben der durch hohe Toxinkonzentrationen ausgelösten Zytolyse verursachen sublytische Konzentrationen von α -Hämolysin (α Hly) ein großes Spektrum an sekundären Reaktionen der Zielzellen. α -Hämolysin (α Hly) induziert die Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren in Leukozyten und Thrombozyten (Konig et al. 1990; Grimminger et al. 1991) und stimuliert die Freisetzung von Interleukin-1 aus Monozyten und anderen Zellen (Bhakdi et al. 1990). In Endothelzellen wird durch sublytische α -Hämolysin-Konzentrationen sowohl der Arachidonsäure-Stoffwechsel als auch die Produktion von vasodilatierenden Substanzen gefördert (Suttorp et al. 1990; Grimminger et al. 1997). Erst in jüngster Zeit gezeigte, wichtige sekundäre Zellreaktionen auf sublytische α -Hämolysin-Konzentrationen sind der Calcium-Influx und intrazelluläre Calcium-Oszillationen in Nierenzellen (Uhlen et al. 2000). In Säugertierzellen wird Calcium als universeller „Second Messenger“ genutzt. Durch intrazelluläres Calcium werden Zellmechanismen wie Transmitterfreisetzung, Muskelkontraktion, Metabolismus, Proliferation und Apoptose gesteuert. Der Verlauf der intrazellulären Calcium-Konzentration entscheidet darüber, ob die Zelle weiterlebt oder stirbt (Berridge et al. 1998).

1.3 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die porenbildende Wirkung von α -Hämolyisin (α Hly) an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) mittels Patch-Clamp Technik elektrophysiologisch charakterisiert werden. Diese Zelllinie wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich bei der Charakterisierung der durch die cholesterolabhängigen Zytolysine Listeriolysin (LLO) und Pneumolysin (PLY) hervorgerufenen Poren eingesetzt. HEK293-Zellen besitzen eine sehr geringe endogene Ionenkanalaktivität und sind aus diesem Grund gut für Experimente geeignet, um elektrophysiologisch eine Porenbildung durch Toxine zu untersuchen.

Es sollte zunächst die Porenbildung durch α -Hämolyisin (α Hly) in Abhängigkeit von der eingesetzten α -Hämolyisin-Konzentration untersucht und anschließend eine Amplitudenverteilung der Porenströme erstellt werden. Mit Hilfe von *E. coli* Stämmen, die genetisch verändertes α -Hämolyisin (α Hly) exprimieren, sollte geklärt werden, welche Teile des Toxinmoleküls für die Porenbildung essentiell sind und ob diese Mutanten bei der Porenbildung eventuell mit dem Wildtyp des Toxins interagieren können.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Porenbildung ein reversibler Vorgang ist und ob eine Abhängigkeit vom extrazellulären Calcium besteht. Von Interesse war auch, ob die Porenbildung bei den betroffenen Zellen Reparaturmechanismen auslöst. Dazu sollten Versuche mit Inhibitoren des Zytoskeletts und mit Inhibitoren zellulärer Kinasen durchgeführt werden. Eine weitere wichtige Frage dieser Arbeit war die mögliche Blockierbarkeit der α -Hämolyisin-Poren durch verschiedene Substanzen, wobei auf in der Arbeitsgruppe bereits vorliegenden Ergebnisse zur Blockade der durch Listeriolysin (LLO) oder Pneumolysin (PLY) induzierten Poren aufgebaut werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultivierung

Für die Experimente wurden HEK293-Zellen (**H**uman **E**mryonic **K**idney) eingesetzt. Diese wurden in einem Inkubator (Begasungsbrutschrank, Fa Heraeus, Hanau) bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und in einer 94% Luft/ 6 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert und ein Mediumwechsel vorgenommen. Dazu wurde das Kulturmedium aus der Petrischale (Ø 94 mm , Fa. Greiner, Nürtingen) abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Dieses Nährmedium bestand aus einer 1:1-Mischung von DMEM (**D**ulbecco **m**odified **e**agle`s **m**edium) und HAM`s F12-Medium sowie 10 % FKS (fötales **K**älberserum) und 2 mM L-Glutamin. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS (**P**hosphat **b**uffered **s**aline) gewaschen und anschließend mit 5 ml trypsinhaltiger PBS-Lösung (0,05 % w/v) versetzt, um eine Ablösung der Zellen zu erreichen. Danach wurde die trypsinhaltige Lösung wieder abgesaugt und die Zellen mit Nährmedium von der Petrischale gelöst. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen in eine 10 ml Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde je nach Zelldichte in einer 1 : 5 bzw. 1 : 10 Verdünnung auf zwei Petrischalen verteilt. Zur Vorbereitung für die Patch-Clamp Experimente wurden die HEK293-Zellen 36 – 48 Stunden vor den Messungen auf 35 mm Petrischalen ausplattiert (ca. 2×10^5 Zellen/Schale). Um Artefakte durch wachstumsgehemmte oder bereits apoptotische Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen so ausplattiert, dass zum Messzeitpunkt kein geschlossener Zellrasen vorlag. Für die Messungen wurden nur HEK293-Zellen herangezogen, die eine typische runde bis ovale Form und eine Größe von 20 – 30 µm zeigten.

2.2 Elektrophysiologische Messungen

2.2.1 Aufbau des Patch-Clamp Messstandes

Die elektrophysiologischen Messungen zur Porenbildung von α -Hämolyisin (α Hly) wurden an einem Patch-Clamp Messstand durchgeführt, dessen schematischer Aufbau in der Abbildung 1 dargestellt ist.

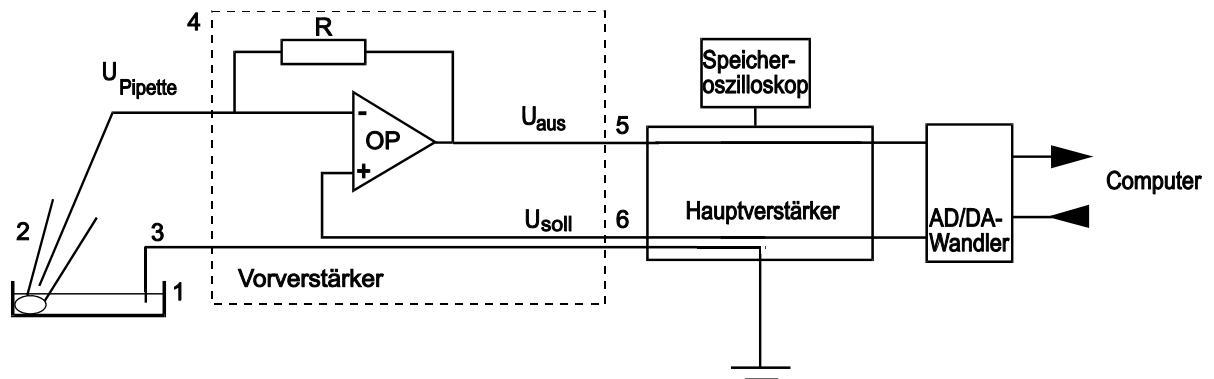


Abb. 1 : Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Messstandes. (1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patchpipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand R in einen Strom umgerechnet wird, (6)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

Durch Einsetzen in eine Halterung, wurden die für die Messungen benutzten Petrischalen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Wetzlar) fixiert. Über die Halterung wurde zudem die Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung während der Experimente ermöglicht (Temperatur Control System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). Die Patchpipette und die Badelektrode ragten in die mit Extrazellulärlösung gefüllte Petrischale hinein. Über einen Pipettenhalter und einen Schlauch war die Glaskapillare mit einer 50 ml Kolbenspritze verbunden. Diese ermöglichte die Erzeugung von Über- und Unterdruck in der Patchpipette. Die Patchpipette wurde mit Hilfe eines elektromechanisch getriebenen Mikromanipulators (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf) und unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Zur Aufnahme der Ionenströme wurden chlorierte Silberelektroden, die sich in den Elektrolytlösungen der Badkammer bzw. der Patchpipette befanden, benutzt. Über den direkt mit den Elektroden in Verbindung

stehenden externen Vorverstärker wurden die Membranströme aufgenommen und dabei in Spannungssignale umgewandelt. Maßgebliche Eigenschaft des Vorverstärkers ist sein extrem hoher Eingangswiderstand bei sehr geringem elektrischen Grundrauschen. Ohne diesen würden die Membranpotentiale sofort zusammenbrechen bzw. die Ionenströme wären durch die Zellmembran im Picoampere-Bereich nicht messbar. Die externe Vorverstärkung dieser sehr kleinen Ströme so nah wie möglich am Ort der Ableitelektrode ist notwendig, damit sie mit möglichst geringen elektrischen Störsignalen zum getrennt stehenden Patch-Clamp Hauptverstärker L/M-EPC-8 (List Electronics GmbH, Darmstadt) geleitet werden können. Im Anschluss an die Endverstärkung durch den EPC-8 wurden die Signale mit einem 7 Pol-Bessel-Tiefpaßfilter (LKB Electronics, Mauer) gefiltert. Als Cut-off-Frequenz wurde dabei jeweils ein Drittel der Frequenz der Aufnahmerate der Datenpunkte (sampling rate) gewählt. Die Membranströme wurden über den Analog/Digitalwandler des Interface-Gerätes ITC-16 (Instrutech Corp., Elmont NY, USA) digitalisiert und auf dem PC (IBM-kompatibler Pentium III) abgespeichert.

Die Kombination von PC und Patch-Clamp Programm (Pulse + PulseFit) ermöglichte sowohl die kontinuierliche Datenspeicherung als auch die Speicherung von Pulssequenzen in Form von Spannungssprüngen. Gleichzeitig hatte der PC die Aufgabe des Pulsgebers. Zuvor programmierte Befehlssequenzen wurden dazu über den Digital/Analogwandler ITC-16 an den Patch-Clamp Verstärker EPC-8 gesendet. Die entsprechenden, dort erzeugten Spannungen wurden über den Vorverstärker und die chlorierte Silberelektrode an die Zelle geleitet. An der Zellmembran entstanden so die gewünschten Membranpotentiale. Der zur Einstellung des gewünschten Membranpotential benötigte Strom wird dabei gemessen und graphisch dargestellt (Voltage-Clamp Modus).

Um die elektrischen und mechanischen Störfaktoren so gering wie möglich zu halten, ist der Messstand innerhalb eines Faradayschen Käfigs platziert und gleichzeitig pneumatisch gedämpft.

2.2.2 Patchpipetten-Herstellung

In einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA) wurden in einem mehrstufigen Prozess aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) die Mikropipetten für die Patch-Clamp Experimente gezogen. Durch die Wahl des entsprechenden Programms konnte die Form der Spitze und deren Öffnungsdurchmesser variabel gewählt werden. Anschließend wurde mit der Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) die Patchpipettenspitze feuerpoliert. Die so bearbeiteten Mikropipetten erlaubten einen besseren Kontakt zwischen Zellmembran und Patchpipettenspitze. An jedem Versuchstag wurden neue Patchpipetten gezogen und poliert.

2.2.3 Badperfusion

Die Badperfusion diente dazu, Zellen unter Patch-Clamp Messbedingungen mit verschiedenen Lösungen zu umspülen und wieder auswaschen zu können. Handelsübliche 10 und 25 ml Einwegspritzen (Braun, Melsungen) dienten als Vorratsgefäße für die Lösungen. Die Schläuche waren aus Polyethylen (Innendurchmesser 0,5mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bzw. zu Beginn der Leitung aus Silikon als Verbindungsstück zwischen Vorratsgefäß und Polyethylen-Schlauch. Der Zu- und Ablauf wurde über handelsübliche Mehrwegehähne, die aus Infusionsbestecken stammten, geregelt. Da nicht auszuschließen war, dass die benutzten Substanzen unspezifisch an die Gefäß- und Schlauchinnenwände adsorbieren könnten, musste die Anlage nach jedem Versuch gespült bzw. die Einwegmaterialien und Schläuche ausgetauscht werden. Über einen Polyethylen-Schlauch war das Vorratsgefäß mit einer zugeschliffenen Injektionsnadel (Innendurchmesser 0,5 mm) verbunden. Diese diente als Ausströmdüse und konnte den Erfordernissen entsprechend zurechtgebogen werden. Über einen

Adapter mit Quetschhahn war die Ausströmdüse mit einem mechanischen Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) verbunden und konnte in die Nähe der zu messenden Zelle plziert werden. Mit Hilfe der Höhe des Vorratsgefäßes über dem Flüssigkeitsspiegel in der Petrischale, konnte die Durchflussmenge reguliert werden.

2.2.4 Verwendete Ionenlösungen

In Tabelle 2 sind die in den Patch-Clamp Experimenten verwendeten Ionenlösungen aufgeführt. Die als Extrazellulärlösungen bezeichneten Lösungen wurden an der physiologischen Zellmembranaußenseite und die als Intrazellulärlösung bezeichnete Lösung an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt.

Tabelle 2 : Ionenlösungen

Alle Konzentrationen sind - soweit nicht anders bezeichnet - in mM angegeben.

A Extrazellulärlösungen:

Name	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂	Glucose	HEPES
E ₁	140	3	2	2	-	15	10
E _{1Ba}	140	3	2	-	2	15	10

Beide E₁-Lösungen wurden mit 4 mM NaOH auf pH 7,35 eingestellt.

E₁ : Extrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination

E_{1Ba} : Extrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination ohne extrazelluläres Ca²⁺

HEPES: 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure

B Intrazellulärlösung :

Name	[Ca ²⁺] _{frei}	KGlut.	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	HEPES
IBL100n	100 nM	140	20	2	29,7 µM	0,1	10

IBL-Lösung wurde mit mit 0,3 mM KOH auf pH 7,30 eingestellt.

IBL: Intrazellulärlösung für „physiologische“ Lösungskombination mit BAPTA, Low buffered. Die nachgestellte Zahlen/Buchstabenkombination gibt die freie Ca²⁺-Konzentration der Intrazellulärlösung an.

KGlut = Kaliumglutamat

BAPTA: 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethan-N,N,N', N'-tetra-acetylsäure

Um osmolare, durch Schwellung bedingte Effekte auf den Membranstrom zu verhindern, wurden alle verwendeten Lösungen mit einem Kryosmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) überprüft. Die Osmolaritäten der Extrazellulärlösungen lagen im Bereich von 296 mosmol/kg und die der Intrazellulärlösung im Bereich von 305 – 310 mosmol/kg.

2.2.5 Whole-Cell-Messkonfiguration

Eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette wurde zunächst an die Membran der Zelle positioniert. Ein auf die Pipettenlösung angelegter leichter Überdruck verhinderte die Verunreinigung der Patchpipettenspitze beim Eintauchen in die Extrazellulärlösung der Badkammer sowie das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Patchpipette. Zudem wurde durch den Überdruck in der letzten Phase der Annäherung der Patchpipette die Zellmembran etwas eingedellt. Ein 10 mV Testpuls kontrollierte dabei ständig den Widerstand der Patchpipette. Er lag frei in der Badlösung zwischen 5 und 10 M Ω . Nach der Wegnahme des Überdrucks näherten sich die Zellmembran und die Patchpipette soweit an, dass der Widerstand auf etwa 50-100 M Ω anstieg. Durch Erzeugung eines Unterdrucks entstand ein dichter Kontakt zwischen Patchpipettenspitze und Zellmembran, so dass der Widerstand auf ca. 2-20 G Ω anstieg. Aus dieser Cell-Attached-Messkonfiguration konnte man unter Beibehaltung des leichten Unterdrucks für 100 μ s einen Spannungspuls von -950 mV anlegen, die Zellmembran unterhalb der Patchpipette einreißen und gelangte so in die Whole-Cell-Messkonfiguration. In dieser Messkonfiguration lassen sich die Ionenströme durch die gesamte Zellmembranoberfläche messen.

Eine detaillierte Beschreibung der Ableitungskonfigurationen der Patch-Clamp Technik findet sich in der Arbeit von Hamill et al. (1981).

2.2.6 Korrektur der Liquid-Junction Potentiale

Kommen zwei Lösungen unterschiedlicher ionaler Zusammensetzung über eine relativ zum Flüssigkeitsvolumen kleine Grenzfläche, die aber unbehinderte Diffusion erlaubt, miteinander in Kontakt, so entwickelt sich ein elektrochemisches Potential, das sogenannte Liquid-Junction Potential. In erster Näherung hängt die Höhe des sich ausbildenden Potentials vom Konzentrationsunterschied und der Ionenbeweglichkeit der unterschiedlichen Ionen der Lösungen ab. Bei Patch-Clamp Experimenten bildet sich ein solches Potential an der Spitze der Patchpipette aus (Barry & Lynch 1991; Neher 1992).

