

---

**Elektrophysiologische Charakterisierung  
und pharmakologische sowie pathophysiologische  
Beeinflussung der durch  
Streptolysin O gebildeten Poren**

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

vorgelegt von Brit Jacobus  
aus Düsseldorf

Gießen 2006

---

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

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Gutachter: PD Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 09.10.2006

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1. Medizinische Bedeutung $\beta$ -hämolisierender A-Streptokokken .....	3
1.2. Pathogenese .....	3
1.3. Aufgabenstellung .....	6

## 2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur .....	7
2.2. Elektrophysiologische Messungen .....	8
2.2.1. Vorbereitung .....	8
2.2.2. Die Patch-Clamp Messung .....	9
2.2.3. Liquid-Junction-Potentiale .....	10
2.3. Calcium-Fluoreszenzmessungen .....	10
2.4. Hämolyseassay .....	11
2.5. Apoptoseassay .....	12
2.6. Substanzliste .....	12
2.6.1. Ionenlösungen.....	12
2.6.2. Streptolysin O .....	13
2.6.3. Zur Porenblockade eingesetzte Substanzen .....	14
2.6.4. Kaliumkanalblocker .....	15
2.6.5. Weitere Substanzen .....	15
2.7. Statistische Auswertung .....	16

## 3. Ergebnisse

3.1. Elektrophysiologische Charakterisierung der Porenbildung durch Streptolysin O (SLO).....	17
3.1.1. Porenbildung durch SLO bei HEK239-Zellen .....	17
3.1.2. Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung.....	19
3.1.3. Elementare Porenströme .....	23
3.1.4. Permeabilität der SLO-Poren für Calcium.....	25
3.1.5. Calciumabhängigkeit der Porenkinetik.....	27

---

3.2. Sensitivität unterschiedlicher Zelltypen auf SLO .....	29
3.2.1. Porenbildende Wirkung an verschiedenen Zelltypen .....	29
3.2.2. Lytische Wirkung an Erythrozyten verschiedener Spezies .....	30
3.3. Pharmakologische Beeinflussung der SLO-Aktivität.....	32
3.3.1. Lanthan.....	32
3.3.2. Eosin Y.....	36
3.3.3. Ruthenium Rot.....	37
3.4. Pathophysiologische Beeinflussung der SLO-Aktivität.....	38
3.4.1. Temperatur .....	38
3.4.2. pH-Wert .....	40
3.5. Langzeiteffekte durch SLO.....	42
3.5.1. Calciumkonzentrationsänderung in HEK293-Zellen .....	42
3.5.2. Apoptoseinduktion durch SLO in IHKE-Zellen .....	45
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>64/65</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>66</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>67</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Medizinische Bedeutung $\beta$ -hämolisierender

#### A-Streptokokken

$\beta$ -hämolisierende Streptokokken der Gruppe A gehören zu den grampositiven, aeroben Bakterien. Bedeutendster humanpathogener Vertreter der Gruppe ist *Streptococcus pyogenes*. Er ist Verursacher häufiger, zum Teil lebensbedrohlicher Erkrankungen wie Haut- und Weichteilinfektionen (Impetigo, Phlegmone, nekrotisierende Fasziiitis), Krankheiten der oberen Atemwege (Otitis, Sinusitis, Angina tonsillaris) und des zentralen Nervensystems (Meningitis) bis hin zur generalisierten Infektion (Sepsis) und toxischen Reaktionen wie dem Toxic-Schock-Syndrom. Als streptokokkenspezifische Erkrankungen sind insbesondere der Scharlach und das Erysipel sowie die Streptokokken-Folgeerkrankungen rheumatisches Fieber und postinfektiöse Glomerulonephritis zu nennen. Der Erregernachweis erfolgt mikroskopisch oder kulturell bzw. über Bestimmung des Anti-Streptolysin-Titers im Blut (Herold 2006). Obwohl Streptokokkeninfektionen im allgemeinen antibiotisch mit Penicillin G und V, Erythromycin oder Cephalosporinen der ersten Generation gut therapierbar sind, kommt es gerade bei invasiven Infektionen und Bakteriämien häufig zu letalen Ausgängen. Die Mortalitätsraten liegen dabei über 20 % (Weiss und Laverdiere 1997).

#### 1.2. Pathogenese

Die Übertragung der ubiquitär vorkommenden Keime erfolgt durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion. Über Haut und Schleimhäute dringen die Bakterien in den Wirtsorganismus ein und führen zunächst zu einer lokalen Infektion. Bei schlechter Abwehrlage des Immunsystems kann es zu einer massiven Ausbreitung im Gewebe oder zur hämatogenen Streuung mit Sepsis und Befall peripherer Organe kommen.

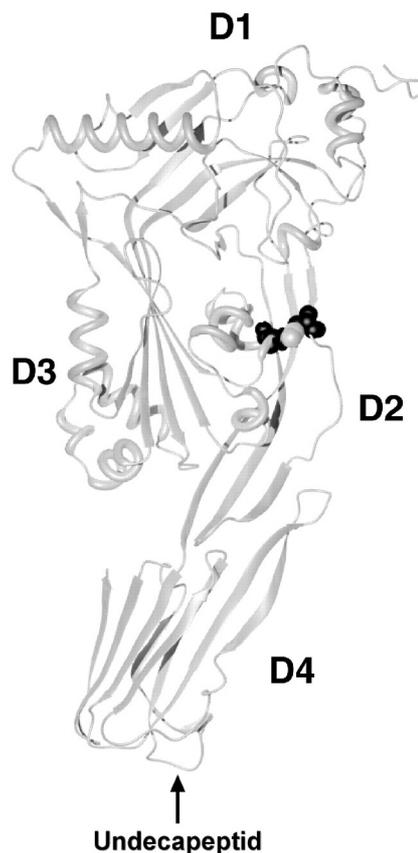
Die Gruppe A der  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken verfügt über mehrere Pathogenitätsfaktoren, die das Eindringen und das Überleben im Wirtsorganismus ermöglichen. Einige dieser Faktoren finden sich in der Bakterienwand, wie z.B. das antiphagozytär wirkende M-Protein oder die

adhärenzfördernden Lipoteichonsäuren. Verschiedene sezernierte Enzyme (Streptokinase, Hyaluronidase, DNase) erleichtern die Ausbreitung im Gewebe (Kayser 1998).

Zu den wichtigsten streptokokkenspezifischen Pathogenitätsmechanismen zählen jedoch die Hämolytine Streptolysin O und S. Deren potente hämolytische Aktivität war bereits von Marmorek (1902) entdeckt worden und hatte dieser Toxingruppe ihren Namen gegeben. Bernheimer (1954) wies die letal-toxische Wirkung von Streptolysin O an verschiedenen Versuchstieren (Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Katzen) nach, die nach intravenöser Applikation des Toxins innerhalb von Sekunden bis Minuten verstarben (Alouf 1999).

Streptolysin O (SLO) gilt als Prototyp der Gruppe der cholesterolabhängigen Toxine (CDTX = cholesterol dependent toxins). Es ist mit 571 Aminosäuren das Größte dieser Toxine, zu deren Familie 21 weitere Vertreter gehören, unter anderem Listeriolysin O, Perfringolysin O und Pneumolysin. Ein Charakteristikum dieser Toxine ist die essentielle Bindung an Cholesterol in der Membran der Zielzelle (Ohno-Iwashita et al. 1992). Desweiteren ist für die große Mehrheit dieser Toxine ihre Sauerstofflabilität typisch. Durch Oxidation an der Luft entstehen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten zweier Toxinmoleküle. Die entstehenden Toxindimere sind inaktiv, lassen sich zum Teil aber durch reduzierende Agenzien wie Thiole reaktivieren (Todd und Herbert 1941). Da der Wildtyp von Streptolysin O besonders sauerstofflabil ist und bereits kurze Zeit nach seiner Freisetzung inaktiviert, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer cysteinfreien Mutante gearbeitet (SLO.Cys-530 → Ala-530). Ihre lytische Aktivität entspricht der des Wildtyptoxins (Pinkney et al. 1989).

Als Strukturmodell für die Gruppe der CDTX dient Perfringolysin O (Abb. 1). Es ist der einzige Vertreter dieser Gruppe, dessen kristallographische Strukturanalyse bisher gelungen ist (Rossjohn et al. 1997). Demnach besitzt das Toxin eine elongierte Struktur und setzt sich aus 4 Domänen zusammen.



**Abbildung 1:** Strukturmodell von Perfringolysin O. Die verschiedenen Domänen sind mit D1 bis D4 gekennzeichnet. Der Pfeil weist auf das sich in der Domäne 4 befindende Undecapeptid hin (verändert nach Hotze et al. 2001).

Domäne 4 ist für die initiale Bindung der einzelnen Toxinmoleküle an die Membran zuständig. Ist das Monomer membrangebunden, kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, wobei das tryptophanreiche Undecapeptid der Domäne 4 eine zentrale Rolle einnimmt. Diese unter fast allen CDTX homologe Sequenz aus 11 Aminosäureresten beinhaltet bei nahezu allen Vertretern das im gesamten Molekül einzige Cystein, welches auch für die Sauerstoffstabilität verantwortlich gemacht wird. Nach erfolgter Konformationsänderung kommt es zur Oligomerisierung der einzelnen, membrangebundenen Moleküle. Domäne 1 und 3 scheinen an diesem Prozeß beteiligt zu sein. Schließlich führt die Insertion von Domäne 3 zur Bildung einer transmembranären Pore (Palmer 2001). Elektronenmikroskopisch wurden nach Inkubation mit Streptolysin O bogen- und ringförmige Strukturen in Erythrozytenmembranen und Liposomen beobachtet (Sekiya et al. 1996).

### **1.3. Aufgabenstellung**

In unserer Arbeitsgruppe sind bereits die CDTX Listeriolysin O (Repp et al. 2002, Butler 2005) und Pneumolysin (Schramm 2004) bezüglich ihrer porenbildenden Wirkung elektrophysiologisch charakterisiert worden. Entsprechende Untersuchungen lagen für SLO bisher nicht vor.

Im Vordergrund meiner Arbeit standen zunächst Experimente zur Porenbildung durch SLO an HEK293-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik. Dabei sollten SLO-induzierte Poren näher charakterisiert und Porenstromamplituden, Porenöffnungen und -schlüsse sowie die Permeabilität der Poren untersucht werden. Um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere Zelllinien beurteilen zu können, wurde die Porenbildung an Endothelzellen, Nierenzellen und Fibroblastenzellen miteinander verglichen. Die lytischen Eigenschaften von SLO wurden an Erythrozyten verschiedener Spezies untersucht.

Von klinischer Bedeutung und damit von großem Interesse war die Frage, ob die porenbildende Aktivität von SLO durch äußere Faktoren beeinflussbar ist. Dafür wurden zum einen verschiedenen Substanzen auf ihre Wirkung getestet, die Porenbildung durch SLO zu hemmen oder SLO-induzierte Porenströme zu blockieren. Zum anderen wurde der Einfluss pathophysiologisch relevanter Parameter wie Temperatur und pH-Wert auf die Toxinaktivität untersucht.

Der letzte Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit möglichen Langzeiteffekten von SLO auf die Zellen. Calciummessungen sollten Aufschluss über den Verlauf der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Toxingabe bringen. Abschließend wurde untersucht, inwieweit die Veränderungen des Calciumhaushaltes schädigend auf die Zellen wirken, d.h., ob SLO zu einer Induktion des programmierten Zelltodes führen kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

Es wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

**HEK293-Zellen.** Die Abkürzung steht für Human Embryonic Kidney-Zellen. Diese Zellen eignen sich sehr gut für elektrophysiologische Experimente, da sie nur eine geringe endogene Ionenkanalaktivität aufweisen. Die Zellen wurden in einem Medium („HEK293-Zell-Medium“) kultiviert, das zu gleichen Teilen aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und HAM's F12-Medium bestand. Weiterhin enthielt die Lösung 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (64,8 mg/l Penicillin-G, 100 mg/l Streptomycin).

**HEKhsK4-Zellen** sind HEK293-Zellen, denen das Gen für einen calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal (hsK4 = human small conductance „Kalium“ channel Nr. 4) gekoppelt mit einem Gen für Geneticinresistenz stabil transfiziert worden war. Sie wurden zur Beurteilung der Calciumpermeabilität von SLO-Poren eingesetzt, da sie schon auf geringfügige Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Aktivierung der hsK4-Kanäle reagieren. HEKhsK4-Zellen wurden in HEK293-Zell-Medium (s.o.) kultiviert, dem zusätzlich 400 µg/ml Geneticin zugesetzt worden war. Dadurch wurden die Zellen eliminiert, die das transfizierte Gen durch Mutation verloren hatten.

**PPAE-Zellen** (Porcine Pulmonary Artery Endothelial cells) wurden eingesetzt, um die Wirkung des Toxins auf das Gewebe zu zeigen, welches bei einer systemischen Infektion als natürliche Barriere zwischen Blutbahn und Organen liegt. Die Kultivierung erfolgte in Earle's Medium, dem 10 % (v/v) FKS sowie Antibiotika (64,8 mg/l Penicillin-G, 100 mg/l Streptomycin) zugesetzt worden waren.

**NIH-3T3-Zellen** wurden ursprünglich im National Institute of Health, Bethesda, USA durch Dritteln der Kultur alle drei Tage (3T3) kloniert. Es handelt sich um Mäusefibroblastenzellen, die als weiterer Zelltyp bezüglich ihrer SLO-Sensitivität untersucht werden sollten. Als Medium wurde DMEM eingesetzt, dem 5 % (v/v) neonatales Kälberserum (NKS), 2 mM L-Glutamin sowie

Antibiotika (64,8 mg/l Penicillin-G, 100 mg/l Streptomycin) zugesetzt worden waren.

**IHKE-Zellen** (Immortalized Human Kidney Epithelial Cells) wurden vor allem in den Apoptoseexperimenten eingesetzt. Sie wurden in HEK293-Zell-Medium (s.o.) kultiviert.

Alle Zelllinien wurden bei 37° C und 95 % Luftfeuchtigkeit mit einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 6 % inkubiert (CO<sub>2</sub>-Inkubator 6220, Fa Heraeus, Hanau) und alle 3-4 Tage auf 94 mm Petrischalen (Greiner GmbH, Nürtingen) passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS (phosphate buffered saline [in mM]: 120 NaCl, 3,4 KCl, 10,1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gespült und anschließend einige Minuten mit 5 ml trypsinhaltiger (0,05 % w/v) PBS-Lösung behandelt, bis die Zellen sich abzurunden und vom Schalenboden zu lösen begannen. Die PBS-Lösung wurde dann entfernt und die Zellen anschließend mit 10 ml frischem Medium vom Schalenboden abgespült und vereinzelt. Etwa 500-800 µl dieser Zellsuspension, je nach Zelldichte, wurden in neue Petrischalen mit 10 ml frischem Medium pipettiert.

## 2.2. Elektrophysiologische Messungen

### 2.2.1. Vorbereitung

Die Zellen wurden zur Messung in einer Verdünnung von 1:10 (etwa 200 µl Zellsuspension (s.o.) auf 2 ml Medium) in 35 mm Petrischalen ausgesät und nach 24-48 h elektrophysiologisch untersucht. Nachdem das Zellkulturmedium abgegossen worden war, mussten die PPAE-Zellen zunächst etwa 10 min mit 0,05 % (w/v) trypsinhaltiger PBS-Lösung behandelt werden, um eine Abrundung der flachen Endothelzellen zu erreichen. Die oval-rundlichen HEK293-, IHKE- und NIH-3T3-Zellen benötigten diese Vorbehandlung nicht. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit Extrazellulärlösung gespült und nach einer kurzen Ruhephase von ca. 10 min in 2 ml der Extrazellulärlösung (Badlösung) gemessen. Zur Messung wurden einzeln liegende, abgerundete Zellen ohne sichtbare Kontakte zu Nachbarzellen gewählt.

Die für die Patch-Clamp Experimente benötigten Patchpipetten wurden am Meßtag mit Hilfe des Flaming-Brown Pullers P-97 (Sutter Instrument CO., USA)

aus Glaskapillaren hergestellt und anschließend feuerpoliert (CPZ 101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen).

### **2.2.2. Die Patch- Clamp Messung**

Die Zellen wurden in den 35 mm Petrischalen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica-GmbH, Wetzlar) mit temperatur-regulierbarer Meßkammer (Temperatur Control System, Luigs und Neumann GmbH, Ratingen) untersucht. Der Meßstand war gegen elektrische Störeinwirkungen von außen mit einem Faradayschen Käfig abgeschirmt. Die gemessenen Ströme wurden über chlorierte Silberelektroden abgeleitet, wobei sich eine Elektrode in der Extrazellulärlösung befand, die andere in der mit 10  $\mu$ l Intrazellulärlösung gefüllten Patchpipette. Über einen externen Vorverstärker wurden die Ströme in Spannungssignale umgewandelt. Der Hauptverstärker EPC-8 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) registrierte die Signale und leitete sie über einen Analog-Digital-Wandler an einen PC weiter. Die Digitalisierungsfrequenzen betragen pulsprotokollabhängig 100 bzw. 3330 Hz, die Filterfrequenzen lagen bei 33 bzw. 1110 Hz. Die Darstellung am Computer erfolgte mit Hilfe des Programms Pulse + Pulse Fit v 8.50 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht). Eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich in der Arbeit von Dr. A. Koschinski (2001).

Zu Beginn der Messung wurde die Patchpipette mit Hilfe eines Mikromanipulators an die Zelle herangeführt. In der Badlösung (Extrazellulärlösung) wurde ein elektrischer Widerstand von 5-10 M $\Omega$  über der Pipette gemessen. Über ein mit der Pipette verbundenes Schlauchsystem wurde noch vor Eintauchen in die Extrazellulärlösung ein leichter Überdruck erzeugt, um das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Pipette sowie das Anhaften kleiner Partikel an deren Spitze zu verhindern. Wenn die Pipettenspitze so dicht an der Zellmembran war, dass diese eingedellt wurde, wurde der Überdruck ausgeglichen. Die Membran lagerte sich daraufhin eng an die Pipettenöffnung, so dass sich der Pipettenwiderstand auf etwa 10 G $\Omega$  erhöhte (sogenannter „Gigaseal“). Bei einem angelegten leichten Unterdruck wurde dann für 100  $\mu$ s ein Spannungsimpuls von -950 mV gegeben, um die Membran zu durchbrechen und die Whole-Cell-Konfiguration zu erreichen. Der Widerstand betrug nun etwa 2 G $\Omega$ .

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Experimente bei einer Badtemperatur von 21° C und einem Membranhaltepotential von -50 mV durchgeführt. Die angegebenen Substanzen wurden mit einer Kolbenhubpipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) in der Nähe der gemessenen Zelle direkt in die Badlösung appliziert.

### **2.2.3. Liquid- Junction- Potentiale**

Durch Verwendung unterschiedlicher Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen kommt es zur Ausbildung eines Donnan-Potentials, des sogenannten Liquid-Junction-Potentials (Hille 2001). Dieses Potential beträgt abhängig von den verwendeten Lösungskombinationen bis zu 10 mV. Die gemessenen Membranpotentiale wurden daher a posteriori entsprechend korrigiert.

### **2.3. Calcium-Fluoreszenzmessungen**

Als Fluoreszenzfarbstoff für Calcium wurde FURA-2 AM eingesetzt, welches als lipophiles Agens in die Zellen gelangt, durch intrazelluläre Esterasen zum aktiven FURA-2 gespalten wird und danach nicht mehr hinausdiffundieren kann. Die Zellen wurden in 35 mm Petrischalen mit Glasboden gemessen. Vor der Messung wurden sie 20 min bei Raumtemperatur mit 5 µM FURA-2 AM in Extrazellulärlösung (1 ml) inkubiert. Anschließend wurde extrazellulär verbliebenes FURA-2 AM ausgewaschen und die Petrischalen mit 3 ml Extrazellulärlösung gefüllt. FURA-2 wurde im Intervall von 5 s jeweils für 1 s bei 340 und 380 nm Wellenlänge angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 512 nm Wellenlänge gemessen (425 nm-Low-pass-Filter). Bei Erhöhung der Calciumkonzentration kommt es bei 340 nm Wellenlänge zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, bei 380 nm zu einer Abnahme. Bestimmt man den Quotienten der gemessenen Fluoreszenzintensitäten beider Wellenlängen, so werden Störfaktoren wie das Ausbleichen des Farbstoffs (Fading), unterschiedliche Farbstoffkonzentration und der Einfluss der durchstrahlten Schicht (Zelldicke) minimiert. Dadurch ist eine Veränderung des Quotienten (Ratio 340/380) ausschließlich auf eine Veränderung der Calciumkonzentration zurückzuführen. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit den Programmen

Meta Fluor (Universal Imaging Cooperation, Downingtown, USA) und Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

#### **2.4. Hämolyseassay**

Die Hämolyseassays wurden mit 10 % Erythrozytensuspensionen (w/v) aus defibriniertem Schafsblut, Kaninchenerythrozytenkonzentrat bzw. humanem Vollblut durchgeführt. Die Suspensionen wurden unmittelbar vor der Messung hergestellt. Das Blut oder Erythrozytenkonzentrat wurde mehrmals mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) gewaschen. Dafür wurde es mit 1 ml  $E_1$  gemischt und jeweils 3 min bei 3000 rpm (Biofuge 15, Rotor 3042, Fa. Heraeus, Hanau) zentrifugiert bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und das verbleibende Erythrozytenpellet 1:10 (w/v) mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) verdünnt.

Die Substanzen wurden dann in 1,5 ml Eppendorf Cups gemischt. Zu 170  $\mu$ l Extrazellulärlösung wurden 20  $\mu$ l der hergestellten Erythrozytensuspension und 10  $\mu$ l SLO-Lösung entsprechender Konzentration hinzugefügt. Bei einigen Experimenten (vgl. Abschnitt 3.3.1., 3.3.2.) wurden außerdem 10  $\mu$ l einer porenblockierenden bzw. einer die Porenbildung hemmende Substanz zugegeben. Die Reagenzien wurden 30 min bei 37° C und 800 rpm geschüttelt (Thermomixer 5436, Fa Eppendorf). Anschließend wurde der Inhalt jedes Cups 1:1 mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) verdünnt und die Erythrozyten abzentrifugiert (s.o.). Je 100  $\mu$ l der Überstände wurde in die Vials einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Labortechnik, Essen) pipettiert und die Extinktion mit einem Photospektrometer (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale CA 94089, USA) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden jeweils der Nullwert (180  $\mu$ l Extrazellulärlösung, 20  $\mu$ l Erythrozytensuspension), der von allen Meßwerten abgezogen wurde, und der Maximalwert der Hämolyse (180  $\mu$ l Aqua bidest, 20  $\mu$ l Erythrozytensuspension) bestimmt. Bei Messungen mit Farbstoffen wurden entsprechend angefertigte Leerwerte von den Ergebnissen abgezogen.

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit den Programmen Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

## 2.5. Apoptoseassay

Aktivierte Caspasen sind wichtige Schlüsselkomponenten der Apoptoseinitiation und können daher als Apoptoseindikatoren betrachtet werden (Lincz 1998). Sie lassen sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-110 anfärben, welcher nach der Abspaltung seiner Seitenketten durch aktivierte Caspasen (Caspase-3, Caspase-7) grün zu fluoreszieren beginnt.

Die untersuchten Zellen wurden einen Tag vor der Messung in 35 mm Petrischalen ausgesät. Um eine möglichst gleich hohe Zelldichte in allen Schalen zu erreichen, wurde zunächst eine verdünnte Zellsuspension hergestellt, von der jeweils 2 ml in die Petrischalen pipettiert wurde. Nach 24 h wurden die Zellen mehrfach mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) gespült und anschließend für 6 h mit unterschiedlichen SLO-Konzentrationen in 1 ml  $E_1$  unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen weitere 30 min mit 25  $\mu$ M Rhodamin-110 inkubiert. Nachdem die Zellen mehrfach mit  $E_1$  gespült worden waren, wurde die Rhodamin-Fluoreszenz der Zellen gemessen. Dazu wurde das intrazellulär vorhandene Rhodamin-110 bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität bei 525 nm bestimmt. Die Badlösung bestand aus 3 ml Extrazellulärlösung ( $E_1$ ).

Die Bildbearbeitung und Darstellung erfolgte mit den Programmen Meta Fluor (Universal Imaging Cooperation, Downingtown, USA) und Micrografx Picture Publisher 8 (Micrografx Inc., Richardson, Texas, USA).

## 2.6. Substanzliste

Alle verwendeten Substanzen wurden bei  $-20^\circ$  C, Toxinstocklösungen bei  $-80^\circ$  C gelagert.

### 2.6.1. Ionenlösungen

Die für die Messungen verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Die Osmolaritäten der Lösungen wurden mit dem Kryosmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) kontrolliert und betragen gewöhnlich 305-320 mosmol/kg, wobei die Intrazellulärlösungen etwas höher osmolar waren als die Extrazellulärlösungen. Wenn die Differenz

der Osmolaritäten von Intra- und Extrazellulärlösungen mehr als 20 mosmol/kg betrug, wurde die Osmolarität der Extrazellulärlösung durch Zugabe von Sorbitol an die der Intrazellulärlösung angepasst.

**Tabelle 1:** Extrazellulärlösungen (in mM)

	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	Glucose	HEPES	PIPES
E <sub>1</sub>	140	3	2	2	-	15	10	-
E <sub>1</sub> Barium	140	3	2	-	2	15	10	-
E <sub>1</sub> sauer	140	3	2	2	-	15	-	10
E <sub>1</sub> basisch	140	3	2	2	-	15	10	-

Die Extrazellulärlösungen wurden mit 1 N NaOH auf ihren jeweiligen pH-Wert eingestellt. Dadurch erhöhte sich die Natriumkonzentration um 2-4 mM. Als Puffersysteme wurden HEPES (für die Lösungen mit den pH-Werten 7,55 und 7,35) und PIPES (für die Lösungen mit den pH-Werten 6,15; 6,55 und 6,95) verwendet.

E<sub>1</sub> = Extrazellulärlösung, pH 7,35

E<sub>1</sub> Barium = calciumfreie Extrazellulärlösung mit 2 mM Bariumchlorid, pH 7,35

E<sub>1</sub> sauer = Extrazellulärlösungen mit den pH-Werten 6,15; 6,55; 6,95

E<sub>1</sub> basisch = Extrazellulärlösung mit einem pH-Wert von 7,55

**Tabelle 2:** Intrazellulärlösungen (in mM)

	KGlu	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BAPTA	HEPES	BaCl <sub>2</sub>
IBL <sub>100n</sub>	140	20	2	29,7 µM	0,1	10	-
IBL <sub>0</sub>	140	20	2	-	0,1	10	-
I <sub>1</sub> 10B	140	15	2	-	10	10	-

Die Intrazellulärlösungen wurden mit 1 N KOH auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. Dadurch erhöhte sich die Kaliumkonzentration um etwa 4 mM. Als pH-Puffer wurde HEPES, als Calciumpuffer BAPTA eingesetzt.

IBL<sub>100n</sub> = Intrazellulärlösung mit BAPTA, niedrig (low) gepuffert, 100 nM freies Calcium

IBL<sub>0</sub> = nominell calciumfreie Intrazellulärlösung

I<sub>1</sub>10B = calciumfreie Intrazellulärlösung, mit 10 mM BAPTA stark gepuffert

### 2.6.2. Streptolysin O

Die beiden Wildtypformen von SLO (hochmolare Form: Molmasse 68000 g/mol; niedermolare Form: Molmasse 57000 g/mol) besitzen im Undecapeptid der Domäne 4 einen Cysteinrest, welcher mit den Cysteinresten anderer SLO-Moleküle Disulfidbrücken ausbilden kann. Die entstehenden Dimere sind nicht aktiv und müssen über Reduktionsmittel wie DTT (Dithiothreitol) oder

Acetylcystein zunächst gespalten d.h. aktiviert werden. In den Versuchen wurde daher eine cysteinfreie Mutante von Streptolysin O (SLO.Cys-530→ Ala-530) eingesetzt, die uns freundlicherweise von Dr. Ivan Walev (AG Prof. Dr. Bhakdi, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt worden war. Die Herstellung dieser Toxinmutante wurde ausführlich von Weller et al. (1996) beschrieben. Sie besitzt die gleiche hämolytische Aktivität wie der SLO-Wildtyp. Das uns zur Verfügung gestellte Toxin (100 µg lyophilisiertes Streptolysin O) wurde in 100 µl Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) gelöst und in Stocklösungen zu je 10 µl (Konzentration 1 mg/ml) bei -80° C gelagert. Bei Bedarf wurden die Stocklösungen mit Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub> bzw. für alle calciumfreien Experimente E<sub>1</sub> Barium), die 0,5 % FAF-BSA (fatty acid free bovine serum albumine) enthielt, auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Aliquots (Toxinkonzentrationen unter 10 µg/ml) wurden bei -20° C gelagert.

### 2.6.3. Zur Porenblockade eingesetzte Substanzen

**Lanthan:** Bei Lanthan handelt es sich um ein Metall der seltenen Erden. Es ist ein polykationisches Element der Lanthanoide (3. Hauptgruppe). Lanthancarbonat (Fosrenol®) wird klinisch als Phosphatbinder bei Dialysepatienten eingesetzt. Es ist bekannt, dass Lanthan Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und mechanisch aktivierte, unselektive Ionenkanäle blockiert (Übersicht Palasz und Czekaj 2000). Das verwendete Lanthanchlorid (Molmasse 371,4 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde in einer Konzentration von 20 mM in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) gelöst und auf unterschiedliche Einsatzkonzentrationen verdünnt.

**Eosin Y** ist ein rot-gelber Mikroskopiefarbstoff, der zur Anfärbung verschiedener Zellorganellen benutzt wird. Eosin Y blockiert plasmamembranständige Calcium-ATPasen (Gatto et al. 1993). Die Molmasse beträgt 692,0 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim). Dieses Natriumsalz des Tetrabromfluoreszin wurde in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst.

**Ruthenium Rot** ist ein Farbstoff, der den mitochondrialen Calcium-Uniporter blockiert (Moore 1971). Das eingesetzte Rutheniumchlorid-Hexahydrat besitzt eine Molmasse von 207,4 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim) und wurde in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst.

**Protamin** ist ein Polykation mit einer Molmasse von etwa 4500 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim). Extrahiert wurde die Substanz zuerst aus Fischsperma. Klinisch wird Protamin zum einen als Antidot bei Überdosierungen mit unfractioniertem Heparin eingesetzt, zum anderen ist es Bestandteil von NPH-Verzögerungsinsulin (Neutral-Protamin-Hagedorn-Insulin). Es wurde in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst.

#### 2.6.4. Kaliumkanalblocker

**Charybdotoxin** (ChTx, Molmasse 4296,0 g/mol) und **Iberitotoxin** (IbTx, Molmasse 4230,9 g/mol) sind Bestandteile von verschiedenen Skorpiongiften. Beide sind spezifische Blocker calciumabhängiger Kaliumkanäle großer und kleiner Leitfähigkeit, z.B. des hK4 -Kanals (Reinhardt et al. 1989; Garcia et al. 1998; Repp et al. 1998). Die Toxine (je 50 µg, Latoxan, Dieticon, Schweiz), wurden jeweils in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst, aliquotiert und bei -20° C gelagert. Die eingesetzte Badkonzentration betrug jeweils 300 nM.

#### 2.6.5. Weitere Substanzen

**HEPES** 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure) wurde eingesetzt als Puffer zur Einstellung des pH-Wertes bei Extra- und Intrazellulärlösungen. HEPES besitzt einen pH-Bereich von 6,8- 8,2 (pK 7,5), (M: 238,3 g/mol; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe).

**PIPES** piperazin-N,N'-bis (2-ethan-sulfonsäure) wurde ebenfalls als Puffer für Extrazellulärlösungen eingesetzt. Der pH-Bereich reicht von 6,1- 7,5 (pK 6,8), (M: 302,4 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim).

**BAPTA** 1,2-bis (2-amino-phenoxy) ethan-N,N,N',N'-tetra-acetylsäure wurde als Calciumpuffer für Intrazellulärlösungen eingesetzt (M: 476,4 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim).

**EDTA** (Ethylen Diamin Tetraacetic Acid) ist ein Chelator für mono-, di-, und trivalente Kationen mit einer Molmasse von 372,3 g/mol (Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe). Gelöst wurde EDTA in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>). Die verwendete Badkonzentration betrug 100 µM.

**FURA-2 AM** (M: 1001,0 g/mol; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) ist ein Fluoreszenzfarbstoff für Calcium, der als Ester in die Zelle aufgenommen und zum aktiven FURA-2 metabolisiert wird, für welches die Zellmembran impermeabel ist. FURA-2 AM wurde in einer Stammkonzentration von 5 mM in DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst. Die verwendete Badkonzentration betrug 5 µM. Um die Aufnahme in die Zellen zu erleichtern, wurde die FURA-2 AM- Lösung im Verhältnis 1:1 mit Pluronic (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), einem Surfactant-Copolymer aus Ethylen- und Propylenoxid, versetzt.

**Rhodamin-110** (Rhodamine-110- bis- L-aspartic acid amide), M: 788,6 g/mol, (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) wurde als Caspase-Indikator im Rahmen der Apoptoseexperimente eingesetzt. In Anwesenheit aktivierter Caspasen kommt es durch Abspaltung von Aspartatseitenketten zu einer grünen Fluoreszenz der Moleküle. Rhodamin-110 wurde in Extrazellulärlösung (E<sub>1</sub>) gelöst und in einer Badkonzentration von 25 µM eingesetzt.