Bei den von uns benutzten Lösungskombinationen beträgt dieses Potential etwa +10 mV. In der Praxis wird dieses Potential, zusammen mit allen weiteren existierenden Potentialen, mit Hilfe der Offsetkorrektur auf 0 abgeglichen. Sobald allerdings die Patchpipettenöffnung beim Sealvorgang mit der selektiv permeablen Zellmembran dicht verschlossen wird, existiert dieses vorher abgeglichene Potential nicht mehr, da keine freie Diffusion mehr erfolgen kann. Deswegen ist es gängige Praxis, dieses dann überkorrigierte Potential schon während der Messung durch entsprechend abgeänderte Membranhaltopotentiale ("à Priori"-Korrektur), oder nach der Messung durch rechnerische Korrektur ("à Posteriori"-Korrektur) wieder auszugleichen (Sakman & Neher 1995).

Ein Spezialfall tritt allerdings bei unselektiv permeablen Poren relativ großer Leitfähigkeit auf. Überwiegt die unselektive Membranleitfähigkeit gegenüber der spezifischen Leitfähigkeit, hat man also de facto eine ungehinderte Diffusion, so gleicht die Situation wieder der Anfangssituation ohne Zellmembran und das Liquid-Junction Potential entsteht wieder. Die Größe der Grenzfläche - Pore oder Pipettenspitze - ist hierbei nicht entscheidend. Solange die freie Diffusion aller Lösungsbestandteile nicht behindert wird, wird die Höhe des Liquid-Junction Potentials immer gleich sein. In diesem speziellen Fall darf also keine Korrektur mehr erfolgen (persönliche Mitteilung A. Koschinski, Arbeitsgruppe Dreyer).

Alle Potentiale in dieser Arbeit wurden diesen Überlegungen folgend entsprechend à posteriori rechnerisch korrigiert bzw. belassen.

2.3 α -Hämolysin und Mutanten

Sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten des α -Hämolysin (α Hly) wurden unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation von Dr. Walev / Prof. Bhakdi (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Stocklösung des α -Hämolysin (α Hly) hatte eine Konzentration von 150 μ g/ml. Um eine Aggregation der α -Hämolysin-Moleküle zu verhindern und sie in monomerer Form zu halten, war das α -Hämolysin (α Hly) in einem 8 M Guanidinpuffer gelöst. Diese Stocklösung wurde wiederum mit Guanidin-Puffer in einem Verhältnis von 1 : 3 verdünnt, so dass eine Konzentration des α -Hämolysin (α Hly) von 50 μ g/ml vorlag. Aus dieser Verdünnungsstufe wurden 2 μ l in 80 μ l Extrazellulärlösung gelöst, die 0,5 % FAFBSA (**F**atty **A**cid **F**ree **B**ovine **S**erum **A**lbumine) enthielt und in die 2000 μ l Badlösung appliziert. So lag in der Badlösung eine Endkonzentration von 50 ng/ml α -Hämolysin (α Hly) und 8 mM Guanindin vor.

2.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung der Amplitudenverteilung der elementaren Porenströme (Abschnitt 3.3) wurden durch Herrn Prof. Dr. Brockmeier (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt. Alle weiteren Messergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) statistisch ausgewertet und graphisch bearbeitet. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

2.5 Substanzliste

Nifedipin

Nifedipin, aus der Gruppe der Dihydropyridine blockiert bevorzugt L-Typ Ca^{2+} Kanäle (Striessnig et al. 1998). Es wurde in einer Endkonzentration von 62,5 μM eingesetzt.

Nicardipin

Nicardipin, ein hydrophiles Dihydropyridin, blockiert L-Typ Ca^{2+} Kanäle. Es wurde in einer Endkonzentration von 62,5 μM eingesetzt.

Cytochalasin D

Cytochalasin ist ein Pilzmetabolit. Es durchdringt die Zellmembran und bindet an die zytoplasmatischen Actinfilamente, an denen es den Polymerisierungs-Depolymerisierungszyklus hemmt (Cooper 1987). Cytochalasin D wurde in einer Endkonzentration von 1 μM eingesetzt.

Nocodazol

Nocodazol hemmt die Polymerisation von Mikrotubuli. Es wurde in einer Endkonzentration von 10 μM eingesetzt (Vasquez et al. 1997).

Lanthanoide

Lanthanoide sind dreiwertige Ionen. Aus dieser Gruppe wurden Lanthan (La^{3+}), Gadolinium (Gd^{3+}) und Ytterbium (Y^{3+}) verwendet. Alle Lanthanoide wurden in einer Endkonzentration von 1 μM bis 1000 μM eingesetzt.

Farbstoffe

Farbstoffe werden in der Histologie und der dermatologischen Lokalthherapie verwendet. Es wurden Eosin Y, Brilliant Grün, Fuchsin, Säurefuchsin, Gentianaviolett und Methylenblau eingesetzt. Alle Farbstoffe wurden bis zu einer Endkonzentration von 1 mM verwendet.

Genistein:

Genistein (Sigma-Aldrich, Steinheim) ist ein Isoflavon (4,5,7-Trihydroxyisoflavon), das Tyrosinkinasen mit einem IC_{50} -Wert von 2,6 μ M blockiert. Eingesetzt wurde eine Endkonzentration von 100 μ M (Akiyama et al. 1987).

UO126

UO126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) (Sigma-Aldrich, Steinheim) ist ein MAP-Kinase-Kinase Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 0,06 μ M. Eingesetzt wurde eine Endkonzentration von 10 μ M.

SB203580

SB203580 (4-[4-Fluorophenyl]-2-[4-methylsulfinylphenyl]-5-[4-pyridyl]1H-imidazol) (Sigma-Aldrich, Steinheim) ist ein MAP-Kinase Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 0,6 μ M. Eingesetzt wurde eine Endkonzentration von 10 μ M.

3 Ergebnisse

3.1 Porenbildung durch α -Hämolyisin

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung der Porenbildung durch α Hly humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet. Diese Zelllinie eignet sich sehr gut für die Registrierung von Porenströmen, da HEK293-Zellen bei Membranpotentialen, die negativer als -40 mV sind, keine Aktivierung von endogenen Ionenkanälen zeigen. Abbildung 2 zeigt eine typische Strom-Spannungskurve einer HEK293-Zelle in der Whole-Cell-Messkonfiguration. Ab einem Membranpotential von positiver als -30 mV kommt es zu einer Aktivierung eines spannungsabhängigen, calciumunabhängigen Kaliumstroms. Bei Membranpotentialen über +30 mV erfolgt eine Inaktivierung der Kaliumkanäle. Alle Messungen wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, bei einem Membranpotential von -40 mV durchgeführt.

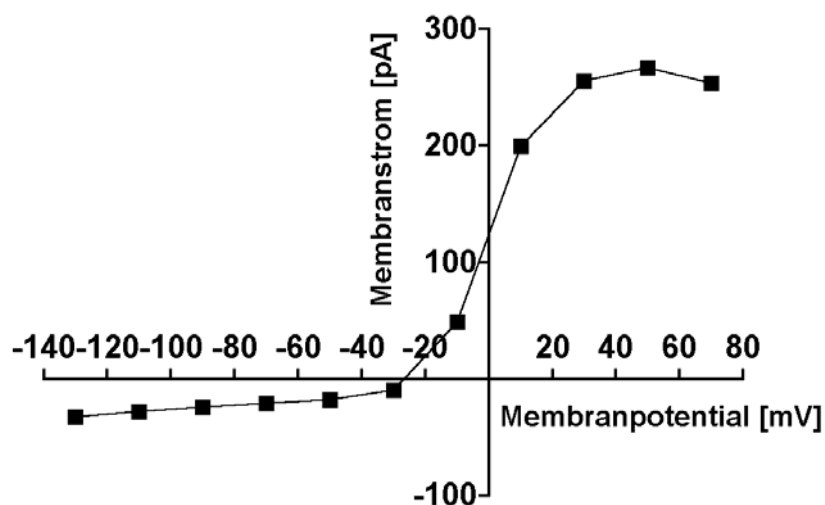


Abb 2: Typische Strom-Spannungskurve einer HEK293-Zelle in der Whole-Cell-Messkonfiguration. Es wurden Membranpotentiale von -130 bis +70 mV in 20 mV Schritten für jeweils 400 ms angelegt und die resultierenden Membranstromamplituden auf der Y-Achse aufgetragen. Zwischen den angelegten Membranpotentialen wurden die Zellen für jeweils 100 ms auf das Membranpotential von -40 mV gehalten.

Bei einem Membranpotential von -40 mV zeigten die Zellen einen geringen unspezifischen Membranstrom von $-16,1 \pm 1,1$ pA ($n=39$), der bei Kontrollmessungen auch über eine halbe Stunde konstant blieb.

Abbildung 3 A zeigt eine typische Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α Hly in der Whole-Cell-Messkonfiguration. Es kommt zunächst zu einer Zunahme des Membranstroms um ca. -20 pA. Dieser unspezifische Membranstrom ist durch den Guanidin-Puffer bedingt, in dem das α Hly gelöst ist. Nach einer kurzen Verzögerung von ca. 10 s kommt es zu plötzlichen stufenartigen Zu- und Abnahmen des Membranstroms. Diese abrupten Änderungen des Membranstroms sind bedingt durch das Öffnen und Schließen der durch α Hly erzeugten Poren. Abbildung 3 B zeigt in einer größeren Zeit- und Membranstromauflösung die Registrierung zwischen der 60. und der 120. Sekunde. Hier sind die abrupten Öffnungen und Schließungen der α Hly-Poren sehr gut zu erkennen.

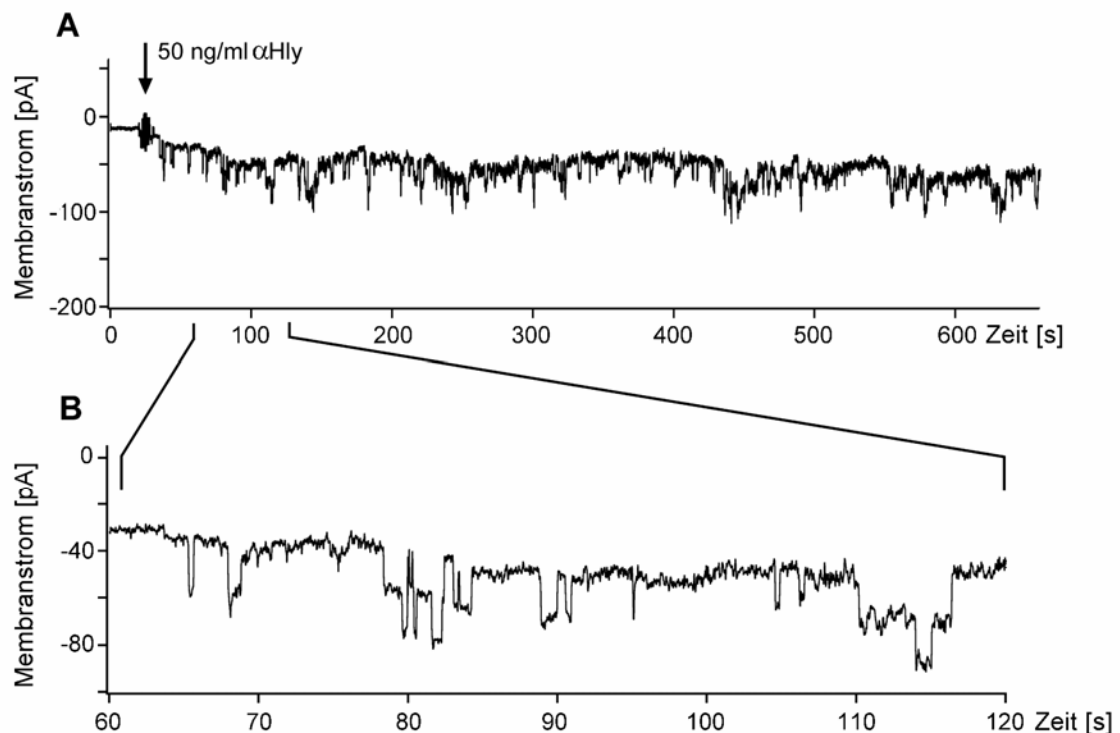


Abb 3: (A) Membranstrom einer HEK293-Zelle über einen Zeitraum von ca. 600 s nach Applikation von 50 ng/ml α Hly (Pfeil). X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: Membranstrom in pA. (B) Registrierung des Membranstroms in einer höheren Zeit- und Membranstromauflösung zwischen der 60. und der 120. Sekunde aus (A). Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E₁, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

3.2 Abhängigkeit der Porenbildung von der α -Hämolyisin-Konzentration

Um die porenbildende Wirkung von α Hly an HEK293-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Porenbildung in Abhängigkeit von der Toxin-konzentration gemessen. In Abbildung 4 sind exemplarisch die Originalregistrierungen der Membranströme bei drei verschiedenen HEK293-Zellen nach Applikation von (Abb. 4 A) 6,25 ng/ml α Hly, (Abb. 4 B) 50 ng/ml α Hly und (Abb. 4 C) 250 ng/ml α Hly dargestellt.

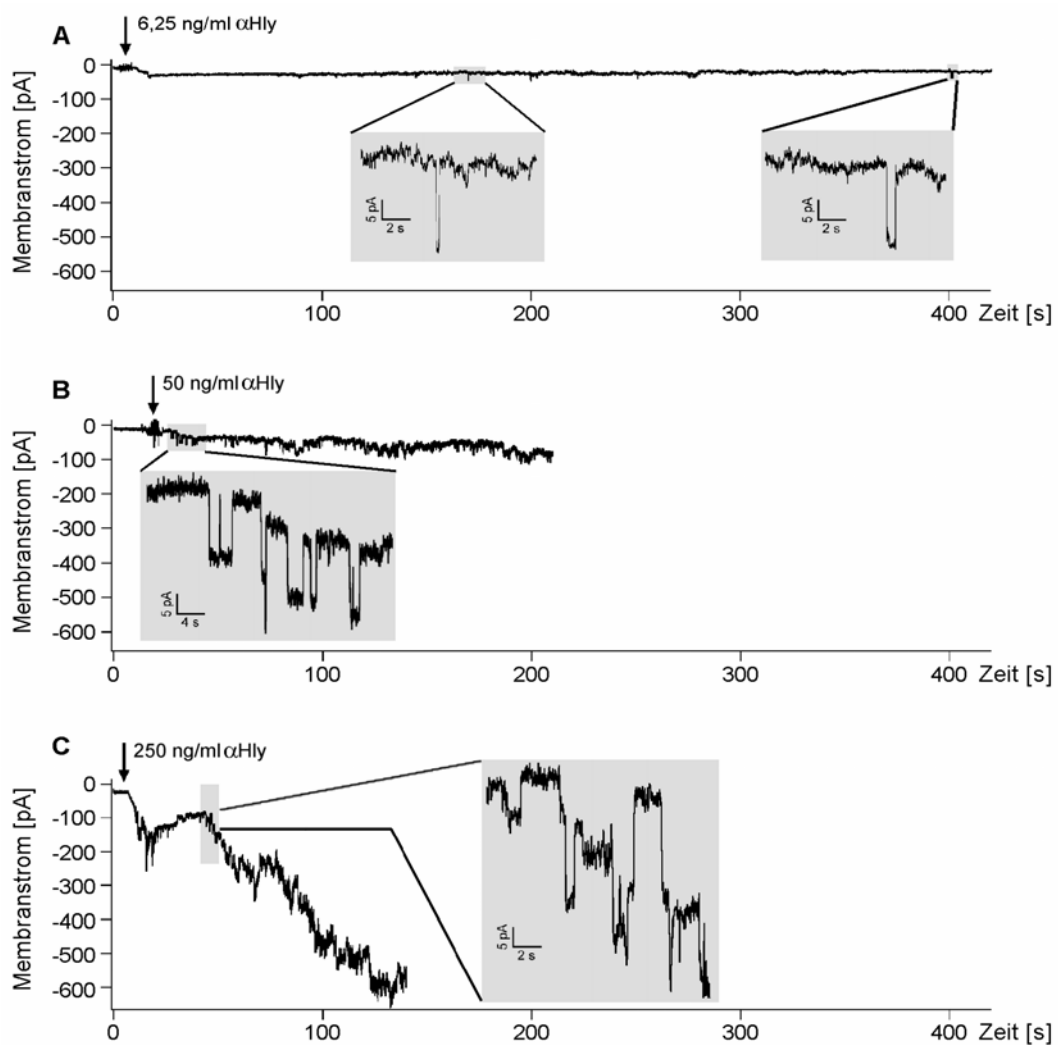


Abb. 4: Originalregistrierungen von drei HEK293-Zellen nach Applikation von **(A)** 6,25 ng/ml α Hly, **(B)** 50 ng/ml α Hly und **(C)** 250 ng/ml α Hly. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E₁, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}. Die Insets in den jeweiligen Abbildungen entsprechen in höherer Zeit- und Membranstromauflösung den grau hinterlegten Kästchen der Originalregistrierungen.