## 2.7. Statistische Auswertung

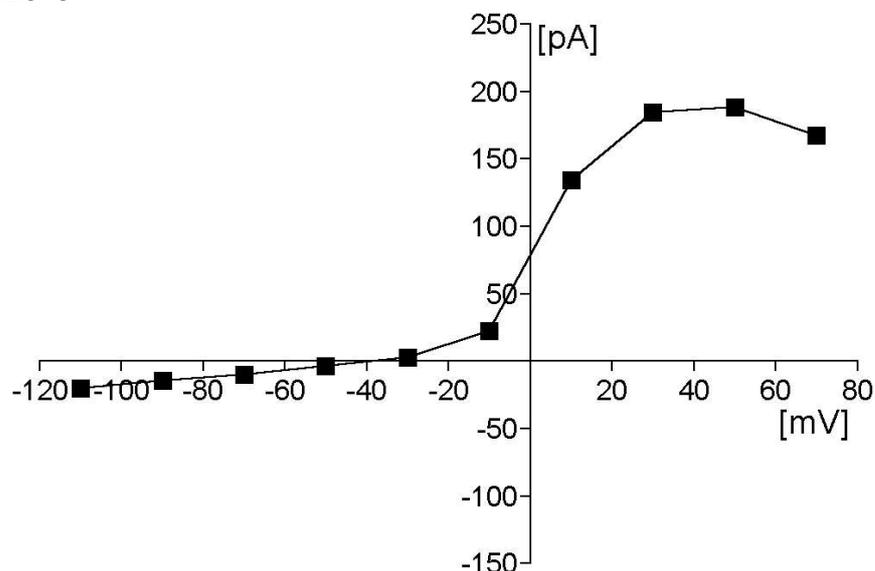
Die statistische Auswertung der Amplitudenverteilung der Porenströme (Abschnitt 3.1.3.) führte Prof. Dr. Brockmeier (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) durch. Die statistische Auswertung und Darstellung aller anderen Ergebnisse erfolgte computer-gestützt mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und Prism 3.0. (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean). Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (95 % Konfidenzintervall) ermittelt bzw. in Abschnitt 3.1.5. mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) überprüft.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Elektrophysiologische Charakterisierung der Porenbildung durch Streptolysin O (SLO)

##### 3.1.1. Porenbildung durch SLO bei HEK293-Zellen

Zur Untersuchung der Wirkung von SLO wurde die Zelllinie HEK293 herangezogen. Es handelt sich hierbei um humane embryonale Nierenzellen, die sich sehr gut für Patch-Clamp Experimente eignen. Sie weisen nur eine sehr geringe endogene Ionenkanalaktivität auf, die die Messergebnisse kaum beeinflusst. Abbildung 2 zeigt eine typische Strom-Spannungskurve einer HEK293-Zelle.

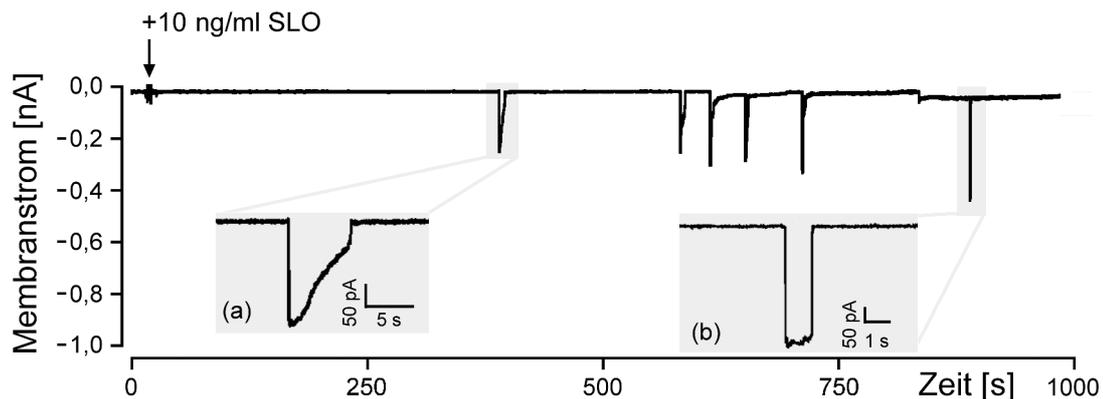


**Abbildung 2:** Strom-Spannungskurve einer HEK293-Zelle. Für jeweils 400 ms wurde in 20 mV Schritten eine Spannung von  $-130$  bis  $+70$  mV angelegt und der resultierende Membranstrom im Zeitraum 280-380 ms gemessen. Zwischen den Messungen wurde für jeweils 100 ms auf das Haltepotential ( $-50$  mV) zurückgeschaltet. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  verwendet.

Ab einer angelegten Spannung positiver als  $-30$  mV kommt es zur Aktivierung eines spannungsabhängigen Kaliumstroms. Bei Potentialen ab  $+30$  mV erfolgt eine Inaktivierung der Kaliumkanäle, woraus eine Amplitudenabnahme des Membranstroms resultiert.

Weiterhin ist beschrieben, dass HEK293-Zellen einen spannungsabhängigen Calciumkanal besitzen, der ab einem Membranpotential positiver als  $-40$  mV aktiviert (Berjukow et al. 1996), allerdings während unserer Messungen nicht prominent auftrat.

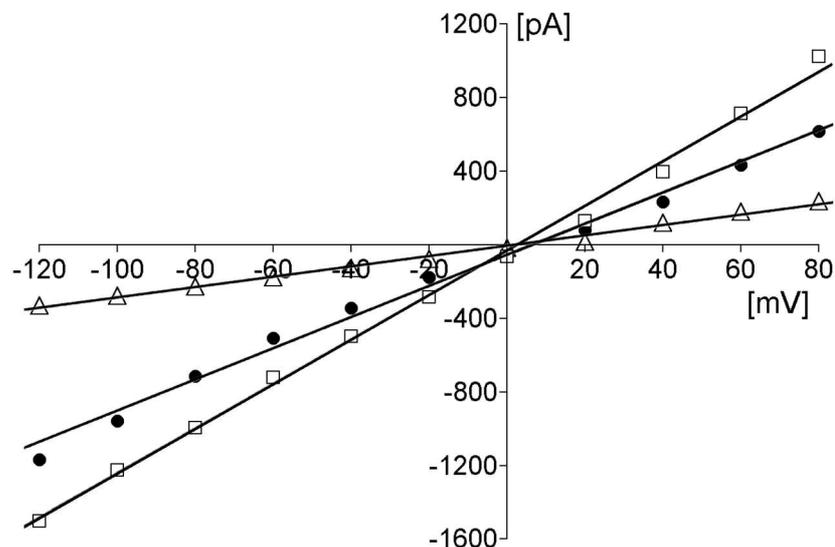
Um eine Aktivierung dieser endogenen, spannungsabhängigen Ionenkanäle zu verhindern, wurden alle Messungen (soweit nicht anders angegeben) bei einem Membranhaltepotential von  $-50$  mV durchgeführt. Bei diesem Potential zeigen HEK293-Zellen einen Membranstrom von  $-20 \pm 4$  pA ( $n=27$ ). Aus den Strom-Spannungskurven ließ sich ein Ruhemembranpotential von  $-38 \pm 15$  mV ( $n=13$ ) bestimmen.



**Abbildung 3:** Originalregistrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle nach Applikation von 10 ng/ml SLO (Pfeil). Man sieht nach etwa 400 s die erste Porenöffnung und Porenschließung. 200 s später sind weitere Porenöffnungen und -schließungen zu beobachten. Es fallen zwei Porenschlußkinetiken auf, eine langsame (Inset a) und eine schnelle (Inset b). Die Messung wurde bei einem Membranpotential von  $-50$  mV durchgeführt. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt.

In Abbildung 3 ist die Membranstromregistrierung einer HEK293-Zelle nach der Applikation von SLO (10 ng/ml) in die Badlösung dargestellt. Nach einer Latenzzeit von ca. 400 s kam es zu einer schlagartigen Zunahme ( $\leq 10$  ms) des Membranstroms um fast 300 pA. Es handelt sich hierbei um einen Nettoeinwärtsstrom von Ionen durch die gebildete SLO-Pore bei einem Membranhaltepotential von  $-50$  mV. Diese Stromamplitude nahm einige Sekunden später wieder den Wert des Ruhemembranstroms an. Im Verlauf der Messung bildeten sich weitere Poren. Ein Teil der Poren schloß nach einiger Zeit wieder, während andere geöffnet blieben. In 12 ausgewerteten Experimenten (10 ng/ml SLO) bildeten sich im Mittel 62 Poren/h, wovon sich 52 Poren/h wieder verschlossen (83 %). In Bezug auf die Abnahme der Porenstromamplituden konnte man zwei unterschiedliche Kinetiken erkennen (Abbildung 3, Insets (a) und (b)). Eine schnelle Amplitudenabnahme fand sich

in 56 % (29 schnelle Schlüsse/h), eine langsame in 44 % (23 langsame Schlüsse/h). Beide Verschlußkinetiken kamen demnach etwa gleichhäufig vor.

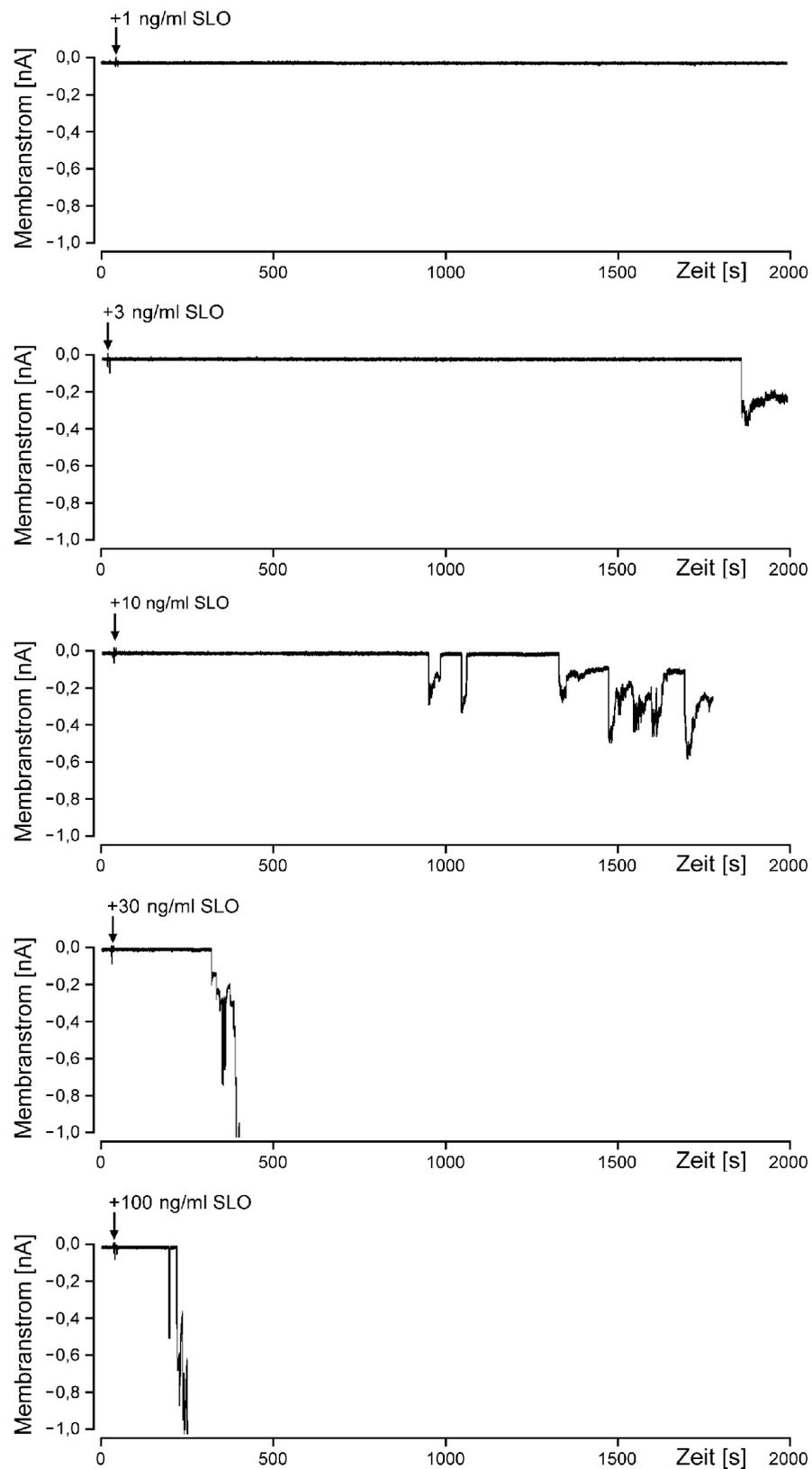


**Abbildung 4:** Strom-Spannungskurven von drei verschiedenen HEK293-Zellen nach Beginn der Porenbildung durch SLO (10 ng/ml). Für jeweils 400 ms wurde in 20 mV Schritten eine Spannung von -120 bis +80 mV angelegt und der resultierende Strom im Zeitraum 280- 380 ms gemessen. Zwischen den Messungen wurde für jeweils 100 ms auf das Haltepotential (-40 mV) zurückgeschaltet. Die Einzelwerte jeder Zelle sind durch Regressionsgraden verbunden.

Während der Porenstromregistrierung wurden Strom-Spannungskurven aufgezeichnet (Abb. 4). Das Umkehrpotential der gemessenen Porenströme ( $n=10$ ) betrug im Mittel  $3 \pm 7$  mV, d.h. für die SLO-Poren besteht zumindest für monovalente Ionen wie Natrium und Kalium eine nicht-selektive Permeabilität.

### 3.1.2. Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung

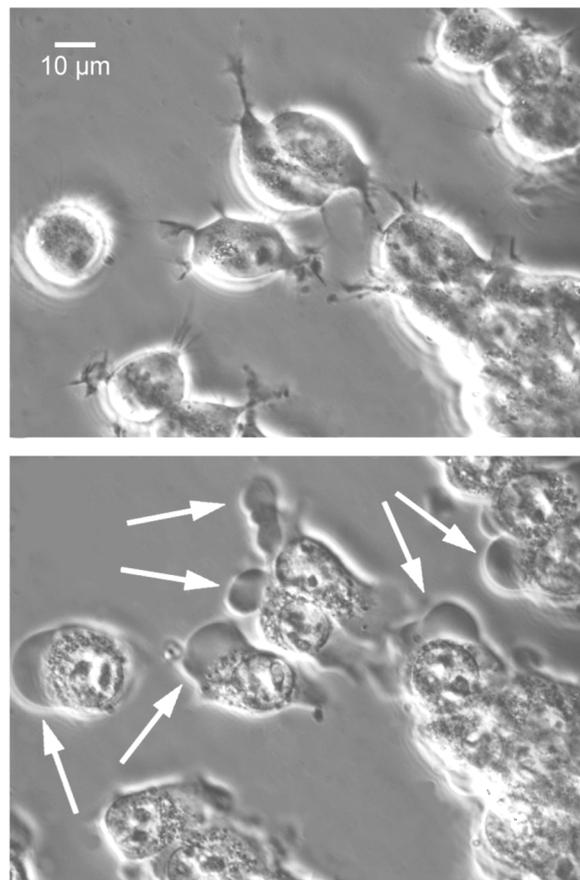
Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von SLO wurden elektrophysiologische Messungen an HEK293-Zellen mit verschiedenen Toxinkonzentrationen durchgeführt. Abbildung 5 zeigt exemplarisch den Verlauf der Membranströme bei fünf verschiedenen Zellen. Mit einer SLO-Konzentration von 1 ng/ml kam es bei 11 Experimenten nur in einem einzigen Fall zu einer Porenbildung. Bei allen anderen Zellen konnte über 30 min Meßdauer kein Porenstrom registriert werden. Nach der Applikation von 3 ng/ml SLO zeigten bereits 50 % der Zellen eine Porenbildung ( $n=10$ ).



**Abbildung 5:** Membranströme von HEK293-Zellen nach Applikation von SLO in den jeweils angegebenen Konzentrationen (Pfeil). Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt. Die Badtemperatur betrug  $21^\circ\text{C}$ , das Membranpotential  $-50\text{ mV}$ .

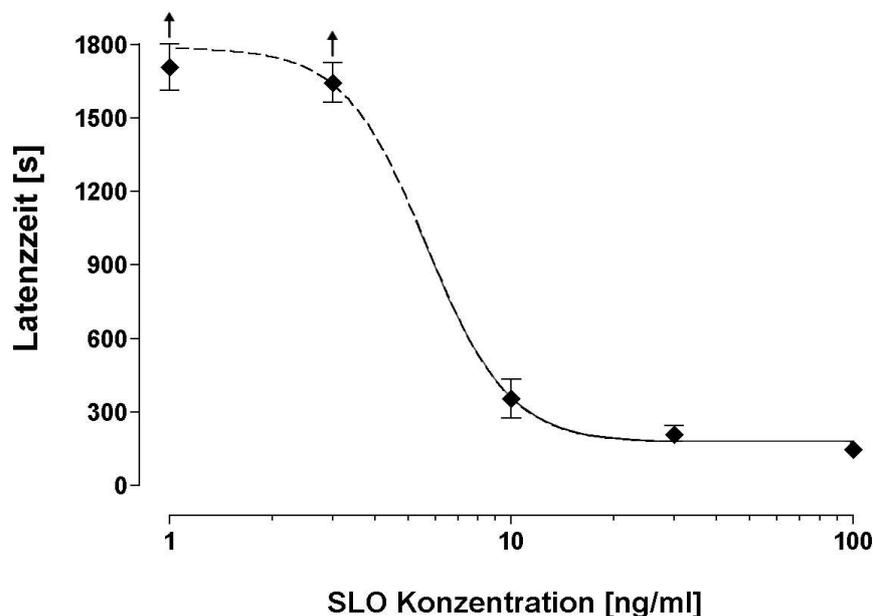
Ab Konzentrationen von 10 ng/ml SLO (n=10) kam es in 100 % der Experimente zur Bildung von Poren, wobei die Latenzzeit von der Toxinapplikation bis zum Auftreten der ersten Pore mit steigender Konzentration immer kürzer und die Zahl der offenen Poren immer größer wurde. Die Applikation von 30 (n=5) bzw. 100 (n=5) ng/ml SLO führte in allen Fällen zu einer sehr raschen Zunahme des Membranstroms über den gewählten Meßbereich von 1 nA hinaus, d.h. die Rate der Porenöffnungen war bei diesen hohen Toxinkonzentrationen sehr viel höher als die der Porenschließungen.