Bei einer α Hly-Konzentration von 6,25 ng/ml sind nur vereinzelte Porenereignisse zu beobachten (Abb. 4 A). Bei einer hohen α Hly-Konzentration von 250 ng/ml kommt es zu einer sehr häufigen Porenbildung, so dass der Membranstrom Werte von über 600 pA annimmt, der eine genaue Auswertung der Poren kaum noch zulässt (Abb. 4 C). Auch bei einer α Hly-Konzentrationen von 50 ng/ml kommt es zu einer häufigen Porenbildung (Abb. 4 B). Jedoch nimmt der Membranstrom bei dieser Toxinkonzentration keine Werte über 300 pA an. Bei dieser Konzentration besteht offenbar ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Porenbildung und Porenschlüssen, wodurch es auch bei längeren Messzeiten nicht zu einer Zellyse kommt.

Bei Toxinkonzentrationen von 100 ng/ml und mehr kam es zu vermehrter „Bleb“-Bildung an den HEK293-Zellen (Abb.6) und häufig innerhalb von fünf Minuten zur Zellyse. Blebs sind zytoplasmatische Ausstülpungen der Zellmembran. Sie sind ein Hinweis darauf, dass das Zytoskelett fortschreitend geschädigt wird und die Zelle nicht mehr in der Lage ist, ihre Integrität aufrecht zu erhalten.

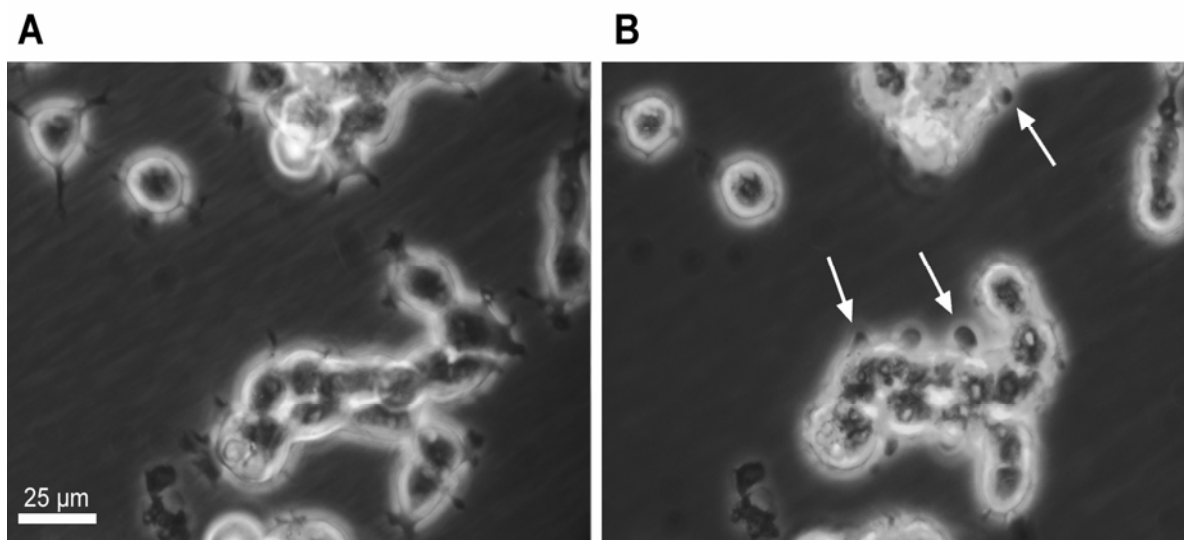


Abb. 6: Originalaufnahmen von HEK293-Zellen **(A)** vor Applikation und **(B)** 3 Minuten nach Applikation von 100 ng/ml α Hly. Die Pfeile weisen auf die entstandenen Blebs hin.

Daher wurde für die nachfolgenden Experimente, falls nicht anders gekennzeichnet, eine α Hly-Konzentration von 50 ng/ml gewählt. Bei dieser α Hly-Konzentration kam es auch bei längeren Messzeiten nicht zu einer Zellyse.

Als Parameter für die Wirkung des α Hly wurde die Anzahl der pro Minute gebildeten Poren genutzt. Abbildung 5 zeigt die entsprechende Konzentrations-Wirkungskurve.

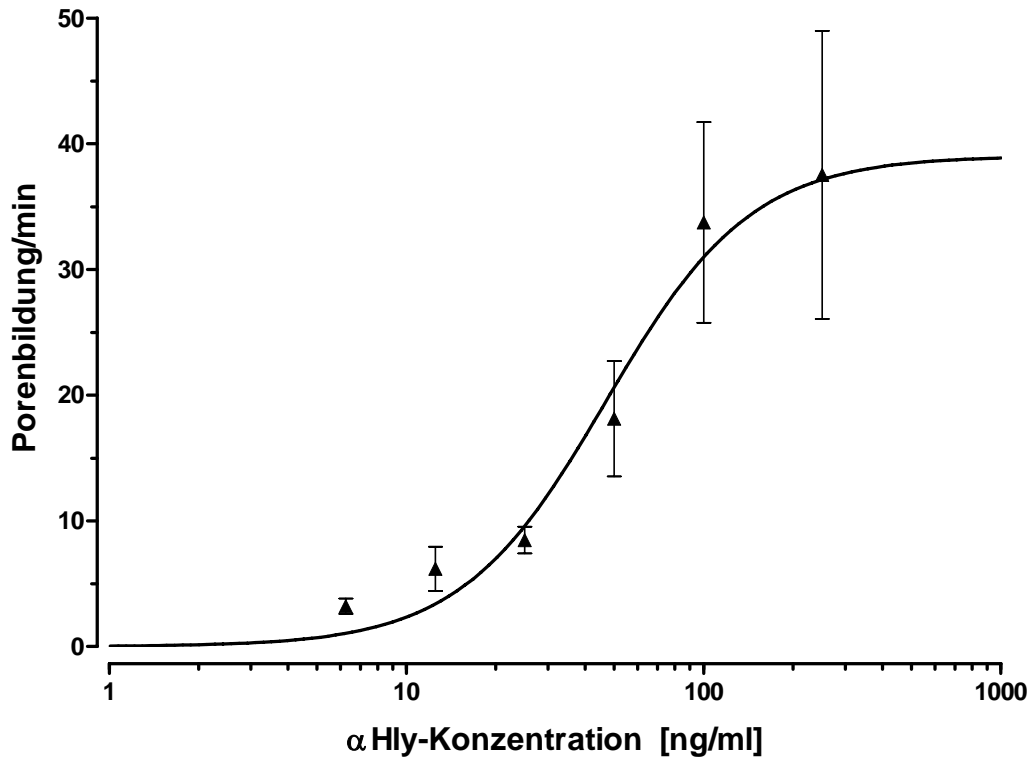


Abb. 5: Abhängigkeit der Porenbildung von der α Hly-Konzentration. Es wurden in 29 Experimenten α Hly-Konzentrationen von 250 ng/ml (n=3), 100 ng/ml (n=5), 50 ng/ml (n=5), 25 ng/ml (n=6), 12,5 ng/ml (n=5) und 6,25 ng/ml (n=5) getestet. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E₁, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}. Da sich bei Konzentrationen von mehr als 100 ng/ml innerhalb sehr kurzer Zeiträume sehr viele Poren bildeten (siehe Abb. 4 C), wurde hier nur die Zeitspanne von Bildung der ersten bis zur zehnten Pore bestimmt und per linearer Regression auf die Porenbildung pro Minute umgerechnet. Die Kurve wurde nach dem "Least-Squares-Fit" Verfahren mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$Y = Y_{\max} / [1 + (EC_{50} / C)^n]$$

an die Messwerte angepasst, wobei Y ist die Anzahl der gebildeten Poren/min bei einer Toxinkonzentration C ist, Y_{\max} die maximale Porenbildung/min, n der Hill Koeffizient und EC_{50} die effektive Toxinkonzentration, die zur Bildung der halbmaximalen Porenbildung/min notwendig ist. Es wurde ein EC_{50} -Wert von 47 ± 1 ng/ml und ein Hill-Koeffizient von $1,8 \pm 0,4$ ermittelt.

Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung nach dem "Least-Squares-Fit"-Verfahren an die Messwerte angepasst. Daraus errechnete sich ein Hill-Koeffizient von $n = 1,8 \pm 0,4$ und eine halbmaximale effektive Konzentration von $EC_{50} = 47 \pm 1$ ng/ml.

3.3 Elementare Porenströme

Um eine Verteilung der elementaren Porenströme zu erstellen, wurden insgesamt 1380 Porenöffnungen erfasst und mit Hilfe der Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktion (RRSW) (Weibull 1951; Brockmeier 1991) statistisch ausgewertet. Abbildung 7 zeigt die entsprechende Amplitudenverteilung mit den absoluten Häufigkeiten der auftretenden Porenströme.

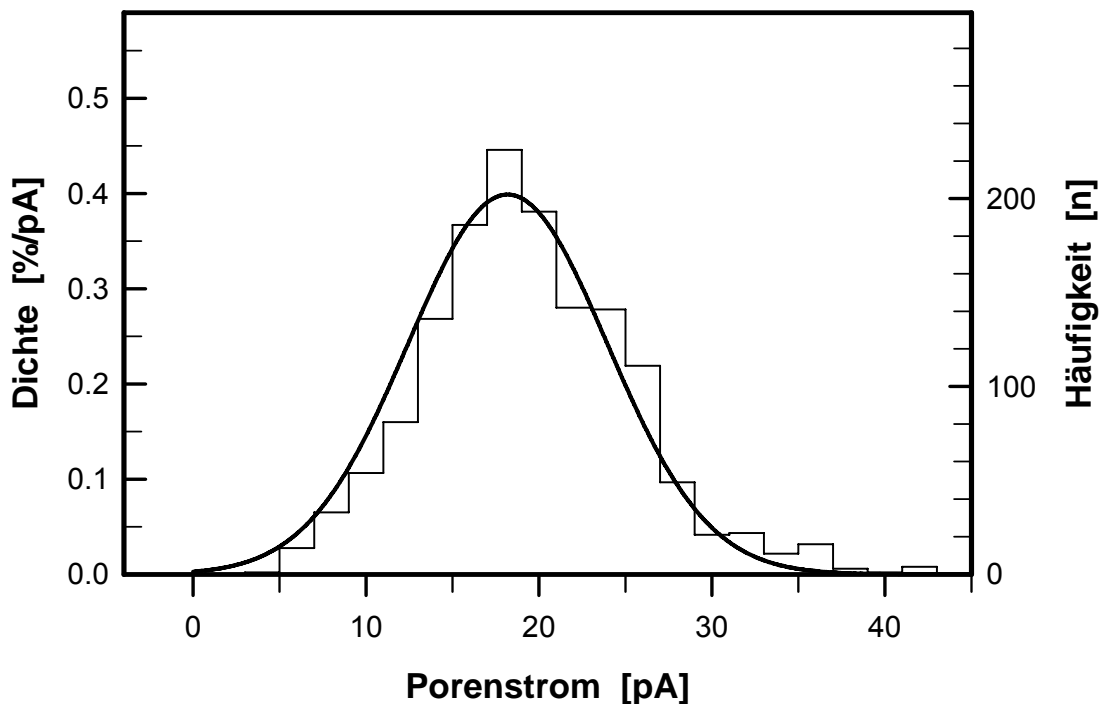


Abb. 7: Amplitudenverteilung der durch α Hly-Poren fließenden Porenströme. Es wurden 1380 Porenöffnungen ausgewertet. X-Achse: Porenstrom in pA. Rechte Y-Achse: absolute Häufigkeit der Porenströme. Linke Y-Achse: Mehrere über die kumulativen Häufigkeiten der Daten (nicht dargestellt) gelegte Dichtefunktionen [%/pA], die mit Hilfe der Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktionen berechnet wurden (Graph). α Hly-Konzentration: 50 ng/ml, Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: IBL_{100n} .

Die Amplitudenverteilung der Porenströme zeigt eine eingipflige Verteilung mit einem Maximum von $18,5 \pm 0,2$ pA bei einem Membranpotential von -40 mV. Dies ergibt eine Porenleitfähigkeit von 463 pS.

3.4 Einfluss verschiedener α -Hämolysin Punktmutationen auf die Porenbildung

Von Dr. Walev / Prof. Bhakdi (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) wurden uns Punktmutanten des α Hly zur Verfügung gestellt. Bei der Δ B Mutante des α Hly wurde an Position 690 und bei der Δ AB Mutante an Position 564 und 690 Lysin durch Arginin ersetzt mit der Folge, dass an diesen Stellen keine Fettsäuren-Acylierung mehr stattfinden kann. Es sollte nun untersucht werden, ob die Mutanten Δ B und Δ AB des α Hly porenbildende Eigenschaften besitzen. Abbildung 8 zeigt exemplarisch Registrierungen des Membranstroms von HEK293-Zellen nach Applikation von 50 ng/ml der beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

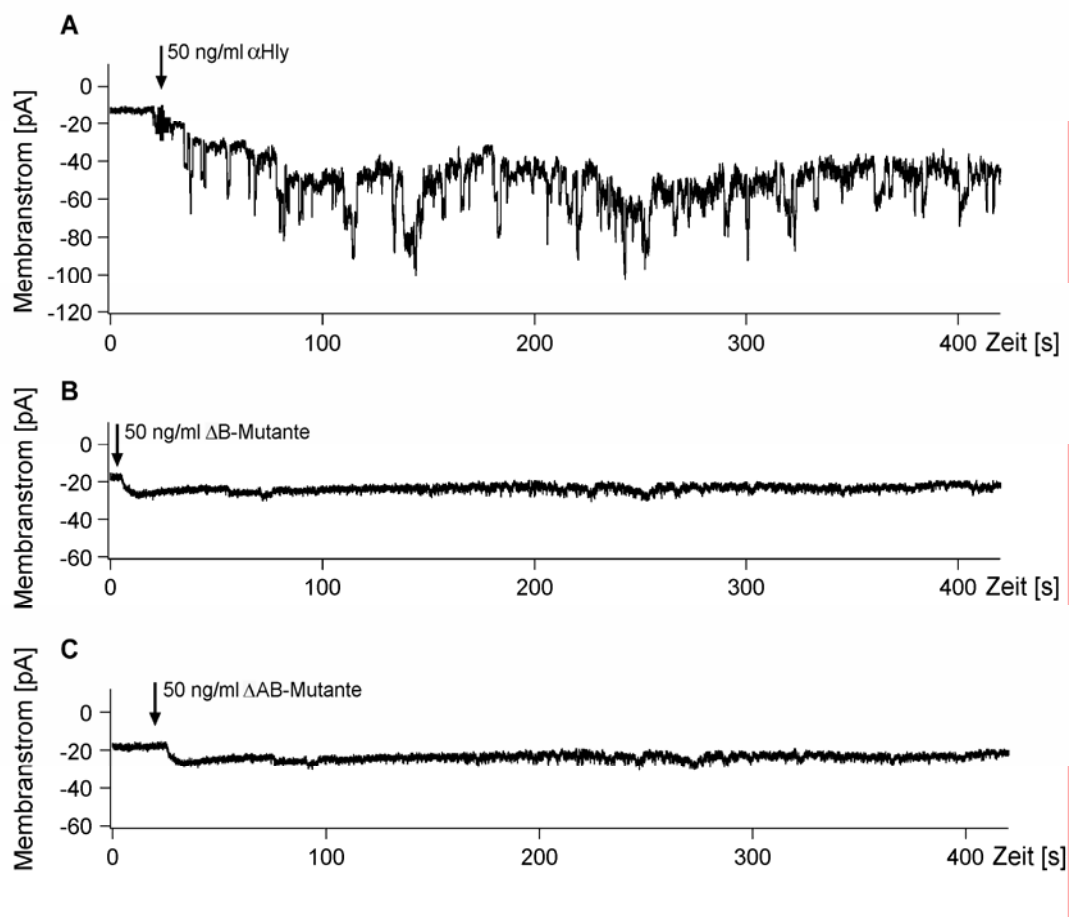


Abb. 8: Membranströme von drei HEK293-Zellen nach Applikation von 50 ng/ml (A) Wildtyp α Hly, (B) Δ B-Mutante und (C) Δ AB-Mutante des α Hly. Die Mutanten Δ B und Δ AB verursachen über einen Zeitraum von 400 s keine Porenbildung. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E₁, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 8 A) des α Hly kommt es während eines Messzeitraums von ca. 400 s nach Applikation von 50 ng/ml der Δ B und Δ AB Mutante des α Hly (Abb. 8 B,C) zu keiner Porenbildung. Es wurden für die Δ B- bzw. Δ AB-Mutanten in jeweils drei Experimenten die Konzentrationen 50 und 250 ng/ml getestet. Die fehlende Porenbildung durch die Δ B- und Δ AB- Mutanten des α Hly zeigt also, dass zumindest Lysin an der Aminosäureposition 690 des Toxinmoleküls eine wichtige Funktion für die Porenbildung hat. Es bleibt aber noch unklar, ob die Aminosäure Lysin selbst oder ihre Fettsäuren-Acylierung, im Sinne einer posttranslationalen Modifikation, essentiell für die Porenbildung ist.