Mikroskopisch wiesen die Zellen bei SLO-Konzentrationen über 30 ng/ml zahlreiche Cytoplasmaaustülpungen, sogenannte „Blebs“, sowie veränderte Kernstrukturen auf (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von HEK293-Zellen vor Toxinapplikation (oben) und 20 min nach Applikation von 40 ng/ml SLO (unten). Die Pfeile weisen auf die entstandenen Blebs hin. Aufnahme in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) bei einer Badtemperatur von 21° C.

Die Abbildung 7 zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve von SLO. Als Parameter für die Wirksamkeit des Toxins wurde die Latenzzeit von der Toxinapplikation bis zur Bildung der ersten Pore bestimmt. Die maximale Meßzeit lag bei 1800 s nach Applikation des Toxins. Für die Toxinkonzentrationen 1 und 3 ng/ml SLO wurden Näherungswerte für die Latenzzeiten angegeben, da bei diesen geringen Konzentrationen bei einigen Zellen auch bis zum Ende des Meßzeitraumes keine Porenbildung registriert werden konnte (siehe Legende Abb. 7).



**Abbildung 7:** Konzentrations-Wirkungskurve von SLO. Abszisse: Toxinkonzentration; Ordinate: Zeit von der SLO-Applikation bis zur Öffnung der ersten Pore (Latenzzeit). Der Meßzeitraum lag zwischen 0 und 1800 s nach Toxinapplikation. Für die Zellen, die innerhalb des Meßzeitraumes keine Porenbildung zeigten (10 von 11 Zellen bei 1 ng/ml und 5 von 10 Zellen bei 3 ng/ml), wurde ein Näherungswert von 1800 s (maximale Meßzeit) als Latenzzeit angenommen. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$L = L_{\max} - ( [L_{\max} - L_{\min}] / [1 + (EC_{50} / c)^n] )$$

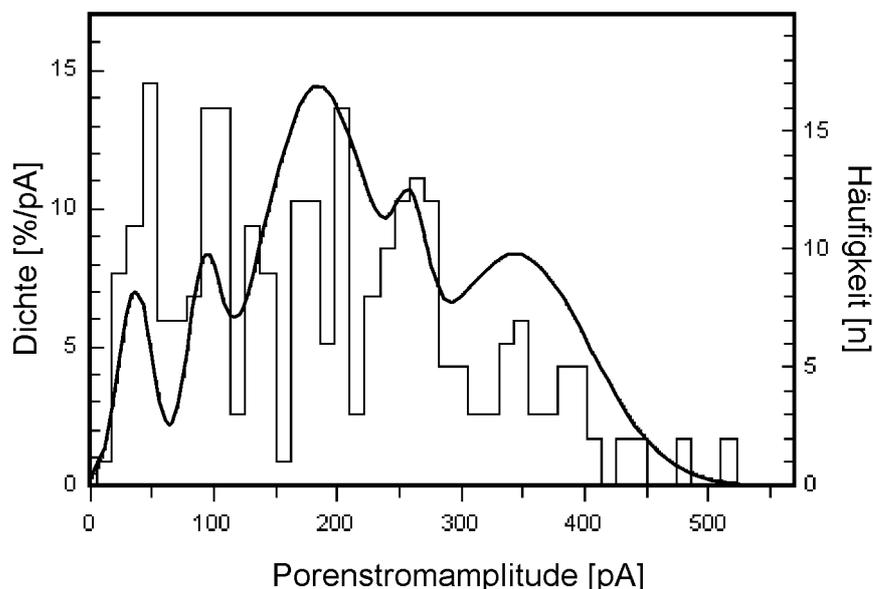
nach dem Least-Squares-Fit-Verfahren an die Daten angepaßt. Dabei ist L die Latenzzeit in Sekunden, die maximale Latenzzeit  $L_{\max} = 1800$  s, die minimale Latenzzeit  $L_{\min} = 145$  s, die halbmaximale effektive Konzentration  $EC_{50} = 5,7$  ng/ml SLO, c die eingesetzte SLO-Konzentration und n = 3,6 der Hill-Koeffizient.

Die Reduzierung der SLO-Konzentration von 10 auf 3 ng/ml führte bereits dazu, dass nur noch 50 % der gemessenen Zellen eine Porenbildung im Meßzeitraum von 1800 s zeigten. Dies läßt auf eine sehr steile Konzentrations-Wirkungsbeziehung von SLO schließen. Die Kurve stellt jedoch nur eine Annäherung an die realen Konzentrations-Wirkungsbeziehungen dar, da die

Latenzzeiten im Bereich der niedrigen Toxinkonzentrationen die porenbildende Wirkung von SLO nur unzureichend wiedergeben. Dadurch können der Hill-Koeffizient von  $3,6 \pm 0,6$  und der  $EC_{50}$ -Wert von  $5,7 \pm 1,1$  ng/ml SLO nur als obere Schätzwerte angesehen werden. Ein  $EC_{50}$ -Wert  $\leq 5,7$  ng/ml SLO liegt auf jeden Fall im picomolaren Bereich und spricht für eine sehr hohe Potenz von SLO. Der hohe Hill-Koeffizient von etwa 3,6 lässt hingegen darauf schließen, dass mindestens vier SLO-Moleküle notwendig sind, um eine SLO-Pore zu bilden. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt auch, dass eine gewisse minimale Latenzzeit von  $145 \pm 3$  s (100 ng/ml SLO) bedingt durch die Diffusion, die Bindung des Toxins an die Zellmembran und die Bildung von Poren auch bei hohen Toxinkonzentrationen nicht unterschritten werden konnte.

### 3.1.3. Elementare Porenströme

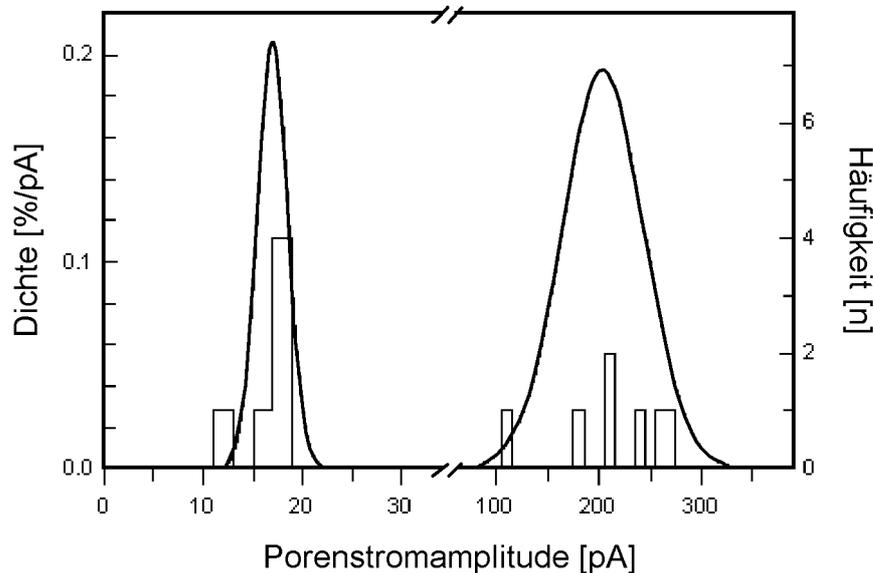
Zur Messung der Porenstromamplituden wurde jeweils die Differenz des Membranstroms vor und nach einer Porenöffnung ausgemessen. Abbildung 8a zeigt die Amplitudenverteilung von 275 Porenströmen, die bei der Verwendung verschiedener Toxinkonzentrationen (3, 10, 30, 100 ng/ml SLO) bis zu einem Gesamtmembranstrom von -1 nA registriert wurden. Das Amplitudenhistogramm zeigt die absoluten Häufigkeiten der auftretenden Porenströme.



**Abbildung 8a:** Amplitudenhistogramm der Porenströme (n=275) bei SLO-Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 ng/ml. Abszisse: Porenströme in pA; rechte Ordinate: absolute Häufigkeit [n] der Porenströme (Histogramm). Die Schrittbreite des Stroms betrug 12 pA. Über die kumulativen Häufigkeiten der Daten (nicht dargestellt) wurden mehrere Dichtefunktionen [%/pA] gelegt (linke Ordinate), die mit Hilfe der Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktionen berechnet wurden (Graph). Das Membranpotential betrug -40 mV.

Zunächst fällt auf dem Bild die große Streuung der Werte auf. Die Porenstromamplituden verteilen sich zwischen 15 und über 500 pA mit mehreren deutlichen Maxima.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktion (Weibull 1951, Brockmeier 1991). Es wurden kumulative Häufigkeiten der Porenstromamplituden berechnet, über die mehrere Dichtefunktionen gelegt wurden. Diese zeigen fünf verschiedene Maxima, wobei das erste Maximum bei  $37 \pm 14$  pA liegt, die weiteren bei  $92 \pm 13$  pA,  $183 \pm 46$  pA,  $260 \pm 14$  pA und  $345 \pm 59$  pA. Porenstromamplituden um 183 pA traten besonders häufig auf.



**Abbildung 8b:** Amplitudenhistogramm der Porenströme ( $n=14$ ) bei 3 ng/ml SLO. Abszisse: Porenströme in pA; rechte Ordinate: absolute Häufigkeit [n] der Porenströme (Histogramm). Die Schrittweite des Stroms betrug 5 pA. Über die kumulativen Häufigkeiten der Daten (nicht dargestellt) wurden mehrere Dichtefunktionen [%/pA] gelegt (linke Ordinate), die mit Hilfe der Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktionen berechnet wurden (Graph). Die Porenstromamplituden zwischen 0 und 30 pA wurden vergrößert dargestellt, eine Porenstromamplitude bei 40 pA ist nicht dargestellt. Das Membranpotential betrug -40 mV.

Die separate Auswertung der Daten bei 3 ng/ml SLO (Abb. 8b) weist auf ein weiteres Maximum bei  $17 \pm 2$  pA, welches bei Darstellung aller Toxinkonzentrationen (Abb. 8a) statistisch nicht von dem Maximum bei  $37 \pm 14$  pA zu trennen war. Dieses kleinste beobachtete Maximum von 17 pA kann als elementarer Porenstrom durch eine SLO-Grundpore betrachtet werden. Bei einem Membranpotential von -40 mV läßt sich für die Grundpore eine Leitfähigkeit von 425 pS errechnen. Die Maxima bei höheren SLO-Konzentrationen entsprechen in etwa ganzzahligen Vielfachen des ersten,

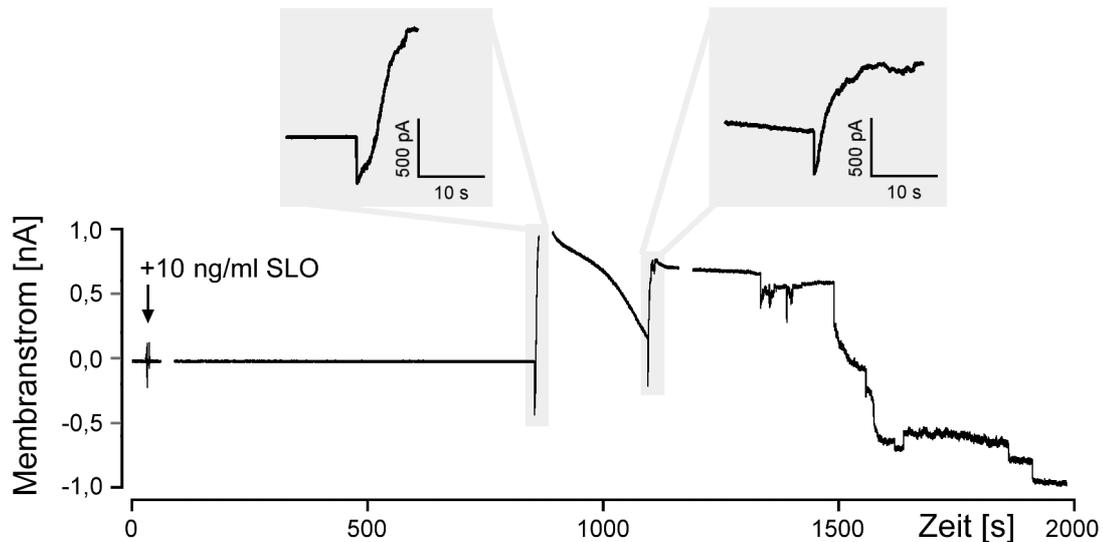
kleinsten Maximums und kommen vermutlich durch synchrone Öffnungen mehrerer Grundporen zustande. Am häufigsten scheinen im Mittel 10 bis 12 SLO-Grundporen gleichzeitig zu öffnen, wodurch sich das bei etwa 180 pA gelegene Maximum ergibt. Die Wahrscheinlichkeit des separaten Öffnens einzelner Grundporen wird mit steigender Toxinkonzentration immer geringer.

#### **3.1.4. Permeabilität der SLO-Poren für Calcium**

Calcium übernimmt als intrazellulärer Messenger eine Vielzahl von Aufgaben. Über Calciumoszillationen werden sowohl Fertilisation und Zellproliferation als auch Apoptose gesteuert (Berridge et al. 1998). Durch porenbedingte Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration könnten also dramatische Veränderungen bis hin zum programmierten Zelltod hervorgerufen werden. Es war deshalb von zentraler Bedeutung, ob SLO-Poren für Calciumionen permeabel sind.

Die elektrophysiologischen Calciumexperimente wurden mit HEKhsK4-Zellen durchgeführt. HEKhsK4-Zellen sind HEK293-Zellen, die mit einem Gen für den calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal kleiner Leitfähigkeit (hsK4) stabil transfiziert worden sind. Sie eignen sich sehr gut für Calciummessungen, da sie schon auf leichte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (ab 10 nM) mit einer Aktivierung d.h. mit einem elektrophysiologisch messbaren Kaliumstrom reagieren. Um bei den Patch-Clamp Experimenten eine initiale Aktivierung der Zellen durch in der Intrazellulärlösung vorhandenes Calcium zu verhindern, wurde die Intrazellulärlösung IBL<sub>0</sub> (Calciumkonzentration nominell null) verwendet. Als Extrazellulärlösung wurde E<sub>1</sub> (Calciumkonzentration 2 mM) eingesetzt.

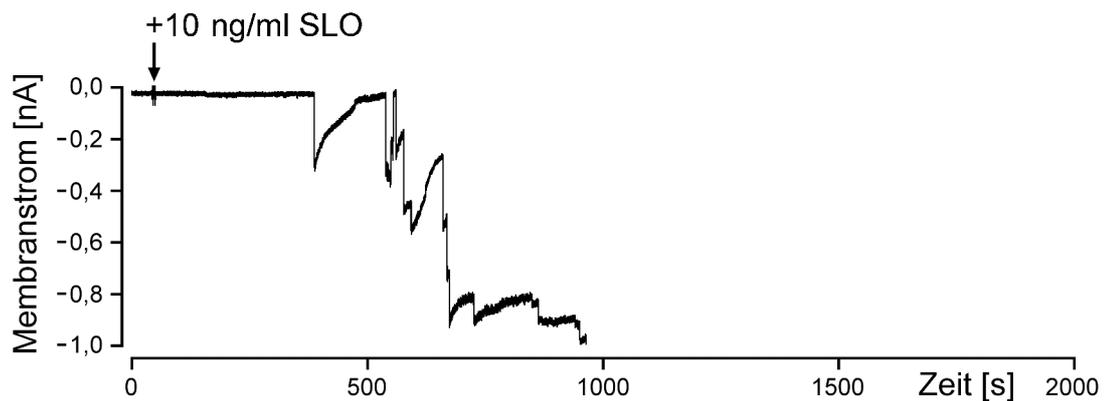
Die Abbildung 9 zeigt die Registrierung des Membranstroms einer HEKhsK4-Zelle nach Applikation von 10 ng/ml SLO. Etwa 14 min später kam es zur Bildung der ersten Pore. Als Reaktion darauf zeigte sich ein sofortiger Kaliumauswärtsstrom, der schnell eine maximale Stromamplitude von etwa 1 nA erreichte (Abb. 9, erster Inset), um dann langsam über mehrere Minuten wieder abzunehmen. Auch die zweite Porenbildung führte zur Aktivierung eines Kaliumstroms (Abb. 9, zweiter Inset). Gegen Ende der Messung bildeten sich dann so viele Poren, dass es zu einem Nettomembraneinwärtsstrom kam.



**Abbildung 9:** Membranstromregistrierung einer HEKhsK4-Zelle nach Applikation von 10 ng/ml SLO (Pfeil) in physiologischer, calciumhaltiger Extrazellulärlösung ( $E_1$ ). Als Intrazellulärlösung wurde  $IBL_0$  verwendet. Die Porenbildung führte unmittelbar zur Aktivierung von Kaliumströmen (in den Insets vergrößert dargestellt). Das Membranpotential betrug  $-50$  mV. Die kurzfristigen Unterbrechungen der Stromspur entstanden durch zu diesen Zeitpunkten gemessene Strom-Spannungskurven.

Der aktivierte Kaliumstrom ließ sich durch 300 nM Charybdotoxin bzw. Iberiotoxin vollständig blockieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Die spezifische Blockade der hsK4-Kanäle durch diese Skorpiontoxine ist in unserer Arbeitsgruppe bereits ausführlich untersucht worden (Repp et al. 1998; Koschinski 2001; Birringer 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass es durch die Bildung von SLO-Poren unmittelbar zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration kommt, die die hsK4-Kanäle aktiviert. Die Experimente lassen daher eine Permeabilität der SLO-Poren für Calciumionen vermuten. Um zu zeigen, dass tatsächlich durch die Poren einströmendes, extrazelluläres Calcium für die Aktivierung der Kaliumkanäle verantwortlich ist, wurden Versuche mit einer calciumfreien Extrazellulärlösung ( $E_{1\text{Barium}}$ ), welche 2 mM Barium anstelle von Calcium enthielt, durchgeführt. Als Intrazellulärlösung wurde wieder die Intrazellulärlösung  $IBL_0$  (Calciumkonzentration nominell null) verwendet. Ein repräsentatives Experiment zeigt die Abbildung 10. Es kam im Anschluß an die Porenbildung in keinem der Experimente ( $n=6$ ) zu einer Aktivierung eines Kaliumstroms.



**Abbildung 10:** Membranstrom einer HEKhsK4-Zelle nach Applikation von 10 ng/ml SLO (Pfeil) in calciumfreien Lösungen. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_{1 \text{ Barium}}$  eingesetzt, als Intrazellulärlösung  $IBL_0$ . Auf die Porenbildung erfolgte keine Aktivierung der hsK4-Kanäle. Das Membranpotential betrug -50 mV.

Es bleibt allerdings unklar, ob der Anstieg der Calciumkonzentration ausschließlich durch von extrazellulär einströmende Calciumionen verursacht wird, oder ob durch diese auch zusätzlich die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern getriggert wird.

### 3.1.5. Calciumabhängigkeit der Porenkinetik

Um den Einfluß des intra- und extrazellulären Calciums auf die Porenkinetik (schnelle / langsame Porenschlüsse) zu untersuchen, wurden Experimente mit calciumfreier Extra- und Intrazellulärlösung durchgeführt ( $E_{1 \text{ Barium}}$ ,  $I_{110B}$ ). Als Kontrolle wurden die Daten der Experimente aus den Abschnitten 3.1.1. und 3.1.2., die mit physiologischen Calciumlösungen durchgeführt worden waren ( $E_1$ ,  $IBL_{100n}$ ), verwendet. Tabelle 3 vergleicht die Daten der beiden Versuchsreihen. Die Anzahl der Porenbildungen und der Porenschlüsse insgesamt, wie auch der schnellen und langsamen Porenschlüsse wurden auf Homogenität bzw. Symmetrie für die beiden Versuchansätze untersucht. Die statistische Prüfung erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

**Tabelle 3:** Calciumabhängigkeit der Porenkinetik

	+ Ca <sup>2+</sup>	- Ca <sup>2+</sup>
Latenzzeit bis zur 1. Pore	355 ± 79 s (n=12)	361 ± 51 s (n=9)
Porenöffnungen / Zeiteinheit	62,3 Öffnungen/h (86/1,38 h)	125,3 Öffnungen/h * (104/0,83 h)
Porenschlüsse / Zeiteinheit	51,5 Schlüsse/h (71/1,38 h)	30,1 Schlüsse/h * (25/0,83 h)
schnelle Schlüsse / Zeiteinheit	29,0 schnelle Schlüsse/h (40/1,38 h)	3,6 schnelle Schlüsse/h * (3/0,83 h)
langsame Schlüsse / Zeiteinheit	22,5 langsame Schlüsse/h (31/1,38 h)	26,5 langsame Schlüsse/h (22/0,83 h)

+ Ca<sup>2+</sup> = Kontrollexperimente mit der Extrazellulärlösung E<sub>1</sub> (2 mM Calcium) und der Intrazellulärlösung IBL<sub>100n</sub> (100 nM Calcium)

- Ca<sup>2+</sup> = Calciumfreie Experimente mit der Extrazellulärlösung E<sub>1</sub> Barium (2 mM Barium) und der Intrazellulärlösung I<sub>1</sub>10B (nominell calciumfrei, mit 10 mM BAPTA stark gepuffert)

Untersucht wurde die Porenkinetik an HEK293-Zellen bei einer Toxinkonzentration von jeweils 10 ng/ml SLO. In die Auswertung mit einbezogen wurden alle Porenbildungen und -schließungen bis zum Ende der Messung bzw. bis zu einem Gesamtmembranstrom von -1 nA. Die gesamte ausgewertete Messzeit (jeweils ab Bildung der ersten Pore) betrug 1,38 h (+ Ca<sup>2+</sup>, n= 12 Zellen) bzw. 0,83 h (- Ca<sup>2+</sup>, n= 9 Zellen). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) überprüft. \*signifikant (p < 0,05) gegenüber der Kontrolle (+ Ca<sup>2+</sup>).

Die Experimente mit physiologischen Calciumlösungen an HEK293-Zellen (+ Ca<sup>2+</sup>) hatten bei einer SLO-Konzentration von 10 ng/ml eine Latenzzeit von 355 ± 79 s ergeben. In calciumfreien Lösungen (- Ca<sup>2+</sup>) war diese Latenzzeit nur unwesentlich verändert (361 ± 51 s). Die Zahl der durchschnittlichen Porenöffnungen pro h stieg dagegen signifikant (p < 0,05) an und war unter calciumfreien Bedingungen etwa doppelt so hoch (125 Porenöffnungen/h) wie unter physiologischen Calciumverhältnissen (62 Porenöffnungen/h). Calcium scheint folglich für die Bindung, Insertion und Porenbildung durch SLO nicht benötigt zu werden, die Abwesenheit von Calcium erhöhte sogar die Öffnungswahrscheinlichkeit der Poren.

Außerdem fiel auf, dass sich von den gebildeten Poren unter calciumfreien Verhältnissen (- Ca<sup>2+</sup>) signifikant weniger verschlossen als unter Normalbedingungen (+ Ca<sup>2+</sup>). Während in den Kontrollexperimenten 52 Porenschlüsse/h zu beobachten waren, so waren es unter calciumfreien

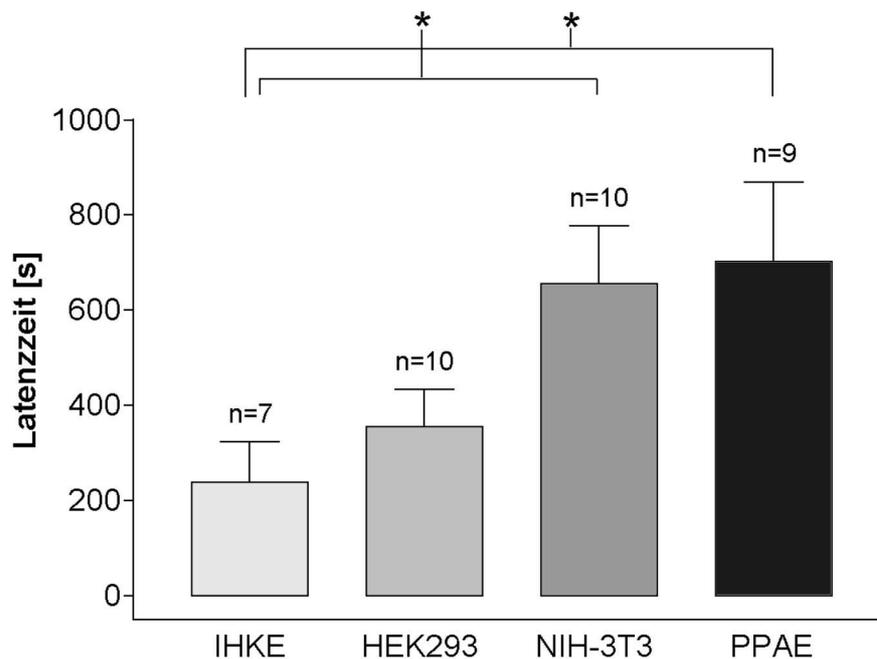
Verhältnissen nur 30 Porenschlüsse/h. Zudem war die Porenschlußkinetik deutlich verändert. Während schnelle und langsame Porenschlüsse unter physiologischen Calciumbedingungen etwa gleichhäufig auftraten (29 schnelle und 23 langsame Porenschlüsse/h), war die Zahl der schnellen Porenschlüsse ohne Calcium signifikant um das Achtfache reduziert (4 schnelle Porenschlüsse/h). Die Zahl der langsamen Porenschlüsse blieb unter calciumfreien Bedingungen im wesentlichen unverändert (27 langsame Porenschlüsse/h). Offensichtlich ist Calcium also für die Porenschlüsse mit langsamer Kinetik nicht erforderlich, während für die schnellen Porenschlüsse eine sehr starke Calciumabhängigkeit besteht.

## **3.2. Sensitivität unterschiedlicher Zelltypen auf SLO**

### **3.2.1. Porenbildende Wirkung an verschiedenen Zelltypen**

Bei der Ausbreitung von Infektionen im Körper spielt das Gefäßendothel als Barriere eine zentrale Rolle. Gelingt die Zerstörung der Endothelzellen, so kann sich eine Infektion ungehindert ausbreiten. Nach der Überwindung lokaler Gewebegrenzen können dann unterschiedlichste Gewebezellen betroffen sein. Besonders den Fibroblasten kommt in zahlreichen Organen eine Bedeutung als Bindegewebe- und Stützzellen zu.

Aus diesem Grund wurde die porenbildende Wirkung von SLO sowohl auf Schweineendothelzellen (PPAE), als auch auf Mäusefibroblastenzellen (NIH-3T3) untersucht. Schließlich wurden als weitere Zelllinie auch humane Nierenepithelzellen (IHKE) elektrophysiologisch gemessen. Die Abbildung 12 vergleicht die Ergebnisse der Messungen an PPAE-, NIH-3T3- und IHKE-Zellen mit den bereits durchgeführten Messungen an HEK293-Zellen (vgl. Abschnitt 3.1.2.).



**Abbildung 12:** Vergleich der Wirkung von SLO auf verschiedene Zelltypen (IHKE, HEK293, NIH-3T3, PPAE). Als SLO-Aktivitätsparameter wurde die Latenzzeit von der Toxinapplikation bis zur Bildung der ersten Pore gewählt. Die eingesetzte SLO-Konzentration betrug jeweils 10 ng/ml, das Membranpotential -50 mV. \*signifikante Latenzzeitunterschiede ( $p < 0,05$ )

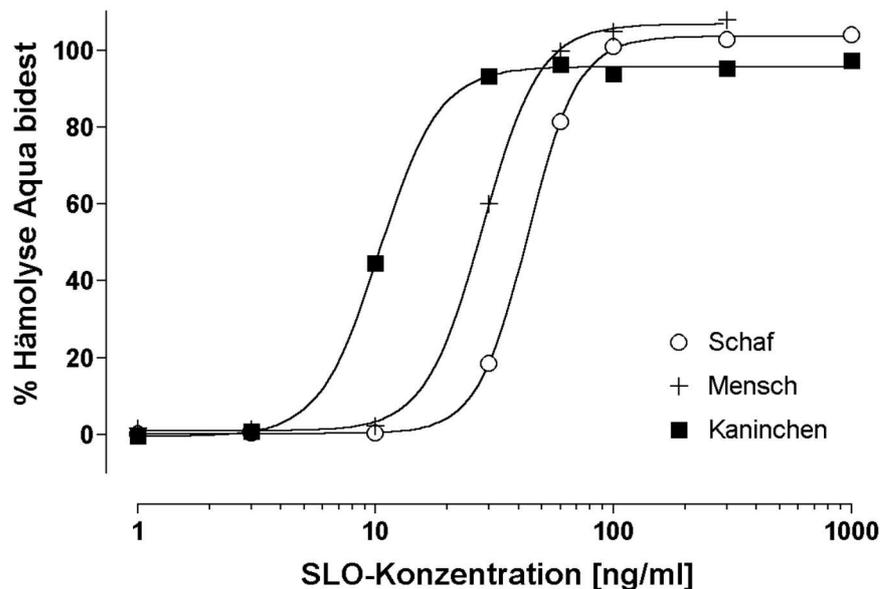
Die mittleren Latenzzeiten der PPAE-Zellen ( $703 \pm 167$  s) und der NIH-3T3-Zellen ( $656 \pm 122$  s) waren jeweils um den Faktor 2 bis 3 länger als die der HEK293-Zellen ( $355 \pm 79$  s) und der IHKE-Zellen ( $239 \pm 85$  s). SLO wirkte also potenter auf die beiden Nierenzelltypen (IHKE, HEK293) als auf Endothel-(PPAE) bzw. Fibroblastenzellen (NIH-3T3). Folglich wäre ein organspezifischer Sensitivitätsunterschied auf SLO denkbar. Andererseits könnten die Ergebnisse auch auf einen speziesspezifischen Unterschied hinweisen, da es sich bei IHKE- und HEK293-Zellen um humane Zelllinien handelt, während die anderen beiden Zelllinien (NIH-3T3, PPAE) tierischer Abstammung sind.

### 3.2.2. Lytische Wirkung an Erythrozyten verschiedener Spezies

Zur weiteren Abklärung der Sensitivitätsunterschiede sollte nun der gleiche Zelltyp bei verschiedenen Spezies untersucht werden. Dazu eignet sich der Hämolyseassay, bei dem die durch SLO induzierte Lyse verschiedener Erythrozyten miteinander verglichen wurde.

In dem Experiment wurde mit 10 % Suspensionen (w/v) von Schafserythrozyten, Kaninchenerythrozyten und humanem Erythrozyten gearbeitet, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von SLO versetzt und je 30 min bei

37° C inkubiert wurden. Das bei der Lyse freigesetzte Hämoglobin wurde nach Abzentrifugation der intakten Erythrozyten photometrisch bestimmt. Abbildung 13 zeigt die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven der Hämolyse durch SLO.



**Abbildung 13:** Konzentrations-Wirkungskurven der Hämolyse von Schafs-, Kaninchen- und menschlichen Erythrozyten durch SLO. Ordinate: Hämolyse durch SLO in Prozent der Hämolyse durch Aqua bidest; Abszisse: SLO-Konzentrationen. Die drei Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$H = H_{\max} / [1 + (EC_{50} / c)^n]$$

nach dem Least-Squares-Fit-Verfahren an die drei Datensätze angepaßt. Dabei war H die Hämolyse durch SLO in Prozent der Lyse durch Aqua bidest,  $H_{\max}$  die maximale Hämolyse,  $EC_{50}$  die halbmaximale effektive Konzentration, c die eingesetzten SLO-Konzentrationen und n der Hill-Koeffizient.

Die Anpassung der Hill-Gleichung an die drei Datensätze mit Hilfe des Least-Squares-Fit-Verfahrens ergab eine halbmaximale effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) von  $43,7 \pm 1,0$  ng/ml SLO bei einem Hill-Koeffizienten von  $4,1 \pm 0,1$  für die Schafserythrozyten. Für die humanen Erythrozyten wurde ein geringerer  $EC_{50}$ -Wert von  $28,2 \pm 1,0$  ng/ml SLO und ein Hill-Koeffizient von  $3,6 \pm 0,3$  errechnet. Die Potenz von SLO auf die Kaninchenerythrozyten war mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $10,4 \pm 1,2$  ng/ml SLO und einem Hill-Koeffizienten von  $3,5 \pm 0,5$  am größten. Da sich die 95 % Konfidenzintervalle der drei Kurven jeweils nicht überschneiden, waren diese Sensitivitätsunterschiede signifikant.

Von den untersuchten roten Blutkörperchen waren demnach die Kaninchenerythrozyten um den Faktor 4 sensitiver auf SLO als die Schafserythrozyten. Die humanen Erythrozyten nahmen eine Mittelstellung ein. In der Tat scheinen also speziesspezifische Unterschiede im Aufbau der Zellmembranen einen Einfluß auf die Potenz von SLO zu haben. Auch interindividuelle Unterschiede - z.B. durch Blutgruppenantigene - sind nicht auszuschließen, da jeweils nur Blutproben eines Individuums untersucht wurden.

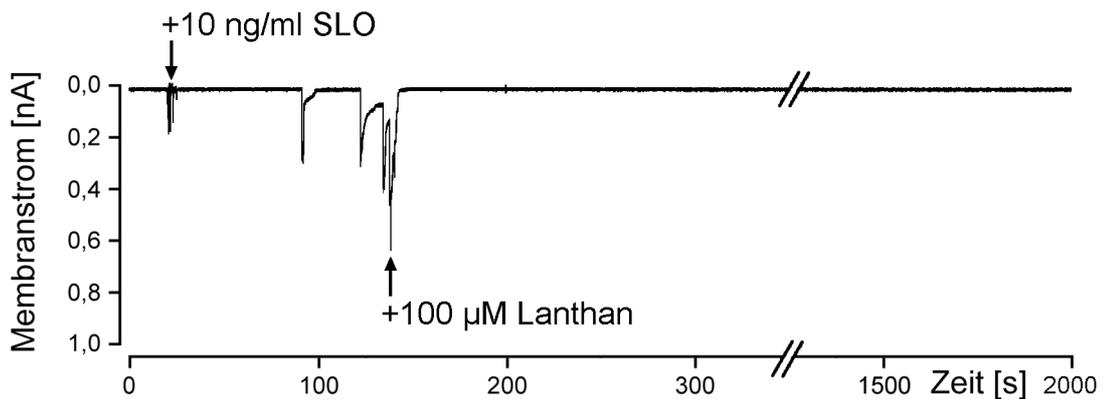
Die errechneten Hill-Koeffizienten lagen alle zwischen 3,5 und 4,1 (Mittelwert 3,7) und stimmen damit sehr gut mit dem geschätzten Hill-Koeffizienten von 3,6 aus den Patch-Clamp Experimenten (vgl. Abschnitt 3.1.2.) überein. Sie belegen nochmals, dass mindestens vier SLO-Moleküle zur Ausbildung einer SLO-Pore benötigt werden.