Für das Zytotoxin von *Bacillus anthracis* wurde gezeigt, dass nicht-zytolytische Toxinmutanten mit dem Wildtyp-Toxin interagieren und die Porenbildung inhibieren können (Sellman et al. 2001; Singh et al. 2001). Dies hat klinische Relevanz, da eine solche Interaktion von Wildtyp-Toxin und Toxinmutante bei der Anthrax-Therapie nützlich sein kann (Sellman et al. 2001). Daher sollte nun geklärt werden, ob eine solche Interaktion auch zwischen dem Wildtyp und den nicht-porenbildenden Mutanten des α Hly stattfindet. Dazu wurde eine Toxin-Mischung aus dem Wildtyp in einer Konzentration von 6,25 ng/ml und aus der jeweiligen Mutante des α Hly in einer Konzentration von 50 ng/ml hergestellt. Diese Toxin-Mischung wurde auf die HEK293-Zellen appliziert. Damit beim Wildtyp und bei den Wildtyp-Mutanten-Mischungen des α Hly gleiche Anteile an Guanidin-Puffer enthalten waren, wurde dem Wildtyp des α Hly entsprechende Mengen Guanidin zugemischt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch zwei Originalregistrierungen eines solchen Experiments.

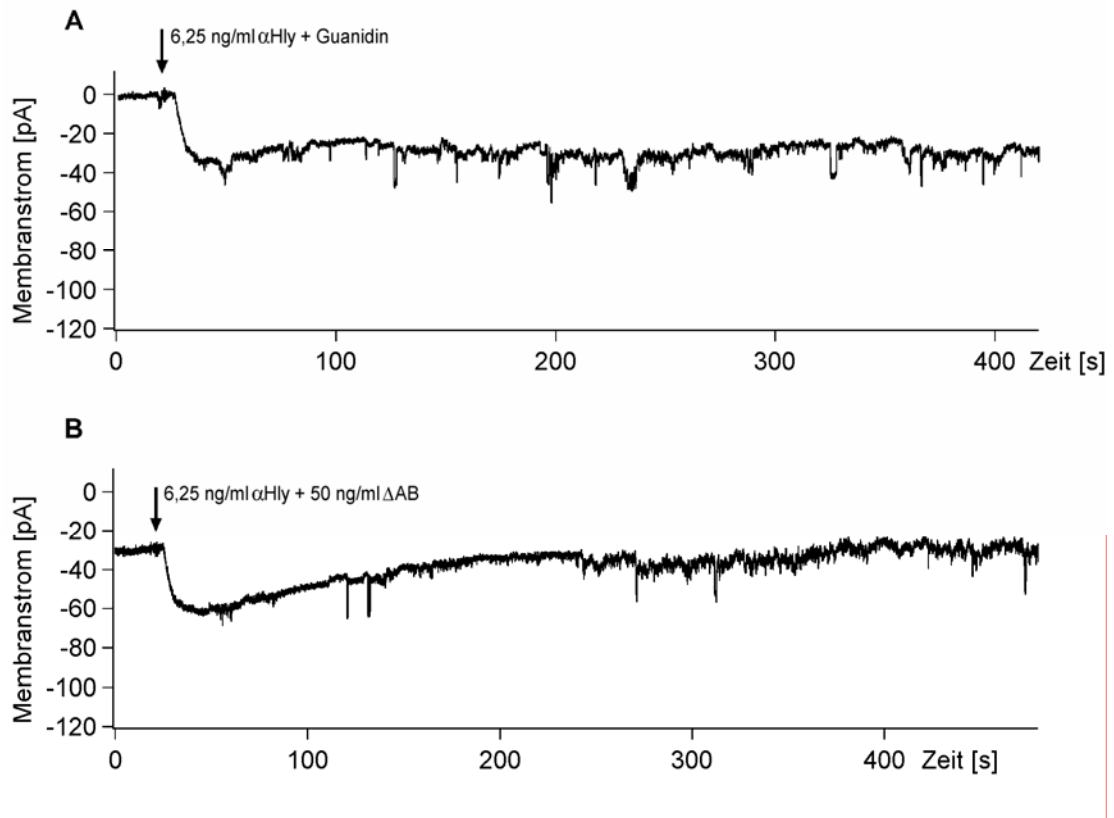


Abb. 9: Membranströme von zwei HEK293-Zellen nach Applikation **(A)** von 6,25 ng/ml α Hly bzw. **(B)** nach Applikation von 6,25 ng/ml α Hly, vermischt mit 50 ng/ml Δ AB-Mutante des α Hly. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Die Auswertung der Experimente zeigte, dass es sowohl bei der Δ B/Wildtyp- als auch bei der Δ AB/Wildtyp-Mischung des α Hly zu einer signifikanten Reduzierung ($p \leq 0,05$) der Porenbildung gegenüber den Kontrollen kam (Abb. 10). Während bei den Kontrollen $3,9 \pm 0,6$ Poren/min ($n=8$) gebildet wurden, wurden bei der Δ B/Wildtyp-Mischung des α Hly nur $0,9 \pm 0,1$ Poren/min ($n=3$) und bei der Δ AB/Wildtyp-Mischung des α Hly nur $1,2 \pm 0,1$ Poren/min ($n=3$) gebildet.

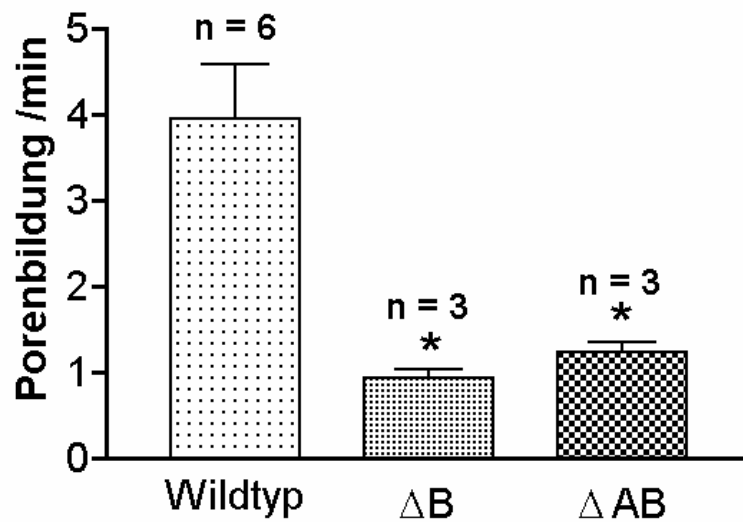


Abb. 10: Vergleich der Porenbildung der ΔB /Wildtyp- bzw. ΔAB /Wildtyp-Mischung des αHly mit dem Wildtyp. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C , Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: IBL_{100n} . Die Porenbildungen der Mutanten/Wildtyp-Mischungen sind signifikant gegenüber der Porenbildung des Wildtyps reduziert ($p \leq 0,05$).

Offensichtlich wirkt sich die Anwesenheit der zwar bindenden, aber nicht porenbildenden αHly -Mutanten inhibierend auf die Bildung funktioneller αHly -Poren aus. Diese Beobachtung könnte wie für Anthraxtoxin klinische Relevanz haben, da solche nicht porenbildenden αHly -Moleküle eventuell für eine Therapie genutzt werden könnten.

3.5 Reversibilität der α -Hämolyisin-Porenbildung

3.5.1 Spülung mit E_1 -Lösung

Durch Auswaschexperimente mit toxinfreier E_1 -Lösung sollte geklärt werden, ob die Porenbildung durch α Hly in der Zellmembran reversibel ist. Dazu wurde an eine in der Whole-Cell-Messkonfiguration befindliche HEK293-Zelle die Kanüle der Spülvorrichtung angenähert (s. Abschnitt 2.2.3). Nach Applikation von 50 ng/ml α Hly und der Zunahme des Membranstroms durch entstandene Poren wurde nach etwa 50 s die Zelle mittels der Kanüle mit toxinfreier E_1 -Lösung umspült. So wurde verhindert, dass weitere Toxinmoleküle an die Zelle gelangen konnten. Abbildung 11 B zeigt die Originalregistrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle aus einem solchen Spülexperiment im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11 A), in der die HEK293-Zelle nicht mit toxinfreier E_1 -Lösung umspült wurde.

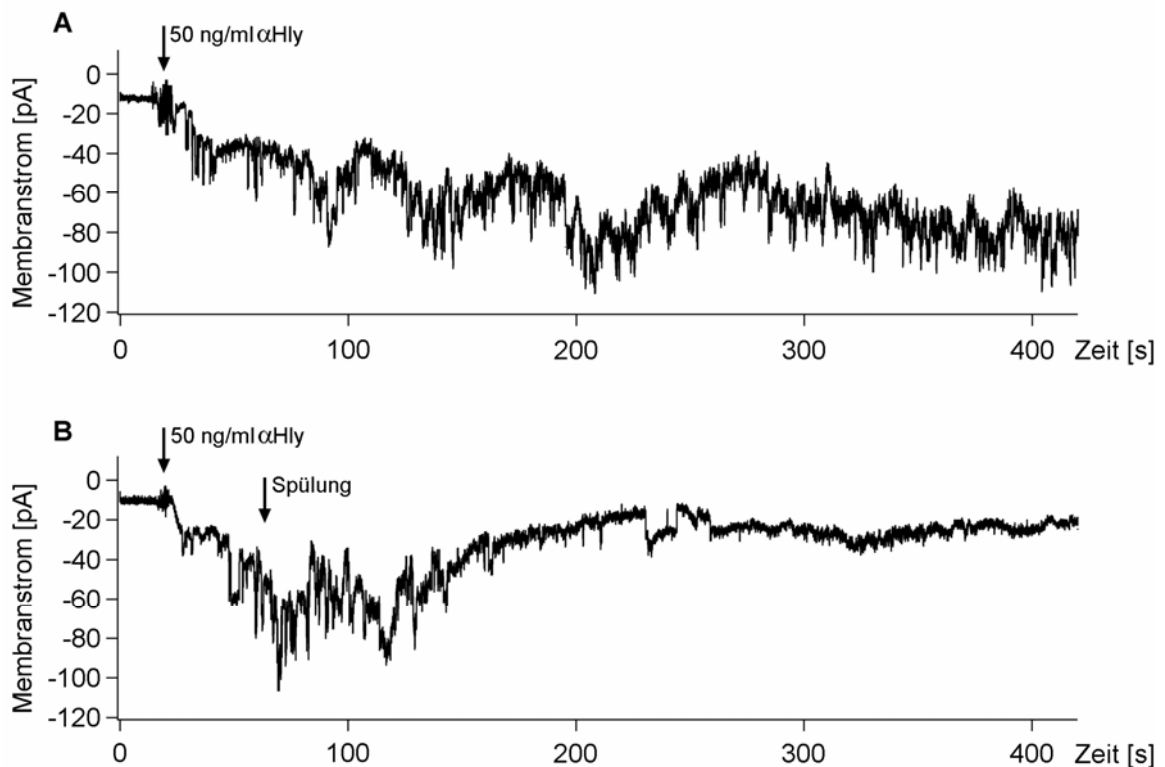


Abb.11: (A) Membranstrom einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α Hly. (B) Membranstrom einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α Hly und anschließender Umspülung mit toxinfreier E_1 -Lösung. Nach Einschalten der Spülung verschließen sich innerhalb von ca. 180 s alle entstandenen Poren. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Etwa 180 s nach Einschalten der Spülung haben sich alle entstandenen Poren wieder verschlossen und der Membranstrom ist nahezu auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt. In sechs Experimenten betrug bei einer Toxinkonzentration von 50 ng/ml die Zeitspanne von Beginn der Spülung bis zum vollständigen Verschwinden der Porenströme 171 ± 33 s. Folglich ist die Porenbildung durch α Hly in der Zellmembran vollständig reversibel, wobei noch unklar ist, ob dieser Reversibilität aktive zelluläre Prozesse wie Endozytose oder eine Dissoziation der α Hly-Moleküle von der Zellmembran ins umgebende Medium zugrunde liegen. Auf Grund dessen wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob am Verschwinden der Poren tatsächlich zelluläre Prozesse beteiligt sind. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob möglicherweise durch die Poren in die Zelle einfließende Calciumionen ein Signal für solche zelluläre Prozesse darstellen.

3.5.2 Spülung mit calciumfreier E_{1Ba} -Lösung

Um dies zu untersuchen, wurde mit nominell calciumfreier Extrazellulärlösung (E_{1Ba} -Lösung), in der Calcium durch Barium substituiert war, gearbeitet. Abbildung 12 zeigt die Membranströme zweier HEK293-Zellen bei Spülung mit calciumhaltiger, toxinfreier Extrazellulärlösung (Abb. 12 A) im Vergleich zur Spülung mit calciumfreier, toxinfreier Extrazellulärlösung (Abb. 12 B). Kurz nach Applikation von 50 ng/ml α Hly kommt es zur Porenbildung an der Zellmembran der HEK293-Zelle. Nach Einschalten der Spülung mit calciumfreier Lösung ist zu beobachten, wie die entstandenen Poren sich wieder verschließen und der Membranstrom nahezu auf das Ausgangsniveau zurückgeht.

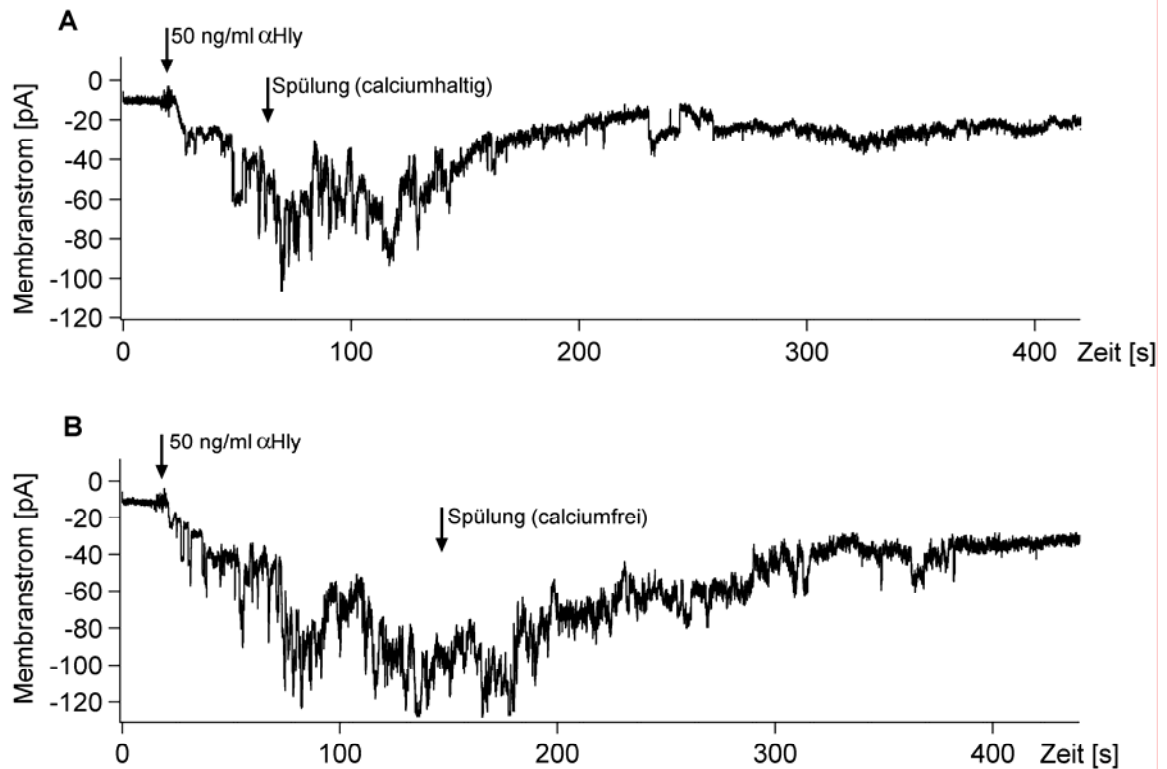


Abb. 12: (A) Membranstrom einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α Hly und anschließender Umspülung mit toxischer E_1 -Lösung. Nach Einschalten der Spülung verschließen sich innerhalb von ca. 180 s alle entstandenen Poren. (B) Membranstrom einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α Hly und anschließender Umspülung mit calciumfreier, toxischer E_{1Ba} -Lösung. Nach Einschalten der Spülung verschließen sich alle Poren innerhalb von ca. 210 s. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Abbildung 13 zeigt, dass zwischen der Verwendung von calciumhaltiger und calciumfreier Extrazellulärlösung in Hinblick auf die Zeitdauer zwischen Beginn der Spülung und dem vollständigen Verschwinden der Poren kein signifikanter Unterschied besteht.