### **3.3. Pharmakologische Beeinflussung der SLO-Aktivität**

Ziel der Untersuchungen war es, Substanzen zu finden, die die SLO-induzierte Porenbildung hemmen oder die Porenströme blockieren und die klinisch im Rahmen einer systemischen Infektion eingesetzt werden könnten, um Zellschäden durch SLO zu verhindern. Dabei wurden Substanzen ausgewählt, die in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur Blockade verschiedener Toxinporen eingesetzt worden waren.

#### **3.3.1. Lanthan**

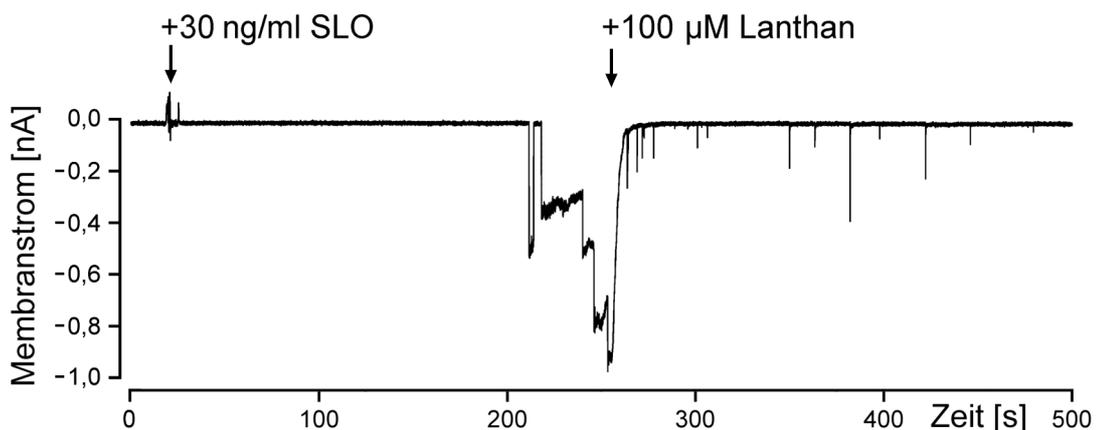
Lanthan ist ein Metall der seltenen Erden aus der 3. Hauptgruppe der Elemente. Es ist bekannt, dass Lanthan verschiedene Ionenkanäle blockiert (Übersicht Palasz und Czekaj 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) gelöstes Lanthanchlorid ( $LaCl_3$ ) verwendet. Zunächst wurde der Einfluß von Lanthan auf die Porenströme an HEK293-Zellen getestet. Die Abbildung 14 zeigt eine repräsentative Messung.



**Abbildung 14:** Blockade des SLO-induzierten Porenstroms in einer HEK293-Zelle durch Lanthan. Erster Pfeil: Applikation von 10 ng/ml SLO; zweiter Pfeil: Zugabe von 100 µM Lanthanchlorid. Das Membranpotential betrug -50 mV. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt. Um den porenblockierenden Effekt besser darzustellen, wurde die Zeitachse in den ersten 350 s gespreizt.

SLO wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml in die Badlösung appliziert. Nach Bildung der ersten Poren erfolgte die Zugabe von 100 µM Lanthanchlorid, was zur unmittelbaren Abnahme des Porenstroms auf den unspezifischen Membranstrom, der zu Beginn der Messung ermittelt wurde, führte. Im Verlauf der 30-minütigen Messung wurden keine weiteren Porenströme registriert. In insgesamt 10 Experimenten konnte der SLO-induzierte Porenstrom durch 100 µM Lanthan vollständig blockiert werden.

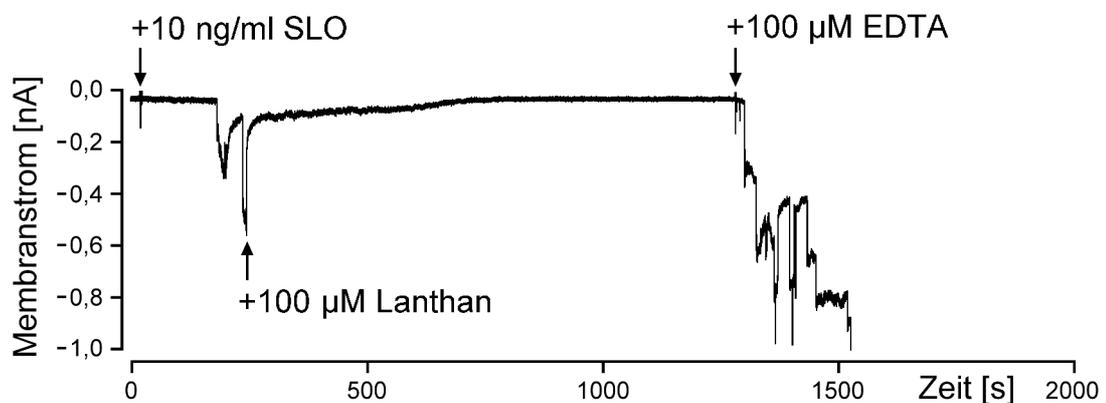
Wählte man eine höhere Toxinkonzentration (30 ng/ml SLO), so kam es auch hier zu einer Blockade des Porenstroms durch 100 µM Lanthan (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Blockade des SLO-Porenstroms durch Lanthan in einer HEK293-Zelle. SLO wurde in einer Konzentration von 30 ng/ml eingesetzt, die Lanthankonzentration betrug 100 µM. Es ist ein Ausschnitt von 500 s der 30-minütigen Messung dargestellt. Das Membranpotential betrug -50 mV. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt.

Bei dieser hohen SLO-Konzentration war die Porenbildung durch SLO so stark, dass im weiteren Verlauf der Versuche (n=4) immer wieder einzelne Porenöffnungen zu registrieren waren. Diese Poren wurden jedoch sofort durch Lanthan blockiert, d.h. die Offenzeiten der Poren (< 1 s) waren sehr viel kürzer als ohne Lanthan. Folglich fand kein wesentlicher Ladungsfluß durch die Poren statt.

Mikroskopisch waren keine Blebs sichtbar, die bei 30 ng/ml SLO in HEK293-Zellen ohne Lanthanzugabe üblicherweise beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.1.2.). Somit zeigte sich auch mikroskopisch ein protektiver Effekt von Lanthan.

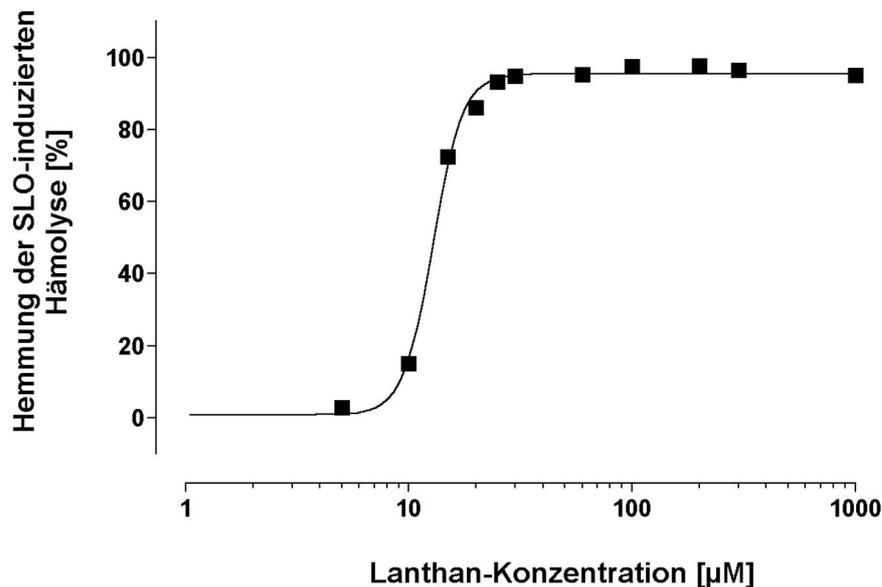


**Abbildung 16:** Aufhebung der Lanthan-induzierten Porenblockade durch EDTA in einer HEK293-Zelle. Die Blockade des SLO-Porenstroms durch 100  $\mu\text{M}$  Lanthanchlorid konnte durch 100  $\mu\text{M}$  EDTA unmittelbar wieder aufgehoben werden. Das Membranpotential betrug -50 mV. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt.

Die Blockade der Porenströme durch Lanthan ist ein reversibler Prozeß. Kationenchelatoren wie EDTA binden Lanthanionen mit sehr hoher Affinität, wodurch sich die Lanthan-induzierte Porenblockade wieder aufheben läßt (n=5). Die Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Experiment. In Kontrollversuchen mit 100  $\mu\text{M}$  EDTA waren keine Eigeneffekte auf die Membranströme der Zellen zu beobachten.

Um zu untersuchen, ob die Porenblockade durch Lanthan auch vor der Zellyse schützt, wurden Hämolyseassays mit unterschiedlichen Lanthankonzentrationen durchgeführt. SLO wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, die eine 100 % Hämolyse herbeiführt (vgl. Abschnitt 3.2.2., Abb. 13). Lanthan wurde vor der Toxinzugabe in 11 verschiedenen Konzentrationen zu den Schafserythrozytensuspensionen appliziert. Die

konzentrationsabhängige Hemmung der SLO-induzierten Hämolyse durch Lanthan zeigt die Abbildung 18.



**Abbildung 18:** Hemmung der SLO-induzierten Hämolyse von Schafserthrozyten in Abhängigkeit von der Lanthankonzentration. Ordinate: Hämolysehemmung in Prozent; Abszisse: Lanthankonzentration. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung nach dem Least-Squares-Fit-Verfahren an die Datenpunkte angepaßt:

$$I = I_{\max} / [1 + (EC_{50} / c)^n]$$

I steht für die Inhibition der Hämolyse in Prozent der Lyse durch 100 ng/ml SLO,  $I_{\max}$  für die maximale Hämolyseinhibition (96 %),  $IC_{50}$  für die halbmaximale inhibitorische Konzentration (12,9 µM Lanthan), c für die eingesetzte Lanthan-Konzentration und n für den Hill-Koeffizienten (6,5).

Es zeigte sich eine sehr steile Konzentrations-Inhibitionskurve. Mit Hilfe der Hill-Gleichung errechnete sich aus den Daten eine halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $12,9 \pm 1,0$  µM Lanthan und ein Hill-Koeffizient von  $6,5 \pm 0,5$ . Selbst in hohen Konzentrationen (1 mM) war kein lytischer Effekt durch Lanthan allein zu beobachten. Der protektive Effekt von 100 µM Lanthan wurde in Anwesenheit von EDTA (5 mM) vollständig aufgehoben (Daten nicht gezeigt).

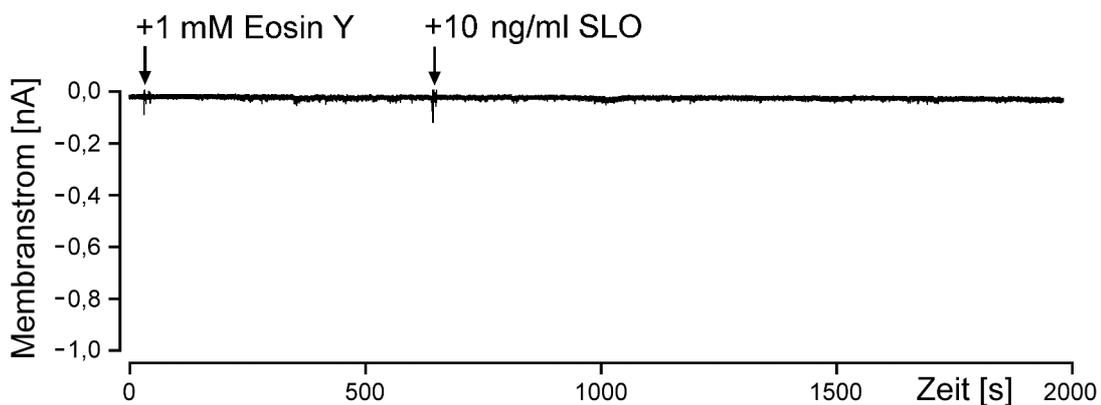
Die porenblockierende Wirkung von 100 µM Lanthan konnte in Patch-Clamp Experimenten auch an der Zelllinie PPAE, sowie bei einer Badtemperatur von 37° C und bei erniedrigtem pH-Wert (pH 6,55) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Lanthan ist demzufolge ein effektiver Porenblocker, der in den durchgeführten Experimenten selbst keinen zellschädigenden oder hämolytischen Effekt hatte.

### 3.3.2. Eosin Y

Eosin Y ist ein rotgelber Farbstoff, der in der Mikroskopie für Gewebefärbungen verwendet wird. Eosin Y ist außerdem in der Lage, plasmamembranständige Calcium-ATPasen zu blockieren (Gatto et al. 1993). Der Farbstoff wurde in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst.

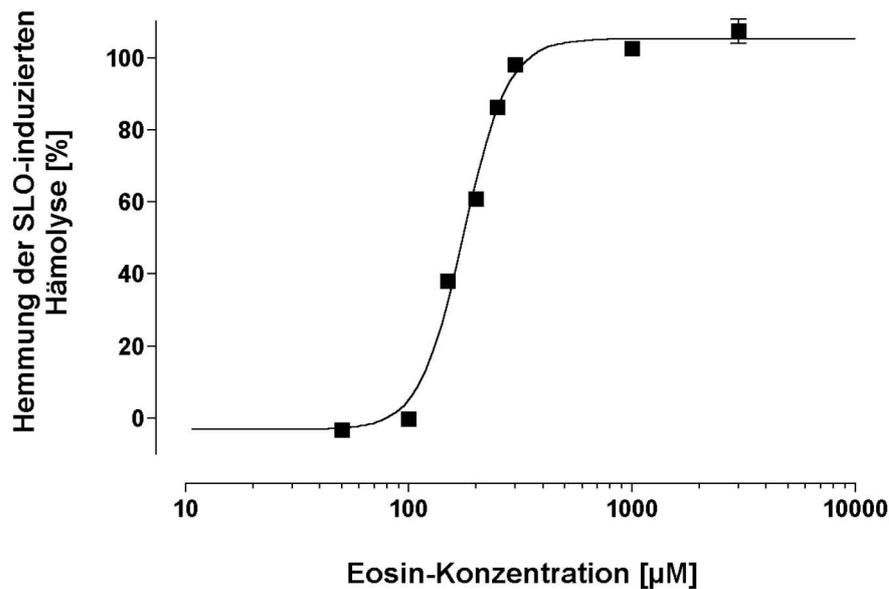
Auch Eosin Y wurde auf eine mögliche Blockade SLO-induzierter Porenströme an HEK293-Zellen getestet. Zunächst wurde es wie Lanthan nach Bildung der ersten SLO-Poren appliziert. Auf diese Weise konnte mit Eosinkonzentrationen bis zu 1 mM jedoch kein porenblockierender Effekt beobachtet werden ( $n=5$ ).

Dann wurden die Zellen für 10 min mit Eosin Y vorinkubiert, bevor SLO in einer Konzentration von 10 ng/ml appliziert wurde. Ab einer Eosin Y-Konzentration von 1 mM konnten keine Porenströme mehr registriert werden ( $n=6$ ), d.h. die Porenbildung wurde vollständig gehemmt. In Abbildung 19 ist eine solche Messung dargestellt.



**Abbildung 19:** Hemmung der porenbildenden Wirkung von SLO durch Vorinkubation einer HEK293-Zelle mit Eosin Y. Erster Pfeil: Applikation von 1 mM Eosin Y; zweiter Pfeil: Applikation von 10 ng/ml SLO. Als Extrazellulärlösung wurde  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$  eingesetzt. Das Membranpotential betrug -50 mV.

Analog dem Hämolyseassay mit Lanthan (vgl. Abschnitt 3.3.1.) wurden Hämolyseassays an Schafserythrozyten mit verschiedenen Eosin Y-Konzentrationen durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen.



**Abbildung 20:** Hemmung der SLO-induzierten Hämolyse von Schafserthrozyten in Abhängigkeit von der Eosin Y-Konzentration. Ordinate: Hämolysehemmung in Prozent; Abszisse: Eosinkonzentration. Um eine Verfälschung der Extinktion durch den rotgelben Farbstoff zu verhindern, wurden die Werte der jeweils parallel gemessenen toxischen Eosinkontrollen subtrahiert. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung nach dem Least-Squares-Fit-Verfahren an die Datenpunkte angepaßt (vgl. 3.3.1.). Dabei betrug der  $I_{max}$ -Wert 100 %, der  $IC_{50}$ -Wert 176,4 µM Eosin Y und der Hill-Koeffizient 4,4.

Auch hier zeigte sich eine steil verlaufende Konzentrations-Inhibitionskurve mit einem Hill-Koeffizienten von  $4,4 \pm 0,5$ . Die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) betrug  $176,4 \pm 1,0$  µM Eosin Y. In den eingesetzten Konzentrationen konnte kein lytischer Effekt durch Eosin Y selbst beobachtet werden.