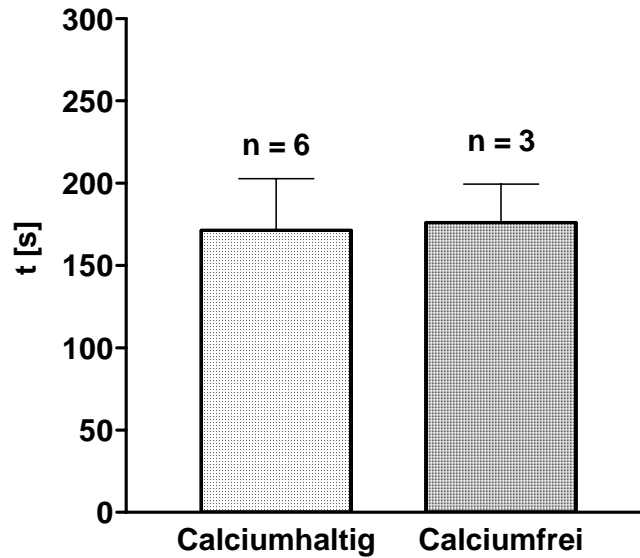


Abb. 13: Vergleich der Ergebnisse der Spülversuche bei Verwendung von calciumhaltiger und calciumfreier Lösung. Y-Achse: Zeitdifferenz zwischen Einschalten der Spülung und Verschluss der letzten Pore (\pm SEM). X-Achse: verwendete Lösungen, E_1 -Lösung (calciumhaltig), E_{1Ba} -Lösung (calciumfrei). Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Das Verschwinden der Poren ist somit unabhängig von aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma einströmenden Calciumionen.

3.5.3 Einfluss zytoskelettaler Komponenten

Um nun zu verifizieren, ob es sich beim Verschwinden der Poren um ein von der Zelle aktiv im Sinne von Endozytose initiierten Vorgang handelt, wurden Experimente mit Inhibitoren zytoskelettaler Komponenten durchgeführt, die an zellulären endozytotischen Prozessen beteiligt sein könnten. Dazu wurde zunächst Cytochalasin D eingesetzt. Cytochalasin ist ein Pilzmetabolit. Es durchdringt die Zellmembran und bindet an die Aktinfilamente, an denen es den Polymerisierungs-Depolymerisierungs-Zyklus hemmt (Cooper 1987). Aktin ist ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts und vor allem bei der Endozytose involviert (Qualmann et al. 2000; Conner & Schmid 2003). Um die Aktinpolymerisation der HEK293-Zellen zu hemmen, wurden die Zellen 30 Minuten mit 1 μ M Cytochalasin D vorinkubiert. Auch die E_1 -Spüllösung wurde mit 1 μ M Cytochalasin versetzt.

Abbildung 14 B zeigt einen Vergleich der mit Cytochalasin D behandelten Zelle im Vergleich zur Kontrollzelle (Abb. 14 A). Nach Einschalten der mit Cytochalasin D versetzten E_1 -Spüllösung dauerte es 317 ± 88 s ($n=4$), in Kontroll-Experimenten 205 ± 37 s ($n=4$), bis sich alle Poren wieder verschlossen hatten. Zwischen beiden Werten besteht kein signifikanter Unterschied.

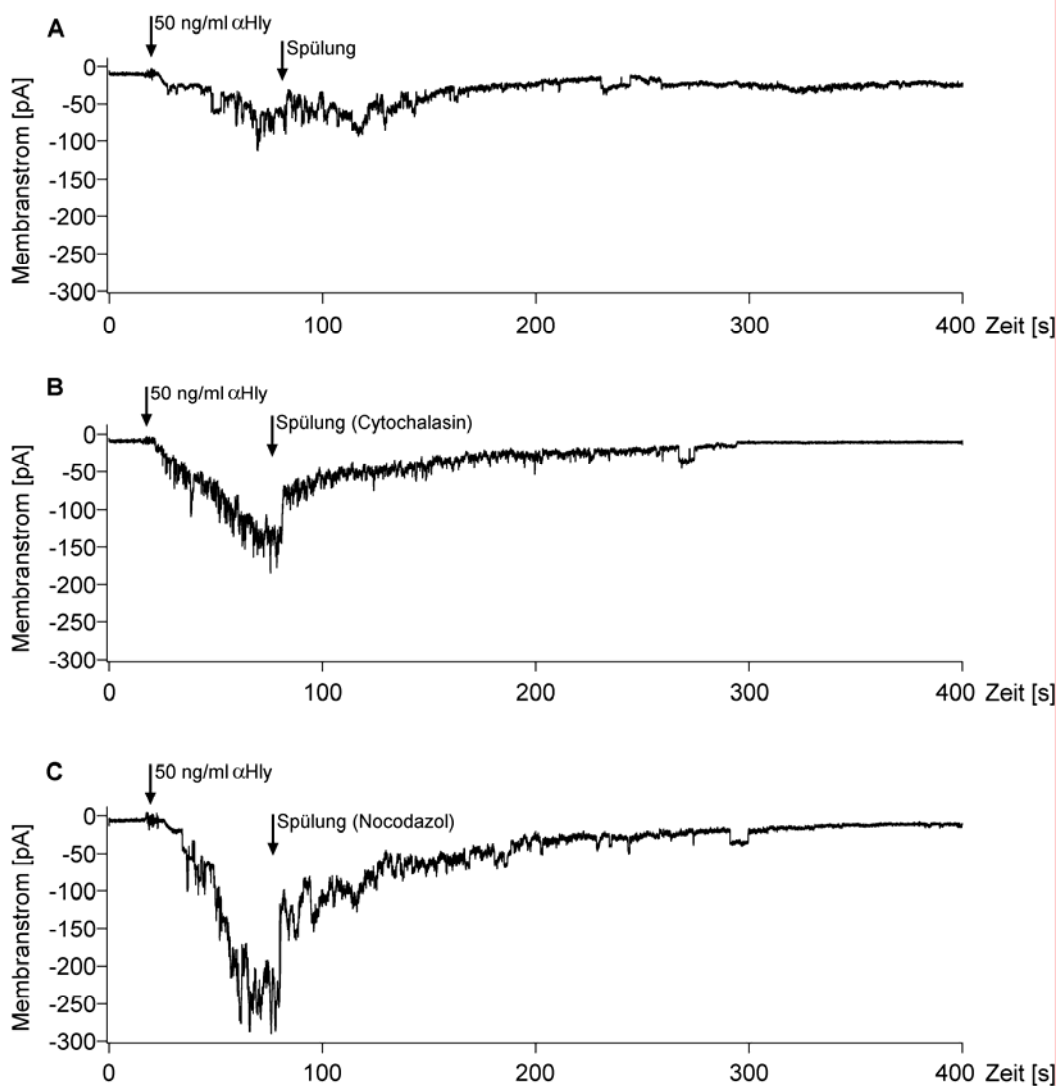


Abb. 14: Einfluss von **(B)** Cytochalasin D oder **(C)** Nocodazol auf die Reversibilität der Porenbildung durch Spülung mit toxinfreier Extrazellulärerlösung im Vergleich zum **(A)** Kontroll-Experiment. 1. Pfeil: Applikation von 50 ng/ml α Hly, 2. Pfeil: Spülung mit toxinfreier Extrazellulärerlösung. Die toxinfreie E_1 -Spüllösung enthielt **(B)** 1 μ M Cytochalasin bzw. **(C)** 10 μ M Nocodazol. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärerlösung: E_1 , Intrazellulärerlösung: IBL_{100n}.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Reversibilität der gebildeten Poren unabhängig von der Aktinpolymerisation ist.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes sind die Mikrotubuli. Sie kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. In Verbindung mit Aktin sind Mikrotubuli die wichtigsten Komponenten bei der Endozytose und dem anschließenden intrazellulären Transport dieser Vesikel (Apodaca 2001). Um den Einfluss der Mikrotubuli an der Reversibilität der durch α Hly gebildeten Poren zu untersuchen, wurde die Polymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol gehemmt. In nanomolaren Konzentrationen hemmt Nocodazol die Polymerisation der Mikrotubuli, während es in mikromolaren Konzentrationen zusätzlich zu einer Depolymerisation schon vorhandener Mikrotubuli kommt (Vasquez et al. 1997). Die HEK293-Zellen wurden 30 Minuten mit 10 μ M Nocodazol vorinkubiert. Zusätzlich enthielt auch die Spüllösung Nocodazol (10 μ M). Abbildung 14 C zeigt ein typisches Experiment einer mit Nocodazol behandelten HEK293-Zelle. Nach Einschalten der mit Nocodazol versetzten Spülung dauerte es 232 ± 4 s ($n = 3$) bis sich alle Poren wieder verschlossen hatten. Auch bei den Experimenten mit Nocodazol zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Zeitintervalls zwischen Beginn der Spülung und dem vollständigen Verschwinden der Poren.

Bei den Experimenten fiel jedoch auf, dass die Porenbildung unter dem Einfluss von Cytochalasin D (Abb. 14 B) oder Nocodazol (Abb. 14 C) im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 14 A) wesentlich verstärkt wird. Um diese Wirkung der verstärkten Porenbildung darzustellen, wurde die Porenbildung/min vor Einschalten der Spülung gemessen. Während in den Kontrollzellen 9 ± 2 Poren pro Minute gebildet wurden ($n=4$), erhöhte sich dieser Wert auf 67 ± 2 ($n=4$) bei Vorinkubation mit Cytochalasin D bzw. auf 56 ± 20 ($n=3$) bei Vorinkubation mit Nocodazol. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse vergleichend in einem Diagramm. So war die Porenbildung/min signifikant unter Vorinkubation mit Cytochalasin D ($p \leq 0.001$) und Nocodazol ($p \leq 0,05$) gegenüber den Kontroll-Experimenten erhöht.

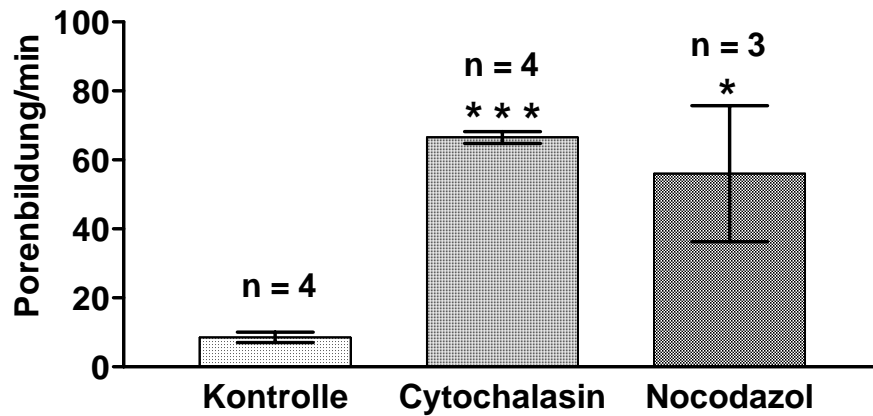


Abb 15: Einfluss von Cytochalasin D und Nocodazol auf die Porenbildung. Die HEK293-Zellen wurden 30 Minuten mit 1 μ M Cytochalasin bzw. 10 μ M Nocodazol vorinkubiert. Y-Achse: Porenbildung/min vor Einschalten der Spülung. Die Porenbildung/min erhöhte sich gegenüber den Kontrollen signifikant bei Vorinkubation mit Cytochalasin D ($p \leq 0,001$) bzw. Nocodazol ($p \leq 0,05$).

Die Porenbildung/min durch α Hly ist an den HEK293-Zellen unter Cytochalasin D Einfluss um den Faktor acht und unter Nocodazol Einfluss um den Faktor sieben erhöht. Offensichtlich führt eine Destabilisierung des Zytoskeletts zu einer Verschiebung des Gleichgewicht zwischen Porenöffnungen und Porenschlüssen, zu Gunsten der Porenöffnungen.

3.6 Kinase-Inhibitoren

An der Bildung bzw. Schließung der durch α Hly-Poren könnten auch intrazelluläre Signalkaskaden beteiligt sein. Diese Hypothese sollte exemplarisch in Experimenten mit MAP-Kinasen (**Mitogen-Activated Protein Kinasen**) und Tyrosinkinase untersucht werden, da Mitglieder dieser Kinase-Familien an verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. der Zellmotilität, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose (Johnson et al. 1996; Pearson et al. 2001) beteiligt sind.

Für die Versuche wurden der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein (Akiyama et al. 1987), der MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 (Sugden & Clerk 1997) und der MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor UO 126 (Duncia et al. 1998; Favata et al. 1998) verwendet. Genistein wurde in einer Konzentration von 100 μ M, SB 203580 und UO 126 jeweils in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Experimente wurden mit zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Dabei wurden die HEK293-Zellen im Inkubator jeweils entweder 30 Minuten oder 24 Stunden mit den Inhibitoren vorinkubiert. Kontrollzellen wurden parallel ohne die Inhibitoren, aber mit dem verwendeten Lösungsmittel DMSO inkubiert. Zur Auswertung wurden die Parameter Porenbildung/min oder die durch die α Hly-Poren fließende Ladung herangezogen. Keiner der Parameter zeigte eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Beteiligung der Tyrosinkinase oder der intrazellulären Kinase-Kaskade an der Porenbildung bzw. am Schließungsverhalten der Poren ist somit unwahrscheinlich.

3.7 Blockade der α -Hämolyisin-Porenströme

Nach der Charakterisierung der α Hly-Porenbildung sollte nun nach Substanzen gesucht werden, die α Hly-Porenströme blockieren können und möglicherweise klinisch im Rahmen einer Therapie eingesetzt werden könnten.

3.7.1 Farbstoffe

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe (Bittenbring 2006) konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff Eosin Y die durch Listeriolysin induzierten Porenströme blockieren kann. Daher wurden nun verschiedene Farbstoffe auf eine mögliche Blockade von α Hly-Porenströme geprüft. Abbildung 16 zeigt exemplarisch Originalregistrierungen von zwei Experimenten aus dieser Versuchsreihe.

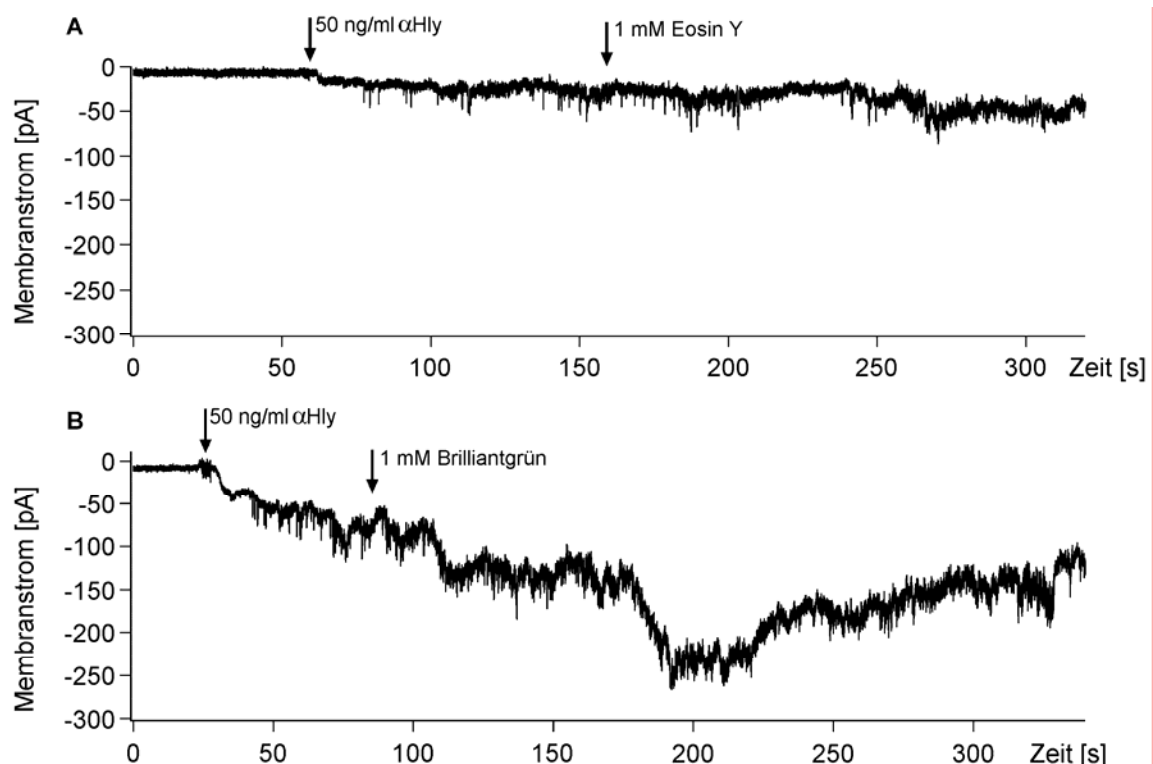


Abb. 16: Einfluss von (A) 1 mM Eosin Y und (B) 1 mM Brilliantgrün auf die α Hly-Porenströme nach Applikation von 50 ng/ml α Hly. Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E₁, Intrazellulärlösung: IBL_{100n}.