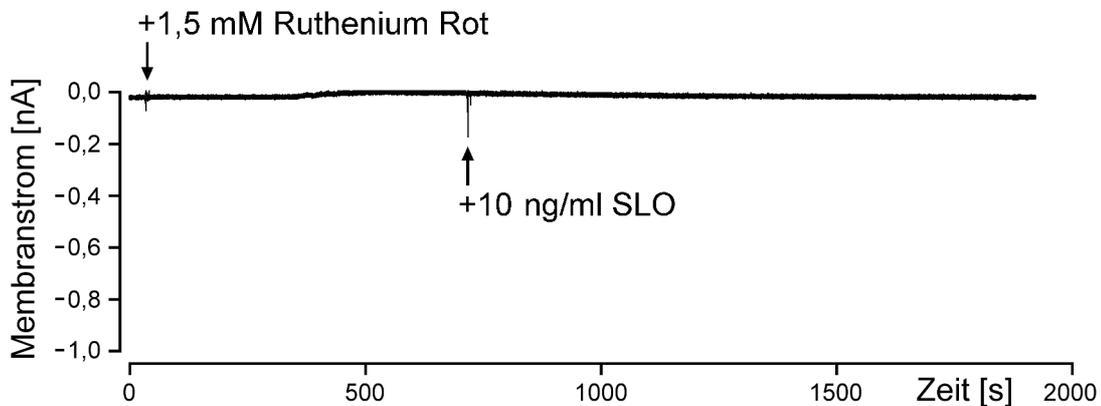
Die Hemmung der SLO-induzierten Porenbildung durch 1 mM Eosin Y konnte elektrophysiologisch auch an PPAE-Zellen und im sauren Milieu (pH 6,55) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eosin Y ist demnach in der Lage, sowohl die SLO-induzierte Porenbildung zu hemmen als auch die Hämolyse durch SLO effektiv zu verhindern.

### 3.3.3. Ruthenium Rot

Ruthenium Rot ist ein Farbstoff, der den mitochondrialen Calcium-Uniporter blockiert (Moore 1971). Das eingesetzte Rutheniumchlorid-Hexahydrat wurde in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) mit 0,5 % FAF-BSA gelöst.

In den zunächst durchgeführten Experimenten war Ruthenium Rot in Konzentrationen bis zu 1,5 mM nicht in der Lage, die durch SLO gebildeten Poren in HEK293-Zellen zu blockieren. Daher wurden die HEK293-Zellen für

10 min mit Ruthenium Rot vorinkubiert, bevor 10 ng/ml SLO appliziert wurden. Auf diese Weise konnte eine die Porenbildung hemmende Wirkung bei einer Konzentration von 1,5 mM Ruthenium Rot festgestellt werden (Abb. 21).



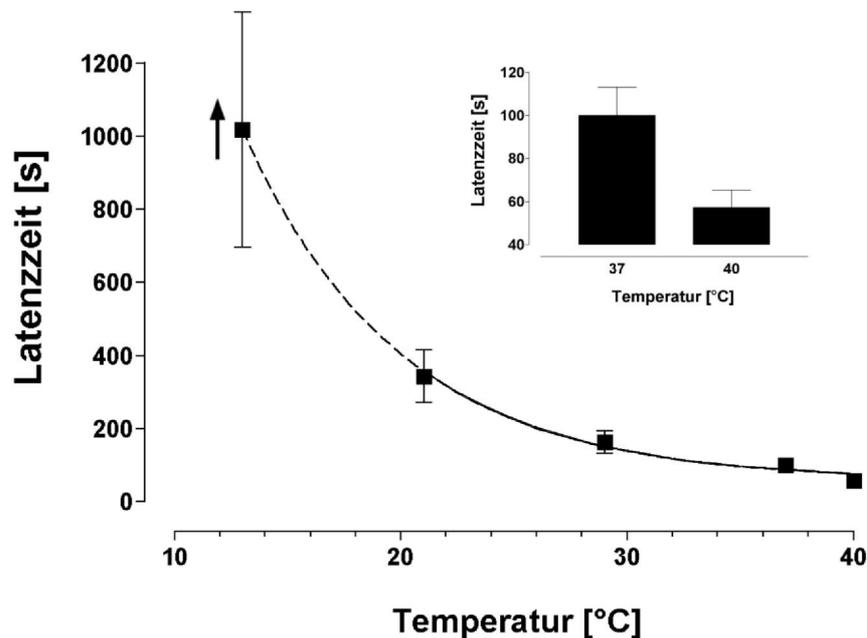
**Abbildung 21:** Hemmung der SLO-induzierten Porenbildung in einer HEK293-Zelle durch Ruthenium Rot. Nach 10-minütiger Vorinkubation mit 1,5 mM Ruthenium Rot wird die Porenbildung durch 10 ng/ml SLO vollständig gehemmt. Das Membranpotential betrug -50 mV. Verwendet wurde als Extrazellulärlösung  $E_1$ , als Intrazellulärlösung  $IBL_{100n}$ .

Allerdings kam es in dieser Konzentration bereits zu einem starken Ausfall großer Farbkristalle, die mikroskopisch die Sicht sehr behinderten. In geringeren Konzentrationen (500  $\mu$ M) war Ruthenium Rot nicht wirksam. Daher wurde auf weitere Experimente mit Ruthenium Rot verzichtet.

### 3.4. Pathophysiologische Beeinflussung der SLO- Aktivität

#### 3.4.1. Temperatur

Elektrophysiologische SLO-Aktivitätsbestimmungen wurden bisher immer bei 21° C durchgeführt. Die Körpertemperatur des gesunden Menschen beträgt jedoch etwa 37° C und kann bei Fieber im Rahmen eines Infektes auf über 40° C ansteigen. Aus diesem Grund sollte die SLO-Wirkung in Abhängigkeit von der Temperatur elektrophysiologisch an HEK293-Zellen untersucht werden. Abbildung 22 stellt die Ergebnisse der Messungen bei Temperaturen zwischen 13° und 40° C dar.



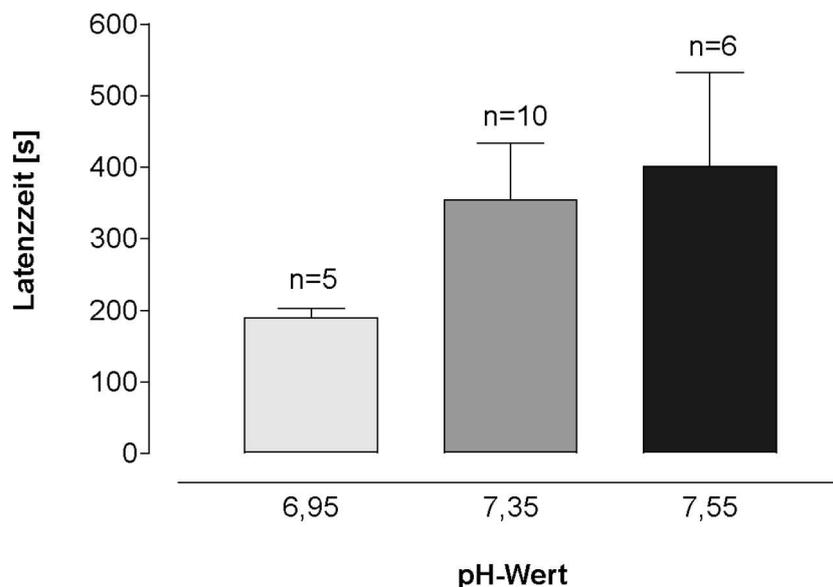
**Abbildung 22:** Temperaturabhängigkeit der SLO-Aktivität. Ordinate: Latenzzeit von der Toxinapplikation (jeweils 10 ng/ml SLO) bis zur ersten Porenbildung. Abszisse: Badtemperaturen: 13° (n=5), 21° (n=11), 29° (n=5), 37° (n=5) und 40° C (n=5). Bei 13° C zeigten 2 von 5 gemessenen Zellen bis zum Ende der Meßzeit (1800 s) keine Porenbildung. Bei diesen Zellen wurde als Näherung für die Latenzzeit die maximale Meßzeit von 1800 s eingesetzt. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion an die Datenpunkte angepaßt. Rechts oben im Bild sind die Meßwerte bei 37° und 40° C als Balkendiagramm dargestellt.

Es zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Badtemperatur und der Latenzzeit von der Toxinapplikation bis zur Bildung der ersten Pore, die als SLO-Aktivitätsparameter gewählt wurde. Die porenbildende Aktivität von SLO war bei 37° C signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei der Standardtemperatur von 21° C. Klinisch besonders interessant ist, dass eine Temperaturerhöhung um nur drei Grad von 37° auf 40° C annähernd zu einer Verdopplung der Toxinaktivität führte, wobei die Latenzzeit signifikant von  $100 \pm 13$  s auf  $57 \pm 8$  s reduziert war ( $p < 0,05$ ). Bestimmt man den Faktor, um den sich die Latenzzeit bei einer Temperaturänderung von 10° C ändert, so ergibt sich ein  $Q_{10}$ -Wert von etwa 2,8. Demnach könnten febrile Temperaturen im Rahmen einer Streptokokkeninfektion zu einer pathophysiologisch relevanten Aktivitätssteigerung von SLO führen.

### 3.4.2. pH-Wert

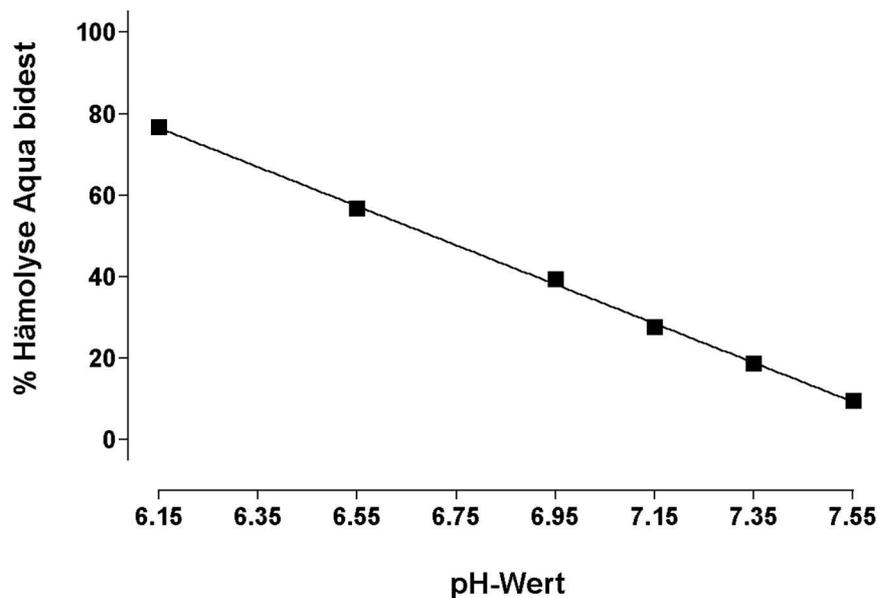
Durch verschiedene Stoffwechselprodukte herrscht in entzündetem Gewebe ein niedrigerer pH-Wert vor als in gesundem Gewebe. Für Listeriolysin O ist eine Aktivitätszunahme bei sauren pH-Werten beobachtet worden (Glomski et al. 2002, Bittenbring 2006). Dies konnte für Pneumolysin nicht gezeigt werden (Schramm 2004).

Die pH-Abhängigkeit der porenbildenden Wirkung von SLO war daher von großem Interesse. Hierzu wurden zunächst Patch-Clamp Experimente an HEK293-Zellen mit Extrazellulärlösungen unterschiedlicher pH-Werte durchgeführt. Dabei reichte das Spektrum vom sauren bis in den basischen Bereich (Abb. 23).



**Abbildung 23:** Abhängigkeit der SLO-Aktivität vom pH-Wert der Extrazellulärlösung in HEK293-Zellen. Als Aktivitätsparameter wurde die Latenzzeit von der Toxinapplikation (jeweils 10 ng/ml SLO) bis zur Bildung der ersten Pore gewählt. Es wurden die Extrazellulärlösungen  $E_1$  sauer (pH 6,95),  $E_1$  (pH 7,35) und  $E_1$  basisch (pH 7,55) verwendet. Als Intrazellulärlösung wurde IBL<sub>100n</sub> eingesetzt. Die Badtemperatur betrug 21° C, das Membranpotential -50 mV.

Die Ergebnisse der Patch-Clamp Messungen ließen eine pH-Abhängigkeit der SLO-Wirkung vermuten, wobei allerdings die gefundenen Unterschiede nicht signifikant waren. Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein Hämolyseassay mit Schafserythrozyten über einen größeren pH-Bereich (pH 6,15-7,55) durchgeführt. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Hämolysexperimente.



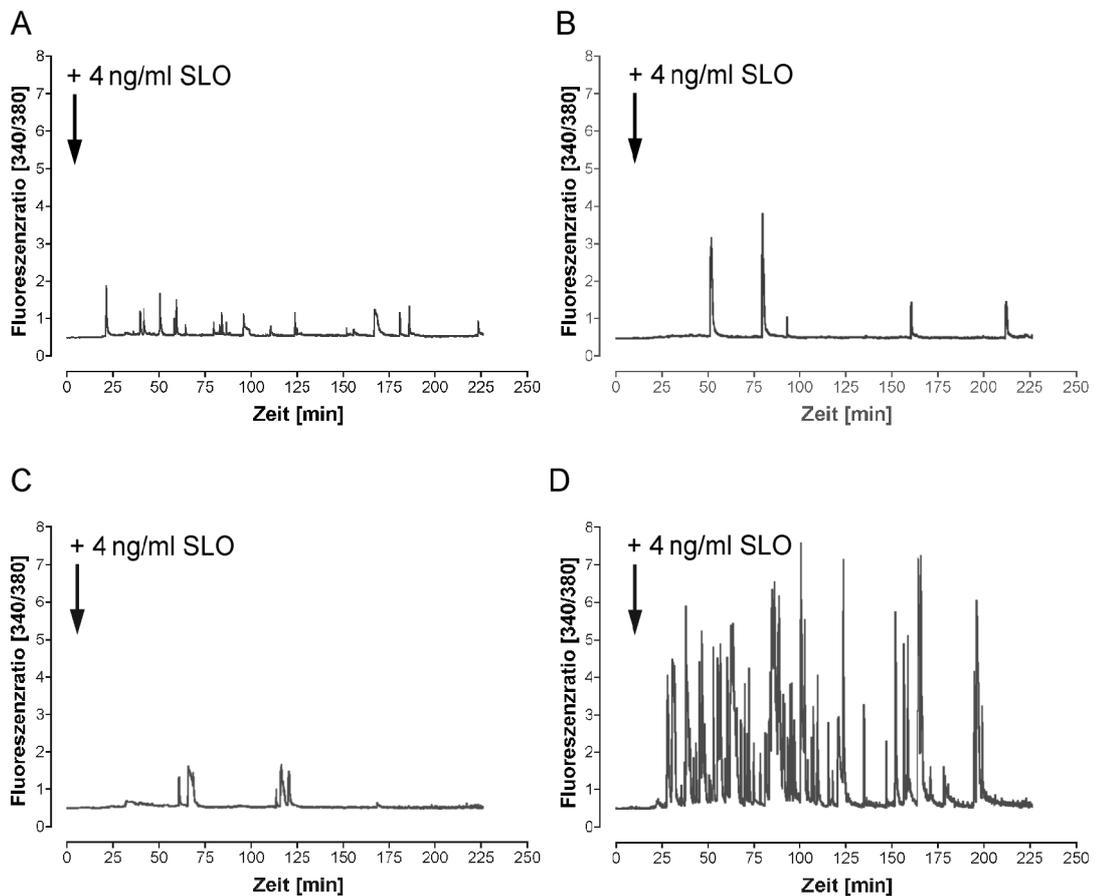
**Abbildung 24:** Abhängigkeit der SLO-induzierten Hämolyse vom pH-Wert der Extrazellulärlösung. Ordinate: Hämolyse durch 30 ng/ml SLO dargestellt in Prozent der Hämolyse durch Aqua bidest. Abszisse: pH-Wert der Extrazellulärlösung. Es wurden die Lösungen  $E_1$  sauer (pH 6,15, 6,55, 6,95 und 7,15),  $E_1$  (pH 7,35) und  $E_1$  basisch (pH 7,55) verwendet.

Es zeigte sich eine streng lineare Korrelation zwischen dem pH-Wert der Extrazellulärlösung und der Hämolyseaktivität von SLO. Eine Veränderung des pH-Wertes um 0,2 hatte eine Änderung der Hämolyseaktivität um fast 10 % zur Folge. Daraus ergab sich schon bei leichter Azidose (pH 7,15) eine hochsignifikante Steigerung ( $p < 0,005$ ) der hämolytischen SLO-Wirkung, bei leichter Alkalose (pH 7,55) eine hochsignifikante Minderung gegenüber physiologischen Verhältnissen (pH 7,35). Eine Absenkung des pH-Wertes von 7,35 auf 6,15 führte zu einer Hämolysesteigerung um das 4-fache. Die toxfreien Kontrollen zeigten keine signifikante Hämolyse aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte. Demnach könnte der pH-Wert des entzündeten Gewebes erheblich zur Steigerung der porenbildenden Aktivität und zur Zellyse durch SLO beitragen.