Nach Applikation von 50 ng/ml α Hly kommt es jeweils zur Zunahme des Membranstroms der HEK293-Zellen. Die anschließende Applikation von Eosin Y (n=3) bzw. Brilliantgrün (n=3) führten jedoch zu keiner Blockade der Membranströme. Auch die Farbstoffe Fuchsin (n=4), Säurefuchsin (n=3), Gentianaviolett (n=4) und Methylblau (n=3), die alle in einer Konzentration bis 1 mM eingesetzt wurden, hatten keinen Einfluss auf die durch α Hly induzierten Membranströme.

3.7.2 Dihydropyridine

In der Publikation von Uhlen et al. (2000) wurde beschrieben, dass α Hly von *E. coli* an L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bindet, diese aktiviert und zu Calcium-Oszillation in Nierenzellen führt. Weiterhin wird beschrieben, dass diese Calcium-Oszillationen durch Nifedipin blockiert werden kann. Um zu überprüfen, ob dies durch eine Blockade der α Hly-Porenströme zustande kommt, wurden als potentielle Blocker für α Hly-Poren Nifedipin und Nicardipin aus der Gruppe der Dihydropyridine eingesetzt. Die HEK293-Zellen wurden dazu mit 62,5 μM Nifedipin oder Nicardipin für 30 Minuten vorinkubiert. Die anschließende Applikation von 50 ng/ml α Hly führte jedoch zu keiner veränderten Porenbildung durch α Hly (n=3).

3.7.3 Lanthanoide

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass die dreiwertigen Ionen Lanthan (La^{3+}), Gadolinium (Gd^{3+}) und Ytterbium (Yb^{3+}) aus der Gruppe der Lanthanoide, die durch Listeriolysin (Bittenbring 2006), Pneumolysin (Schramm 2005) und durch bestimmte virale Proteine (Koschinski et al. 2005) induzierten Porenströme blockieren können.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch für Lanthan typische Originalregistrierungen der Membranströme von drei HEK293-Zellen nach Applikation von 50 ng/ml α Hly und anschließender Applikation von La^{3+} in verschiedenen Konzentrationen.

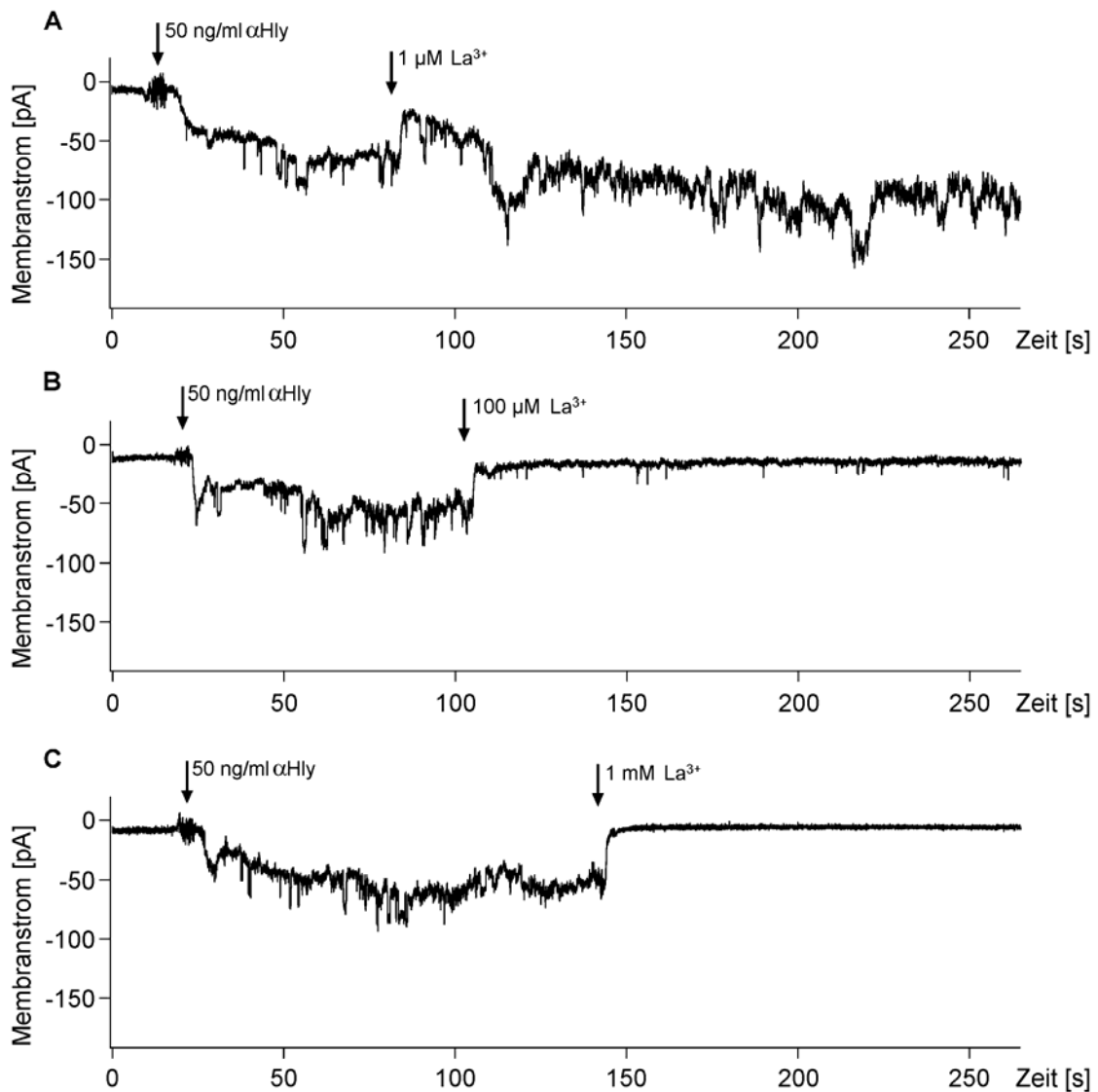


Abb. 17: Konzentrationsabhängige Blockade der durch α Hly (50 ng/ml) an HEK293-Zellen ausgelösten Membranströme durch La^{3+} . **(A)** 1 μM La^{3+} , **(B)** 100 μM La^{3+} und **(C)** 1 mM La^{3+} . Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: $\text{IBL}_{100\text{n}}$.

Nach Applikation von 50 ng/ml α Hly ist zunächst eine Porenbildung und die daraus resultierende Zunahme des Membranstroms zu erkennen. Bei anschließender Applikation von La^{3+} in Konzentrationen von 1 μM , 100 μM und 1 mM ist eine konzentrationsabhängige Blockade der Membranströme zu sehen. Konzentrationen von 1 μM und 10 μM (nicht gezeigt) haben noch keinen Einfluss

auf die Porenströme. Eine Lanthan-Konzentration von 100 μM reduziert den Membranstrom zwar annähernd auf das Ausgangsniveau, doch sind im weiteren Verlauf der Membranstromregistrierung noch sehr wenige Porenöffnungen zu sehen, die durch Lanthanionen innerhalb von 100 ms sofort wieder verschlossen werden. Bei einer Konzentration von 1 mM La^{3+} sind diese kurzen Porenöffnungen nicht mehr zu registrieren. Alle drei getesteten Lanthanoide blockierten den durch αHly ausgelösten Membranstrom. Abbildung 18 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven für La^{3+} , Gd^{3+} , und Yb^{3+} . Als Parameter für die Wirkung der Lanthanoide wurde die Blockade des Membranstroms in Prozent herangezogen.

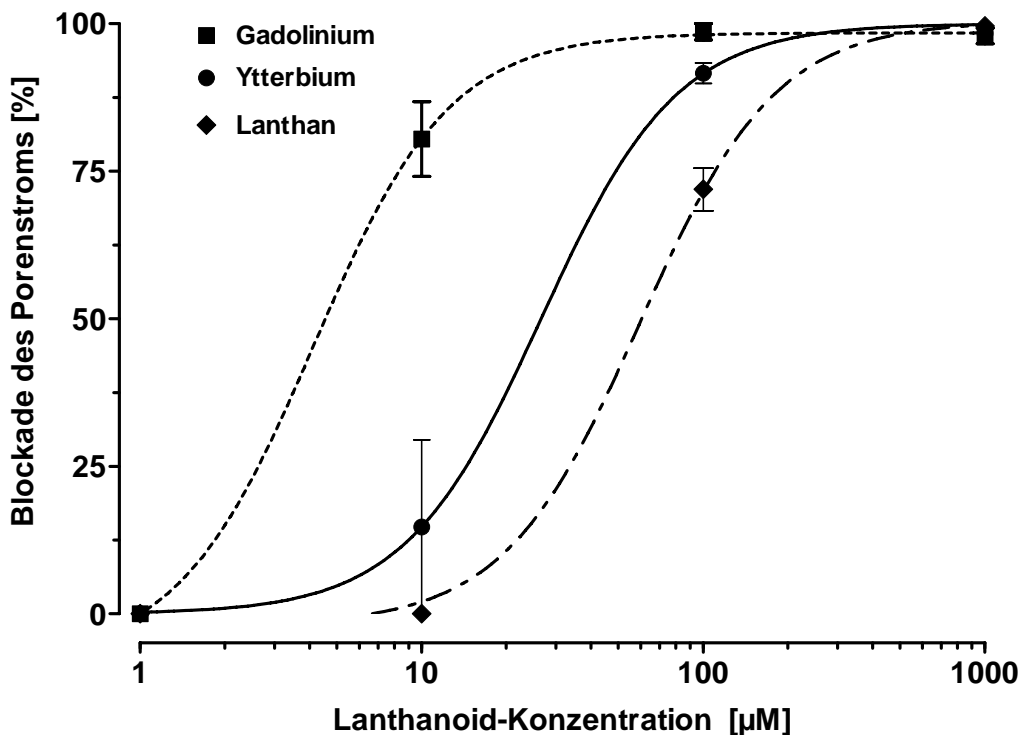


Abb. 18: Konzentrationsabhängigkeit der Blockade des αHly -Porenstroms durch verschiedene Lanthanoide. Y-Achse: Hemmung Porenstroms in %. X-Achse: Konzentrationen der Lanthanoide in μM . Die Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung (siehe Abb. 5) nach dem Least-Squares-Fit-Verfahren an die Messwerte angepasst. αHly -Konzentration: 50 ng/ml Membranpotential: -40 mV, Temperatur: 21°C, Extrazellulärlösung: E_1 , Intrazellulärlösung: $\text{IBL}_{100\text{n}}$.

Aufgrund der fehlenden Daten für Gd^{3+} und La^{3+} im steilen Bereich der Konzentrations-Wirkungskurven wurde der Hill-Koeffizient auf 1,8 festgesetzt, da dieser Wert bereits aus Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit Pneumolysin (Schramm 2005) ermittelt wurde. Der EC_{50} -Wert betrug für Gadolinium $4,1 \pm 1 \mu\text{M}$, für Ytterbium $26,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$ und für Lanthan $59,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$.

4 Diskussion

Es ist bereits seit 20 Jahren bekannt, dass α -Hämolysin (α Hly) von *Escherichia coli* porenbildende Eigenschaften besitzt (Bhakdi et al. 1986). α Hly ist ein Mitglied der RTX (**R**epeats in **T**oxin) Familie und wird meist von uropathogenen *E. coli* Stämmen produziert (Hacker et al. 1983; Smith & Huggins 1985). Die ersten elektrophysiologischen Experimente mit α Hly wurden an künstlichen Lipidmembranen durchgeführt (Benz et al. 1989). In der vorliegenden Arbeit wurden die porenbildenden Eigenschaften von α Hly mit Hilfe der Patch-Clamp Technik an Membranen lebender Zellen charakterisiert. Hierzu wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) benutzt, die sich aufgrund ihrer geringen endogenen Ionenkanalaktivität sehr gut für Untersuchungen zur porenbildenden Wirkung von Toxinen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik eignen. Diese elektrophysiologischen Messungen erlaubten es, die Porenbildung und die Porenkinetik von α Hly in Echtzeit zu analysieren und Substanzen zu finden, welche die Porenbildung bzw. das Schließen offener Poren beeinflussen.

Bei den Experimenten mit α Hly in der Whole-Cell-Messkonfiguration an HEK293-Zellen zeigte sich, dass es bereits innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe des Toxins zur Porenbildung kommt. Die Poren zeigen ein sehr schnelles Öffnungsverhalten, wie es auch bereits für andere, in unserer Arbeitsgruppe charakterisierte Toxine, wie Listeriolysin (LLO) und Pneumolysin (PLY) aus der CDTX (**C**holesterol-**D**ependent **T**oxin) Gruppe, beobachtet wurde. Auch das Schließen der offenen Poren erfolgt schlagartig, d.h. innerhalb weniger Millisekunden. Dies ist ein eindeutiger Unterschied zu den durch LLO oder PLY gebildeten Poren. Bei diesen Toxinen waren auch langsame Porenschlüsse zu beobachten, die sich über mehrere Sekunden erstreckten (Repp et al. 2002). So verschlossen bei PLY 28% der PLY-Poren langsam und 44% schlagartig (Schramm 2005). Die durch LLO gebildeten Poren verschlossen sich zu 70% langsam und zu 30% schlagartig (Butler 2005). Im Gegensatz dazu zeigen die durch α Hly gebildeten Poren demnach ein Öffnungs- und Schließungsverhalten, wie man es typischerweise auch bei endogenen Ionenkanälen findet.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass α Hly an endogene Ionenkanäle bindet und sie öffnet. Für α Hly wurde von einer schwedischen Arbeitsgruppe postuliert, dass das Toxin spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle öffnet und es dadurch zu einem Influx von Calciumionen in die Zelle kommt (Uhlen et al. 2000). Diese Arbeitsgruppe hatte jedoch keine elektrophysiologischen Messungen durchgeführt, sondern ihre Hypothese basierte alleine darauf, dass Nifedipin, ein spezifischer Calciumkanalblocker, eine hemmende Wirkung auf die durch α Hly induzierten Calcium-Oszillationen zeigte.

In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten, mit Hilfe von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten, die Ergebnisse von Uhlen et al. (2000) als Artefakte aufgedeckt werden (Koschinski et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Nifedipin die Calcium-Oszillationen nicht selbst hemmt, sondern dass die Hemmung wahrscheinlich durch Metabolite des lichtempfindlichen Nifedipin zustande kommt. Auch Nicardipin, ein weiterer Calciumkanalblocker aus der Gruppe der Dihydropyridine, allerdings mit wesentlich geringerer Lichtempfindlichkeit und höherer Hydrophilie als Nifedipin, war ohne Wirkung auf die Porenbildung durch α Hly. Es ist also bisher unklar, wie das Öffnungs- und Schließungsverhalten der α Hly-Poren zustande kommt. Denkbar wäre, dass die Insertion von α Hly sehr schnell reversibel ist oder dass die α Hly-Pore durch Konformationsänderung in einen inaktiven Zustand übergeht. Mögliche wäre auch, dass die α Hly-Poren durch endozytotische Prozesse aus der Zellmembran sehr schnell wieder entfernt werden.

Bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Porenbildung durch α Hly wurde als Parameter für die Toxinwirkung die Anzahl der pro Minute gebildeten Poren benutzt. Die getesteten α Hly-Konzentrationen reichten von 6,25 bis 250 ng/ml. Dabei konnte eine halbmaximale effektive Konzentration EC_{50} -Wert von 47 ng/ml ermittelt werden, was einer sehr niedrigen Konzentration von 427 pM entspricht. Die Berechnung des Hill-Koeffizienten ergab einen Wert von 1,8. Dies lässt darauf schließen, dass mindestens zwei α Hly-Moleküle notwendig sind, um eine funktionelle Pore zu bilden. Bei den Experimenten zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zeigte sich auch, dass es ab einer α Hly-

Konzentration von 100 ng/ml vermehrt zu einer Bildung von „Blebs“ an den Zellmembranen und häufig innerhalb weniger Minuten nach der Applikation zur Zellyse kam. Blebs sind zytoplasmatische Ausstülpungen der Zellmembran und ein Hinweis darauf, dass das Zytoskelett fortschreitend geschädigt wird und die Zelle dadurch nicht mehr in der Lage ist, ihre Integrität aufrecht zu erhalten. Aus diesem Grund wurde für die meisten der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente eine Konzentration von 50 ng/ml gewählt. Bei dieser α Hly-Konzentration kam es auch bei längeren Messzeiten nicht zu einer Zellyse.

Die statistische Auswertung der Amplituden der durch die α Hly-Poren fließenden Ströme ergab ein einzelnes Maximum mit einem Wert von 18,5 pA bei einem Membranpotential von -40 mV. Daraus konnte eine Porenleitfähigkeit von 463 pS errechnet werden. Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Leitfähigkeit der durch LLO gebildeten Grundpore von 500 pS (Butler 2005) und etwa ein Drittel kleiner als die Leitfähigkeit der durch PLY gebildeten Grundpore von 680 pS (Schramm 2005). Ein auffallender Unterschied ist jedoch, dass bei LLO und PLY neben dieser Grundpore auch größere Poren existieren, deren Leitfähigkeit ganzzahlige Vielfache der Leitfähigkeit der Grundpore sind. Die von unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagene Erklärung für diese Beobachtung ist, dass sich LLO- bzw. PLY-Grundporen in der Zellmembran zu Clustern zusammenlagern und anschließend synchron öffnen bzw. schließen können (Butler 2005; Schramm 2005). Eine solche Clusterbildung mit synchronen Öffnungen und Schließen ist z.B. für Cl⁻-Kanäle schon seit einiger Zeit bekannt (Krouse et al. 1986; Larsen et al. 1996). Im Gegensatz zu LLO und PLY scheint also beim α Hly eine Kooperativität zwischen einzelnen Poren, die zu gleichzeitigem Öffnen und Schließen führen könnte, nicht zu existieren.

Von Dr. Walev / Prof. Bhakdi (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) wurden uns Punktmutanten des α Hly zu Verfügung gestellt. Bei beiden Mutanten wurde an der Aminosäureposition 690 Lysin durch Arginin ersetzt, bei der Δ AB Mutante zusätzlich auch an der Aminosäureposition 564. Dies hatte die Folge, dass an diesen Stellen keine

Fettsäuren-Acylierung mehr stattfinden kann. Bei der Untersuchung dieser beiden nicht-hämolytischen Punktmutanten ΔB und ΔAB des αHly zeigte sich zunächst, dass diese nicht zur Porenbildung fähig sind. Somit konnte gezeigt werden, dass Lysin an der Aminosäureposition 690 des Toxinmoleküls eine wichtige Funktion für die Porenbildung hat. Es bleibt aber noch unklar, ob die Aminosäure Lysin selbst oder ihre Fettsäuren-Acylierung, im Sinne einer posttranslationalen Modifikation, essentiell für die Porenbildung ist.

In weiteren Experimenten wurden diese Mutanten dann auch genutzt um die Frage zu klären, ob zur Bildung einer funktionellen Pore mehrere αHly -Moleküle interagieren müssen. Für das Zytotoxin von *Bacillus anthracis* wurde gezeigt, dass nicht-zytolytische Toxinmutanten mit dem Wildtyp-Toxin interagieren und dadurch die Porenbildung inhibieren können. Dies bedeutet, dass offensichtlich mehrere Anthraxtoxin-Moleküle bei der Bildung einer funktionellen Pore zusammenwirken (Sellmann et al. 2001; Singh et al. 2001). Dies könnte auch klinische Relevanz bei der Therapie einer *Bacillus-anthraxis*-Infektion erhalten, wenn sich durch Applikation der Toxinmutanten die zytotoxischen Effekte von Anthraxtoxin reduzieren ließen (Sellmann et al. 2001). Für αHly zeigte sich, dass die Applikation einer Mischung des Wildtyp-Toxin, in einer Konzentration von 6,25 ng/ml, und der Mutanten ΔB bzw. ΔAB , in Konzentrationen von 50 ng/ml, zu einer signifikanten Reduktion der Porenbildung im Vergleich zum Wildtyp-Toxin alleine führte. Offensichtlich wirkt sich die Anwesenheit der zwar bindenden, aber nicht porenbildenden αHly -Mutanten inhibierend auf die Bildung funktioneller αHly -Poren aus. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Toxinmutanten des αHly die Wahrscheinlichkeit reduzieren, dass sich Wildtyp-Toxinmoleküle finden und eine funktionelle Pore bilden können. Möglich wäre aber auch, dass es zu einer Interaktion zwischen Mutanten und Wildtyp-Toxin kommt, wodurch nicht-funktionsfähige Poren gebildet werden. Wie für Anthraxtoxin könnte diese Beobachtung klinische Relevanz haben, da solche nicht porenbildenden αHly -Moleküle eventuell für eine Therapie genutzt werden könnten. Die Ergebnisse der Versuche mit Mutanten des αHly weisen also darauf hin, dass wahrscheinlich zwei oder mehr Toxinmoleküle zur Bildung einer αHly -Pore notwendig sind. Diese Interpretation steht auch in Übereinstimmung mit dem bei den Konzentrations-

Wirkungs-Messungen ermittelten Hill-Koeffizienten von 1,8, der auch auf eine Interaktion von mindestens zwei α Hly-Molekülen hinweist. Eine Bildung funktionseller Poren allein durch α Hly-Toxinmonomere, wie bei der Entdeckung der porenbildenden Eigenschaften von α Hly von Bhakdi et al. (1986) postuliert wurde, ist damit unwahrscheinlich.

Die Porenbildung durch α Hly in der Zellmembran von HEK293-Zellen ist reversibel. Nach Applikation einer sublytischen Konzentration des α Hly und anschließender Umspülung der HEK293-Zellen mit toxischer Extrazellulärlösung konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb von ca. 3 Minuten alle Poren wieder verschlossen haben und der Membranstrom auf das Ausgangsniveau zurückkehrt ist. Mögliche Ursachen für das Verschwinden der Poren könnten sein, dass sie aktiv durch zelluläre Prozesse wie Endozytose, oder passiv durch Dissoziation in die Extrazellulärlösung aus der Zellmembran entfernt werden. Denkbar wäre auch, dass die Toxinmoleküle zwar in der Zellmembran verbleiben, die oligomere Porenstruktur aber zerfällt, so dass kein Ladungsfluss mehr stattfinden kann.

Um die Frage zu klären, welche zellulären Prozesse am Verschwinden bzw. Verschluss der Poren beteiligt sein könnten, wurden zunächst Versuche mit Cytochalasin D und Nocodazol durchgeführt. Cytochalasin ist ein Pilzmetabolit. Es durchdringt die Zellmembran und bindet an die Aktinfilamente, an denen es den Polymerisierungs-Depolymerisierungs-Zyklus hemmt (Cooper 1987). Aktin ist ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts und vor allem bei der Endozytose involviert (Qualmann et al. 2000; Conner & Schmid 2003). Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts sind die Mikrotubuli. Sie kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. In Verbindung mit Aktin sind Mikrotubuli die wichtigsten Komponenten bei der Endozytose und dem anschließenden intrazellulären Transport dieser Vesikel (Apodaca 2001). Um den Einfluss der Mikrotubuli an der Reversibilität der durch α Hly gebildeten Poren zu untersuchen, wurde die Polymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol gehemmt. In nanomolaren Konzentrationen hemmt Nocodazol die Polymerisation der Mikrotubuli, während es in mikromolaren Konzentrationen zusätzlich zu einer Depolymerisation schon vorhandener Mikrotubuli kommt (Vasquez et al. 1997). In den mit Cytochalasin D bzw.

Nocodazol behandelten Zellen kam es allerdings zu keinen signifikanten Veränderungen der für das „Auswaschen“ der α Hly-Poren benötigten Zeiten gegenüber den Kontrollzellen, die nur mit α Hly inkubiert waren. Somit konnte gezeigt werden, dass zumindest bei der Reversibilität der α Hly-Porenbildung endozytotische Prozesse keine Rolle spielen.

Unter Verwendung einer calciumfreien, aber bariumhaltigen Extrazellulärlösung sollte dann untersucht werden, ob der nach der Porenbildung entstehende Calcium-Influx Einfluss auf die Reversibilität der durch α Hly gebildeten Poren hat. Bei Versuchen mit calciumfreier Extrazellulärlösung kam es allerdings zu keiner signifikanten Veränderung der Zeitdifferenz vom Einschalten der Spülung bis zum Verschluss aller Poren im Vergleich zu calciumhaltiger Extrazellulärlösung. Die Reversibilität der durch α Hly gebildeten Poren ist somit unabhängig von aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma einströmenden Calciumionen.

Bei den Experimenten mit Cytochalasin D und Nocodazol zeigte sich jedoch, dass sich in den unbehandelten Kontrollzellen bei gleicher α Hly-Konzentration signifikant weniger Poren/min bildeten als in den Zellen, deren Zytoskelettumbau durch eine Blockade zytoskelettaler Schlüsselmoleküle wie Aktin oder Tubulin gestört waren. Unter Cytochalasin D als Blocker des Aktin-Zytoskeletts wurden etwa achtfach und unter Nocodazol als Tubulinblocker etwa siebenfach mehr Poren/min registriert. Dies spricht dafür, dass eine Destabilisierung des Zytoskeletts das Gleichgewicht zwischen den Porenöffnungen und Porenschlüssen zu Gunsten der Porenöffnungen verschiebt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Destabilisierung des Zytoskeletts eine Hemmung der Endozytose bewirkt, was dazu führen könnte, dass weniger Poren verschlossen bzw. aus der Zellmembran entfernt werden.

Da eine Destabilisierung des Zytoskeletts auch eine Voraussetzung für die Motilität von Zellen ist, wurde bei der weiteren Suche nach der Beteiligung möglicher zellulärer Faktoren an der Bildung der α Hly-Poren der Einfluss verschiedener zellulärer Kinasen untersucht. Hierzu wurden Inhibitoren eingesetzt, die MAP-Kinasen (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein Kinasen) bzw. Tyrosinkinasen blockieren können, da Mitglieder dieser Kinase-Familien u.a. auch an der

Zellmotilität (Johnson et al. 1996; Pearson et al. 2001) beteiligt sind. Dazu wurden die Zellen mit dem MAP-Kinase (MAPK) Inhibitor SB203580 (Sugden & Clerk 1997), der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) Inhibitor UO126 (Duncia et al. 1998; Favata et al. 1998) und dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein (Akiyama et al. 1987) inkubiert, bevor α Hly in einer sublytischen Konzentration appliziert wurde. Zur Auswertung wurden die Parameter Porenbildung/min und die durch die Poren fließende Ladung herangezogen. Es kam jedoch bei beiden untersuchten Parametern nicht zu signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen. Daher erscheint eine Beteiligung der MAP-Kinase-Kaskade und von Tyrosinkinasen insgesamt an der Bildung von α Hly-Poren bzw. am Verschluss offener α Hly-Poren unwahrscheinlich.

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Substanzen, die α Hly-Porenströme blockieren können. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Farbstoffe Eosin Y sowie bestimmte dreiwertigen Kationen die durch LLO in Membranen von Säugerzellen induzierten Porenströme blockieren können (Bittenbring 2006). Farbstoffe werden hauptsächlich in der Dermatologie zur lokalen Therapie eingesetzt. Ihnen wird allerdings, vor allem auf der Ebene der Erfahrungsmedizin, eine adstringierende, antibakterielle und antimykotische Wirkung zugeschrieben. Der Farbstoff Methylenblau wird seit kurzem in der Behandlung septischer Patienten erprobt (Evgenov et al 2001; Kirov et al 2001). Getestet wurden an den HEK293-Zellen die Farbstoffe Eosin-Y, Brilliantgrün, Fuchsin, Säurefuchsin, Gentianaviolett und Methylenblau bis zu einer Konzentration von 1 mM. Bei höheren Konzentrationen kam es zu Eigeneffekten der Farbstoffe, wahrscheinlich durch die höhere Osmolaritäten der hochkonzentrierten Farbstofflösungen bedingt. Keiner der untersuchten Farbstoffe hatte jedoch einen Einfluss auf die α Hly-Porenströme. Auch der Farbstoff Eosin-Y, mit dem LLO-Porenströme blockiert werden konnten (Bittenbring 2006), hatte keinen Einfluss auf die α Hly-Porenströme.

Eine Blockade von offenen α Hly-Poren konnte allerdings für die dreiwertigen Lanthanoide Lanthan, Gadolinium und Ytterbium nachgewiesen werden. Gadolinium hatte dabei die höchste Potenz mit einem EC_{50} -Wert von 4,1 μ M.

Für Ytterbium lag der EC_{50} -Wert für die halbmaximale Blockade der durch die α Hly-Poren fließenden Ströme bei 26,6 μ M und für Lanthan bei 59,6 μ M.

Der bisherige Einsatz der Lanthanoide in der Medizin ist begrenzt. Gadolinium wird in der Radiologie als Kontrastmittel bei der Magnet-Resonanz-Tomographie eingesetzt (Spinosa et al. 2002). Dort ist Gadolinium jedoch an einen Chelator gebunden. Lanthan wird in jüngster Zeit auf seine mögliche zytostatische Wirkung untersucht (Wang et al. 2000; Wang et al. 2002). Außerdem wird es seit kurzem erfolgreich in der Therapie der Hyperphosphatämie eingesetzt (Finn et al. 2004; Hutchison et al. 2004). Ytterbium wurde in der Medizin bisher wenig erforscht. Patienten mit uropathogenen *E.coli*-Infektionen könnten in Zukunft von diesen Porenblockern profitieren. Dies wäre ein großer Fortschritt in der Therapie, denn die hämo- bzw. zytolytische Wirkung des α Hly ist einer der Hauptpathogenitätsmechanismen dieser Bakterien. Durch die Hämo- bzw. Zytolyse kann sich die Infektion zunächst im Gewebe ausbreiten und dann sogar zur Sepsis führen. Eine Blockade von offenen α Hly-Poren stellt daher eine mögliche Therapieoption dar, um neben der antibiotischen Therapie Patienten mit lebensbedrohlichen *E.coli*-Infektionen zu behandeln. Die Untersuchung von Lanthanoiden im Sepsis-Modell der Maus könnte ein erster Schritt sein, um den Nutzen einer Porenblockade zu prüfen.

5 Zusammenfassung

α -Hämolysin (α Hly) ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli*. α Hly wird meist von uropathogenen *E. coli* Stämmen produziert und kann neben einer direkten Zellyse auch eine Reihe von sekundären Zellreaktionen auslösen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Porenbildung durch α Hly elektrophysiologisch an humanen embryonalen Nierenzellen charakterisiert. Für die halbmaximale Porenbildung durch α Hly wurde ein EC_{50} -Wert von 47 ng/ml ermittelt, was der sehr niedrigen Konzentration von 427 pM entspricht. Der Hill-Koeffizient aus der Konzentrations-Wirkungsbeziehung betrug 1,8, was dafür spricht, dass mindestens zwei α Hly-Moleküle an der Bildung einer funktionellen Pore beteiligt sind. Es zeigte sich, dass die α Hly-Poren ausschließlich schnelle Öffnungen und Schlüsse aufweisen, womit sich ihre Porenkinetik von anderen in unserer Arbeitsgruppe bereits charakterisierten Toxinen, wie Listeriolysin und Pneumolysin, deutlich unterscheidet. Die Amplitudenverteilung der α Hly-Porenströme ergab ein einzelnes Maximum mit einem Wert von 18,5 pA bei einem Membranpotential von -40 mV, womit sich für die einzelne α Hly-Pore eine Porenleitfähigkeit von 463 pS errechnet.

Mit Hilfe der Punktmutanten ΔB und ΔAB konnte eine für die Porenbildung essentielle Aminosäure an Position 690 des α Hly-Moleküls identifiziert werden. Es bleibt aber noch unklar, ob die Aminosäure Lysin selbst oder ihre Fettsäuren-Acylierung, im Sinne einer posttranslationalen Modifikation, essentiell für die Porenbildung ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ein Mix aus Toxinmutante ΔB bzw. ΔAB und Wildtyp-Toxin im Vergleich zum Wildtyp-Toxin alleine zu einer signifikant verminderten Porenbildung führte. Dies spricht ebenso, wie der ermittelte Hill-Koeffizient, für eine Beteiligung von mehreren α Hly-Molekülen an der Bildung einer funktionellen Pore.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Porenbildung durch α Hly reversibel ist. Die Hemmung der zytoskelettalen Komponenten Aktin und Tubulin führt zu einer signifikant erhöhten Zahl offener Poren/min. Dies könnte dafür sprechen, dass am Verschluss offener α Hly-Poren aktin- bzw. tubulin-abhängige endozytotische

Prozesse beteiligt sind. Auf eine Beteiligung von Tyrosinkinasen und MAP-Kinasen an der Porenbildung durch α Hly ergaben sich in den durchgeführten Experimenten hingegen keine Hinweise.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Substanzen auf eine mögliche Blockade offener α Hly-Poren untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Farbstoff Eosin Y, der offene Listeriolysin-Poren blockiert, keinen Einfluss auf α Hly-Poren hat. Auch die Farbstoffe Brilliantgrün, Fuchsin, Säurefuchsin, Gentianaviolett und Methylenblau, sowie die Calciumkanalblocker Nifedipin und Nicardipin, hatten keinen Einfluss auf die α Hly-Poren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lanthanoide Gadolinium, Lanthan und Ytterbium α Hly-Poren blockieren können, wobei die EC_{50} -Werte für die halbmaximale Blockade des Porenstroms, im niedrigen mikromolaren Bereich lagen und Gadolinium die höchste Potenz zeigte. Patienten mit uropathogenen *E.coli*-Infektionen könnten in Zukunft von diesen Porenblockern profitieren. Auf der Basis unserer Daten müssen sich nun weitere Versuche, wie die Untersuchung von Lanthanoiden im Sepsis-Modell der Maus, anschließen.

Summary

α -Haemolysin (α Hly) is an essential virulence factor of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. α Hly is commonly produced by uropathogenic *E. coli* strains and can lead directly to cell lysis but also to several secondary cell responses. The present work characterizes electrophysiologically the pore formation by α Hly in human embryonic kidney cells. For halfmaximal pore formation by α Hly we found an EC_{50} -value of 47 ng/ml, which corresponds to a very low concentration of 427 pM. The Hill coefficient of the concentration-response relationship was 1.8, indicating that at least two α Hly molecules are necessary for the formation of a functional pore. α Hly pores exhibited only fast openings and closures, making this pore kinetics very different from the one of other toxins recently characterized in our group, such as listeriolysin and

pneumolysin. The amplitude histogram of the α Hly pore currents showed a single maximum of 18,5 pA at a membrane potential of -40 mV, corresponding to a single pore conductance of 463 pS.

Using the mutants ΔB and ΔAB , a single residue that is essential for the pore forming ability of the α Hly molecule was identified at position 690. It is unclear yet whether the amino acid lysine itself or its fatty acid acylation, as a posttranslational modification, is essential for the pore formation. Furthermore, we showed that a mix of the mutants ΔB or ΔAB together with the wild-type toxin led to a significantly reduced pore formation compared to wild-type alone. This result, as well as the measured Hill coefficient, rules out the idea that a single α Hly molecule may be sufficient to form a functional pore.

The pore formation by α Hly is reversible. The inhibition of the cytoskeletal components actin und tubulin led to a significant increase in the number of open pores/min. This might indicate that actin- or tubulin-dependent endocytotic mechanisms are involved in the closure of open α Hly pores. In contrast, we did not find any indication for a possible involvement of tyrosine kinases or MAP kinases in the pore formation by α Hly.

Various substances were tested for their possible ability to block open α Hly pores. Eosin Y, a dye that blocks listeriolysin pores, had no influence on α Hly pores. This negative result was also observed for the dyes brilliant green, fuchsin, acid fuchsin, gentian violet and methylene blue, as well as for the calcium channel blockers nifedipine and nicardipine. In contrast, the lanthanoids gadolinium, lanthanum and ytterbium blocked α Hly pores with EC_{50} -values for halfmaximal blockade of the pore current in the low micromolar range, whereby gadolinium showed the highest potency. Patients who are infected by uropathogenic *E. coli* might benefit from these pore blockers in the future. On the basis of our results further experiments investigating the effects of lanthanoids, e.g. in the mouse sepsis model, are now necessary.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**, 5592-5595.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage: 799-843. Urban&Fischer München und Jena.
- Alouf, J. E., and Freer, J. H. (1999). The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Second Edition: 330-348. Academic Press London.
- Apodaca, G. (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**, 149-159.
- 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.
- Bauer, M. E., and Welch, R. A. (1996). Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* **64**, 4665-4672.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W., and Goebel, W. (1989). Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* **57**, 887-895.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium—a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A., and Hugo, F. (1989). Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* **169**, 737-754.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M., and Holland, I. B. (1986). *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* **52**, 63-69.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S., and Schmidt, G. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* **85**, 1746-1753.
- Bittenbring, J. (2006). Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin O induzierten Membranporen. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Boehm, D. F., Welch, R. A., and Snyder, I. S. (1990a). Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect Immun* **58**, 1951-1958.
- Boehm, D. F., Welch, R. A., and Snyder, I. S. (1990b). Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun* **58**, 1959-1964.
- Brockmeier D (1991) HOEGIP-PC: An interactive program package for the evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *User Manual. Internal Report, Hoechst AG, Frankfurt-Höchst.*
- Butler, R. S. (2005). Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* und chromosomaler Punktmutanten induzierten Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478.
- Duncia, J. V., Santella, J. B., 3rd, Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Fietze, W. E., Rankin, F. W., Sun, J. H., Earl, R. A., Tabaka, A. C., Teleha, C. A., Blom, K. F., Favata, M. F., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Horiuchi, K., Copeland, R. A., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M., Magolda, R. L., Trainor, G. L., Wexler, R. R., Hobbs, F. W., and Olson, R. E. (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* **8**, 2839-2844.
- Elliott, S. J., Srinivas, S., Albert, M. J., Alam, K., Robins-Browne, R. M., Gunzburg, S. T., Mee, B. J., and Chang, B. J. (1998). Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect Immun* **66**, 2040-2051.
- Evgenov, O.V., Sveinbjornsson, B., and Bjertnaes, L.J. (2001). Continuously infused methylene blue modulates the early cardiopulmonary response to endotoxin in awake sheep. *Acta Anaesthesiol Scand* **45**, 1246-1254.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**, 18623-18632.

- Felmlee, T., Pellett, S., and Welch, R. A. (1985). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J Bacteriol* **163**, 94-105.
- Finn, W. F., Joy, M.S. and Hladik, G. (2004). Efficacy and safety of lanthanum carbonate for reduction of serum phosphorus in patients with chronic renal failure receiving hemodialysis. *Clin Nephrol* **62**, 193-201.
- Gadeberg, O. V. and Orskov, I. (1984). In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect Immun* **45**, 255-260.
- Goebel, W. and Hedgpeth, J. (1982). Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **151**, 1290-1298.
- Grimminger, F., Rose, F., Sibelius, U., Meinhardt, M., Potzsch, B., Spriestersbach, R., Bhakdi, S., Suttorp, N., and Seeger, W. (1997). Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* **159**, 1909-1916.
- Grimminger, F., Scholz, C., Bhakdi, S., and Seeger, W. (1991). Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxigenase products in human neutrophils. *J Biol Chem* **266**, 14262-14269.
- Hacker, J., Hughes, C., Hof, H., and Goebel, W. (1983). Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect Immun* **42**, 57-63.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and 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.
- Hof, H., Robert, L. M., Dörries, R. (2000). Mikrobiologie: 373-376. Thieme Stuttgart.
- Hutchison, A. J., Speake, M. and Al-Baaj, F. (2004). Reducing high phosphate levels in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: a 4-week, dose-finding, open-label study with lanthanum carbonate. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 1902-1906.
- Jarchau, T., Chakraborty, T., Garcia, F., and Goebel, W. (1994). Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol Gen Genet* **245**, 53-60.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.

- Kayser, F. H., B., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (1998). Medizinische Mikrobiologie. 9. Auflage: 291-294. Thieme Stuttgart.
- Kenny, B., Chervaux, C., and Holland, I. B. (1994). Evidence that residues -15 to -46 of the haemolysin secretion signal are involved in early steps in secretion, leading to recognition of the translocator. *Mol Microbiol* **11**, 99-109.
- Kirov, M.Y., Evgenov, O.V., Evgenov, N.V., Egorina, E.M., Sovershaev, M.A., Sveinbjornsson, B., Nedashkovsky, E.V., and Bjertnaes, L.J. (2001). Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit Care Med* **29**, 1860-1867.
- Konig, B., Schonfeld, W., Scheffer, J., and Konig, W. (1990). Signal transduction in human platelets and inflammatory mediator release induced by genetically cloned hemolysin-positive and -negative *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **58**, 1591-1599.
- Koschinski, A., Repp, H., Ünver, B., Dreyer, F., Brockmeier, D., Valeva, A., Bhakdi, S. and Walev I. (2006). Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells--the pore is on its own. *Faseb J* **20**, 973-975.
- Koschinski, A., Wengler, G., Wengler, G. and H. Repp. (2005). Rare earth ions block the ion pores generated by the class II fusion proteins of alphaviruses and allow analysis of the biological functions of these pores. *J Gen Virol* **86**, 3311-3320.
- Krouse, M.E., Schneider, G.T., and Gage, P.W. (1986). A large anion-selective channel has seven conductance levels. *Nature* **319**, 58-60.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K., and Billings, P. C. (1997). RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* **272**, 30463-30469.
- Larsen, E.H., Gabriei, S.E., Stutts, M.J., Fullton, J., Price, E.M., and Boucher, R.C. (1996). Endogenous chloride channels of insect sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. *J Gen Physiol* **107**, 695-714.
- Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J., and Goebel, W. (1996). Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 5422-5430.
- Menestrina, G., Mauro, D. S., Lazarovici, P. (2003). Cellular & Molecular Mechanisms of Toxin Action. First Edition: 27-48. Taylor & Francis London and New York.

- Moayeri, M., and Welch, R. A. (1997). Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* **65**, 2233-2239.
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. and Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**, 1281-1289.
- Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**, 123-131.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183.
- Qualmann, B., Kessels, M. M., and Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**, F111-116.
- Repp, H., Pamukci, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., and Dreyer, F. (2002). Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell Microbiol* **4**, 483-491.
- Sakman B., Neher, E. (1995). Single-Channel Recording. Second Edition: 42-50. Plenum Press New York and London
- Schramm, P. (2005). Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Beeinflussung von durch Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae* gebildete Poren. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Sellman, B.R., Mourez, M., and Collier, R.J. (2001). Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science* **292**, 695-697.
- Singh, Y., Khanna, H., Chopra, A.P., and Mehra, V. (2001). A dominant negative mutant of *Bacillus anthracis* protective antigen inhibits anthrax toxin action in vivo. *J Biol Chem* **276**, 22090-22094.
- Smith, H.W., and Huggins, M.B. (1985). The toxic role of alpha-haemolysin in the pathogenesis of experimental *Escherichia coli* infection in mice. *J Gen Microbiol* **131**, 395-403.
- Spinosa, D. J., Kaufmann, J. A., and Hartwell, G. D. (2002). Gadolinium chelates in angiography and interventional radiology: a useful alternative to iodinated contrast media for angiography. *Radiology* **223**, 319-327.

- Stanley, P., Koronakis, V., and Hughes, C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 309-333.
- Stanley, P., Packman, L. C., Koronakis, V., and Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* **266**, 1992-1996.
- Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M. J., and Glossmann, H. (1998). Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 108-115.
- Sugden, P. H., and Clerk, A. (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* **9**, 337-351.
- Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W., and Bhakdi, S. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* **58**, 3796-3801.
- Uhlen, P., Laestadius, A., Jahnukainen, T., Soderblom, T., Backhed, F., Celsi, G., Brismar, H., Normark, S., Aperia, A., and Richter-Dahlfors, A. (2000). Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature* **405**, 694-697.
- Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **8**, 973-985.
- Wagner, W., Vogel, M., and Goebel, W. (1983). Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J Bacteriol* **154**, 200-210.
- Wang, Z. M., Lin, H. K., Zhu, S. R., Liu, T. F., and Chen, Y. T. (2002). Spectroscopy, cytotoxicity and DNA-binding of the lanthanum(III) complex of an L-valine derivative of 1,10-phenanthroline. *J Inorg Biochem* **89**, 97-106.
- Wang, Z. M., Lin, H. K., Zhu, S. R., Liu, T. F., Zhou, Z. F., and Chen, Y. T. (2000). Synthesis, characterization and cytotoxicity of lanthanum(III) complexes with novel 1,10-phenanthroline-2,9-bis-alpha-amino acid conjugates. *Anticancer Drug Des* **15**, 405-411.
- Weibull W (1951) A statistical distribution of wide applicability. *J Appl. Mechanics* **73**,293-297

Danksagung

Zunächst möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer danken, der es mir ermöglichte, in seinem Labor die vorliegende Arbeit zu absolvieren. Mit erstaunlich viel Geduld und Engagement hat er mich durch diese Arbeit begleitet. Dankbar bin ich ihm auch für sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft für mein Leben außerhalb der Wissenschaft.

Ganz besonders danken möchte ich auch Dr. Andreas Koschinski, der mir mit großer Leidenschaft die Patch-Clamp Technik nahe gebracht hat und mir bei auftretenden Problemen mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Sein Enthusiasmus in der Forschung ist ansteckend und war mir immer eine große Hilfe und Motivation im Laboralltag.

Herrn Dr. Holger Repp danke ich besonders für die große Hilfe in der Planung und Auswertung der Experimente. Er war mir stets ein sehr hilfsbereiter Ansprechpartner.

Danken möchte ich auch Frau Christiane Zibuschka, die mich in die Zellkultur eingewiesen hat und mir beim Ansetzen aller Lösungen zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Dierk Brockmeier danke ich für seine Hilfe in der statistischen Auswertung der Porenstromamplituden.

Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Nadia Kičová, Anke Bennert, Stanislav Kaschinski und Zübeyde Pamukçı für die schöne Zeit und gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich ganz herzlich meinen guten Freunden und meiner Familie sehr nahe stehenden Karlheinz und Christel Loew.

Meinen Eltern Ismail und Gülşen Ünver, meinem Bruder Erdinç Ünver sowie seiner Freundin Aida Biroodian bin ich sehr dankbar für die unermüdliche moralische Unterstützung und Motivation während der gesamten Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Baris Ünver
Geburtsdatum: 22.07.1978
Geburtsort: Gießen

Hochschulausbildung

Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen	10/2001 – 05/2006
Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg bis einschließlich Physikum	10/1999 – 09/2001
Approbation	05/2006
3. Staatsexamen	05/2006
2. Staatsexamen	04/2005
1. Staatsexamen	03/2003
Physikum	08/2001

Promotionsarbeit

Thema: „Pharmakologische Modulation der durch α -Hämolysin von <i>Escherichia coli</i> an HEK293-Zellen gebildeten Poren“	01/2003 – 05/2007
--	-------------------

Veröffentlichungen

„ <i>Why Escherichia coli α-Hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells – the pore is on its own</i> “ Andreas Koschinski, Holger Repp, Baris Ünver, Florian Dreyer, Dierk Brockmeier, Angela Valeva, Sucharit Bhakdi and Iwan Walev	FASEB Journal 2006 (20: 973-975)
---	-------------------------------------

Studienbegleitende Tätigkeiten

Wissenschaftliche Hilfskraft am Rudolph-Buchheim-Institut für Pharmakologie	04/2003 – 07/2003
Studentische Aushilfe im Schlaf-Apnoe-Center des Universitätsklinikums Gießen	09/2002 – 12/2002
Aushilfe im Seniorenwohnheim der AWO Gießen	11/1999 – 04/2003

Zivildienst

Zivildienst an der Albert-Schweizer-Schule Gießen (Sonderschule für Lern- und Körperbehinderte)	08/1998 – 09/1999
--	-------------------

Schulbildung

Gymnasium Ricarda-Huch-Schule Gießen	08/1988 – 07/1998
Georg-Büchner-Grundschule Gießen	08/1984 – 07/1988

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die aus 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.

Gießen, den

Baris Ünver