### 3.5. Langzeiteffekte durch SLO

#### 3.5.1. Calciumkonzentrationsänderung in HEK293-Zellen

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 AM lassen sich Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration als Änderungen der Fluoreszenzratio [340/380] über einen Zeitraum von mehreren Stunden messen. Dadurch ist es möglich, Langzeiteffekte von SLO auf die intrazelluläre Calciumionen-konzentration zu beobachten. Die Abbildung 25 zeigt typische Zeitverläufe der intrazellulären Calciumkonzentration von HEK293-Zellen über vier Stunden nach Applikation von 4 ng/ml SLO.

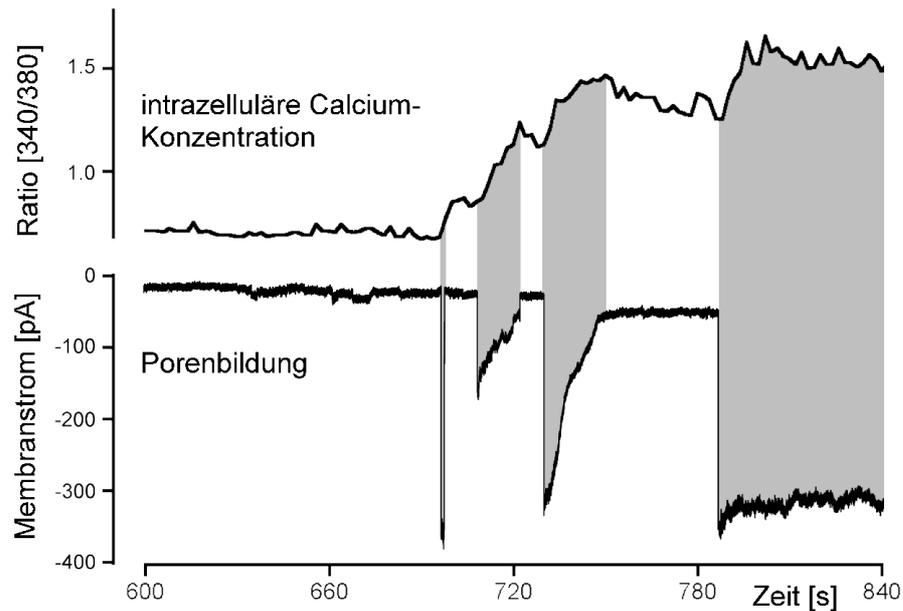


**Abbildung 25:** Typische Zeitverläufe der intrazellulären Calciumionenkonzentration bei vier HEK293-Zellen (A, B, C, D) nach Applikation von 4 ng/ml SLO. Ein Anstieg der Fluoreszenzratio [340/380] entspricht einem Anstieg der Calciumkonzentration. Insgesamt wurden 116 Zellen simultan bei 21° C über einen Zeitraum von 4 Stunden in 3 ml Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) gemessen.

Einige Minuten nach der Toxinapplikation zeigten sich einzelne, spikeartige Anstiege der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes wiesen in der Mehrheit der Fälle nur eine Dauer von wenigen Minuten auf, und die intrazelluläre Calciumionenkonzentration sank immer wieder rasch auf den Ruhewert ab.

Bei der Auswertung der 116 Zellen, von denen vier in Abbildung 25 dargestellt sind, fiel auf, dass der Zeitraum von der Toxinapplikation bis zum Auftreten des ersten Spikes variabel war (Latenzzeiten von 11 - 54 min). Weiterhin zeigte sich eine starke Variabilität in der Häufigkeit (5 – über 60 Spikes/4 h) und der Dauer (< 1 bis > 40 min) der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes. Es war keinerlei Periodizität im Auftreten dieser Spikes zu erkennen, so dass man nicht von regelmäßigen Oszillationen sprechen kann. Bei Überlagerung der 116 Einzelmessungen (Abbildung nicht dargestellt) wurde deutlich, dass die Häufigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes im Mittel nach etwa 60 min ein Maximum erreichte und gegen Ende der Messung wieder abnahm. In der eingesetzten sublytischen Konzentration (4 ng/ml SLO) waren keine dauerhaften Calciumkonzentrationsanstiege zu beobachten.

Der direkte Zusammenhang der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes mit der SLO-induzierten Porenbildung sollte in einem weiteren Experiment gezeigt werden. Die Messung der Membranströme mit Hilfe der Patch-Clamp Technik und der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe des FURA-2-Imaging wurde an einer HEK293-Zelle simultan durchgeführt. Abbildung 26 zeigt einen Ausschnitt aus einem entsprechenden Experiment.



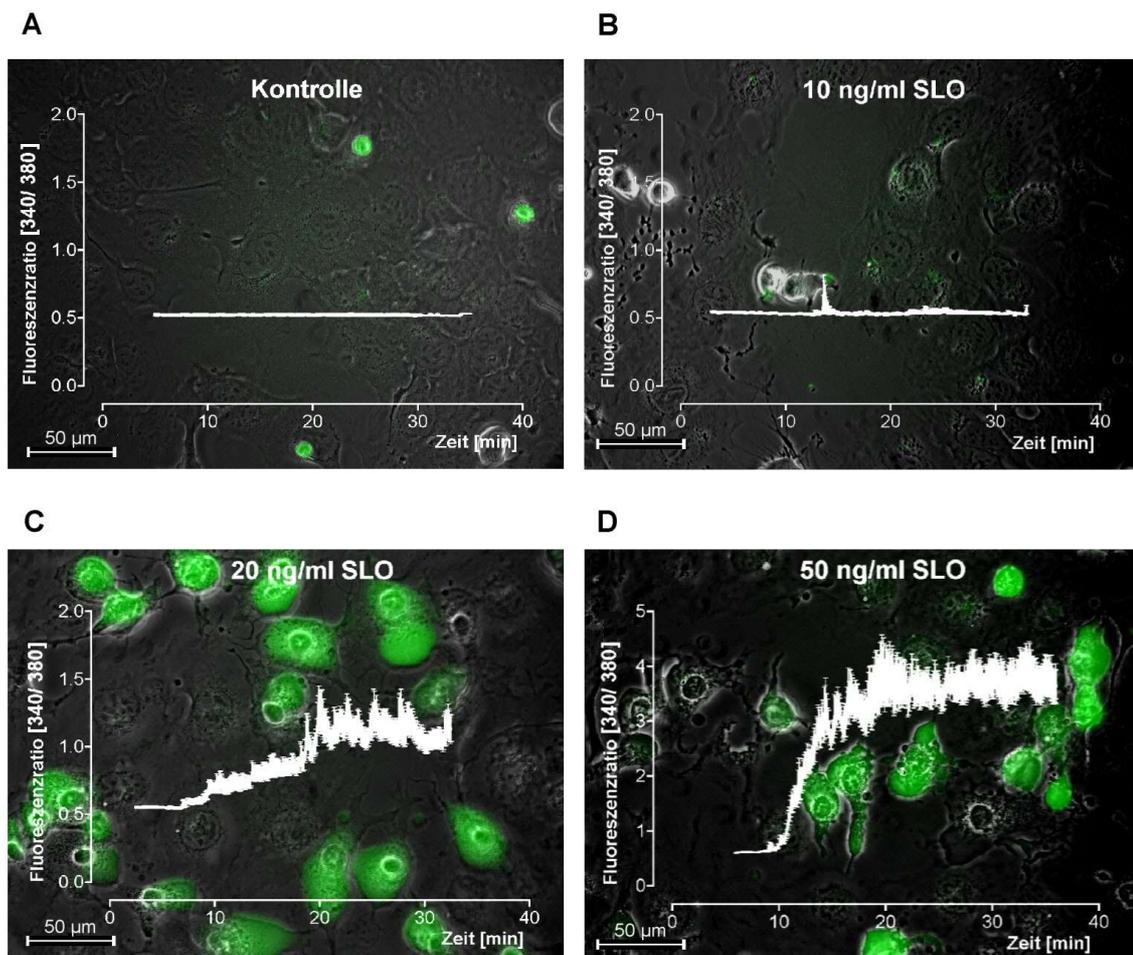
**Abbildung 26:** Zeitgleiche Messung der Fluoreszenzratio (oben) im FURA-2-Imaging und der Membranströme (unten) im Patch-Clamp Versuch an einer HEK293-Zelle nach Applikation von 4 ng/ml SLO. Die grau hinterlegte Fläche soll die unmittelbare zeitliche Korrelation zwischen der Porenbildung und dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verdeutlichen. Die Messung erfolgte in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) bei 21° C. Als Intrazellulärlösung wurde  $IBL_0$  eingesetzt.

Jede der elektrophysiologisch beobachteten Porenöffnungen führte unmittelbar zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dabei schien auch die Dauer der Porenöffnungen mit der Dauer der Calciumanstiege zu korrelieren. Wie die Experimente mit SLO an HEKhsK4-Zellen (vgl. Abschnitt 3.1.4.) schon gezeigt haben, besteht also ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Porenbildung und einem intrazellulären Calciumkonzentrationsanstieg. Dieser wird durch Calciumionen, die durch die SLO-Poren in die Zelle einströmen, verursacht.

### **3.5.2. Apoptoseinduktion durch SLO in IHKE-Zellen**

Für verschiedene CDTX wie z.B. für Listeriolysin O (Guzman et al. 1996) konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Auch Cywes-Bentley et al. (2005) zeigten kürzlich eine SLO-abhängige Apoptose bei Keratinozyten. Sie vermuteten, dass durch die SLO-Poren einströmendes Calcium zur Auslösung des programmierten Zelltodes geführt habe. Um dies zu überprüfen, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche mit Apoptoseexperimenten verknüpft. Der Nachweis der Apoptoseinduktion erfolgte über die Detektion aktivierter Caspasen, welche wichtige Schlüsselemente der Apoptose darstellen. Aktivierte Caspasen lassen sich über den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-110 nachweisen, welcher in ihrer Anwesenheit grün zu fluoreszieren beginnt.

HEK293-Zellen stellten sich als für die Apoptoseexperimente ungeeignet heraus, da sie sich während des Versuchs vom Schalenboden ablösten. Aus diesem Grund wurde mit der adhärenteren Zelllinie IHKE gearbeitet. Die Zellen wurden für 6 h unter Zellkulturbedingungen mit verschiedenen SLO-Konzentrationen inkubiert, bevor sie mit Rhodamin-110 behandelt und auf Apoptose untersucht wurden. Um einen Zusammenhang zwischen intrazellulärer Calciumionenkonzentration und Apoptose herstellen zu können, wurde zu jedem Apoptoseexperiment ein FURA-2-Imagingversuch mit der jeweiligen Toxinkonzentration durchgeführt. Die Bilder in der Abbildung 27 A bis D zeigen die Ergebnisse der Messungen mit unterschiedlichen SLO-Konzentrationen.



**Abbildung 27:** Darstellung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsverläufe direkt nach SLO-Applikation (weißer Graph) und der 6 h nach Toxinapplikation gemessenen Caspase-Aktivität (Fluoreszenzbild) in IHKE-Zellen. Die eingesetzten Toxinkonzentrationen betragen 0 (Kontrolle), 10, 20 und 50 ng/ml SLO. Der Verlauf der mittleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (jeweils  $n=50$  Zellen) wurde über 30 min nach Toxinapplikation im FURA-2-Imaging beobachtet (vgl. Abschnitt 3.5.1.). Auf Apoptose wurde untersucht, nachdem die Zellen für 6 h mit SLO in Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) unter Zellkulturbedingungen inkubiert worden waren. Die Caspase-Aktivität wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin-110 (grüne Fluoreszenz) nachgewiesen.

Bei den toxinfreien Kontrollmessungen konnte weder ein Calciumanstieg noch eine Caspase-Aktivität in den Zellen beobachtet werden (Abb. 27 A). Die einzelnen grünen Punkte stellen intrazelluläre Vesikel dar. Bei apoptotischen Zellen färbt sich jedoch das gesamte Zytoplasma grün.

Nach der Applikation von 10 ng/ml SLO zeigten einige wenige der insgesamt 50 gemessenen Zellen in den ersten 30 min nach Toxingabe typische Calciumspikes (Daten nicht gezeigt), die aber nicht zu einer andauernden Veränderung der mittleren intrazellulären Calciumkonzentration führten. Nach sechstündiger Toxininkubation (10 ng/ml SLO) waren keine apoptotischen Zellen zu sehen (Abb. 27 B). Ab einer SLO-Konzentration von 20 ng/ml zeigte

sich im Mittel eine stetige Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration im FURA-2-Imaging und eine deutliche Caspase-Aktivität im Apoptose-Assay (Abb. 27 C). Ein ähnliches Bild ergab sich beim Einsatz von 50 ng/ml SLO (Abb. 27 D), wobei die dauerhafte Calciumkonzentrationserhöhung im Mittel etwa um das drei- bis vierfache höher ausfiel als im vorangegangenen Experiment mit 20 ng/ml SLO. Die Rhodamin-Fluoreszenzen erscheinen in Experiment D etwas schwächer als in Experiment C, was auf die einsetzende Lyse der Zellen und damit ein „Auslaufen“ der Farbstoffe zurückgeführt wurde. Eventuell kam es bei dieser hohen Toxinkonzentration aber auch schneller zu einer Nekrose der Zellen, bei der keine aktivierten Caspasen gebildet wurden. Apoptotische Zellen waren folglich nur bei den SLO-Konzentrationen zu finden, die im FURA-2-Imaging zu einem intrazellulären Calcium-Overload geführt hatten. Die bei niedrigen Toxinkonzentrationen auftretenden Calciumspikes führten nicht zu einer Zellschädigung durch Apoptoseinduktion.

## 4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse beschäftigen sich mit der porenbildenden, hämolytischen sowie apoptoseinduzierenden Wirkung des Streptokokkenpathogenitätsfaktors Streptolysin O und seiner Beeinflussung durch pharmakologische und pathophysiologische Faktoren.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Porenbildung durch SLO an lebenden, kernhaltigen Zellen elektrophysiologisch und damit in Echtzeit beobachtet werden. In Abhängigkeit von der SLO-Konzentration bildeten sich in der Membran von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) einige Minuten nach der Applikation des Toxins die ersten Poren. Diese Poren zeigten eine nichtselektive Permeabilität sowohl für monovalente Ionen als auch für Calcium.

Bei der Auswertung der Porenstromamplituden bei niedrigen SLO-Konzentrationen (3 ng/ml) fand sich eine SLO-Grundpore mit einem Elementarstrom von 17 pA bei einem Membranpotential von -40 mV, entsprechend einer Leitfähigkeit von 425 pS. Bei höheren Toxin-konzentrationen ( $\geq 10$  ng/ml SLO) war auffällig, dass die Porenstromamplituden zwischen 15 und mehr als 500 pA lagen, wobei mehrere Maxima auffielen. Diese Maxima entsprachen immer etwa ganzzahligen Vielfachen der Stromamplitude der SLO-Grundpore. Das führt zu der Hypothese, dass sich Cluster von SLO-Grundporen in der Zellmembran bilden und miteinander interagieren, wobei jede Grundpore ihre elementare Leitfähigkeit besitzt. Durch synchrone Porenöffnungen kommt es dann zu den beobachteten größeren Porenstromamplituden, wobei die Wahrscheinlichkeit des separaten Öffnens einer einzelnen Pore mit zunehmender Toxinkonzentration immer geringer wird. Am häufigsten waren bei den von uns eingesetzten Konzentrationen synchrone Porenöffnungen von etwa 10 bis 12 Grundporen zu finden. Auch für Listeriolysin O ist bekannt, dass die kleinste gemessene Grundpore eine Leitfähigkeit von etwa 500 pS hat (Repp et al. 2002), während die Pneumolysin-Grundpore mit 680 pS etwas größer ist (Schramm 2004).

Bei Anwendung sublytischer Konzentrationen (10 ng/ml SLO) konnte bei 83 % der gebildeten Poren ein Porenschluß registriert werden. Die Porenschlüsse zeigten zwei unterschiedliche Kinetiken. In 56 % der ausgewerteten Fälle traten schnelle Porenschlüsse ( $< 10$  ms) auf, die in ihrer Kinetik den schnellen

Porenöffnungen stark ähnelten. Solche schlagartigen Stromzu- und Stromabnahmen finden sich typischerweise beim Öffnen bzw. Schließen von endogenen Ionenkanälen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch SLO gebildeten Poren einen Offen- und einen Geschlossen-Zustand haben. Eine andere Porenschlußkinetik war in 44 % der Fälle zu finden. Die dort auftretenden langsamen Schlüsse waren durch eine sukzessive, unterschiedlich schnell verlaufende Stromabnahme über mehrere Sekunden charakterisiert. Eine mögliche Erklärung für diese Art der Porenschlüsse wäre die Endocytose des Poren-enthaltenden Membranstückes durch die Zelle. Bei anderen in unserer Arbeitsgruppe untersuchten CDTX wie Listeriolysin O (Bittenbring 2006) und Pneumolysin (Schramm 2004) wurden ebenfalls schnelle und langsame Porenschlüsse beobachtet, die unter Normalbedingungen etwa gleichhäufig auftraten. Die Mechanismen der Porenschlüsse scheinen also bei allen drei Toxinen gleich oder zumindest sehr ähnlich zu sein. Die Messung der Porenbildung in Abhängigkeit von der SLO-Konzentration zeigte eine sehr steil verlaufende Konzentrations-Wirkungskurve. Mit steigender Toxinkonzentration verkürzte sich die Latenzzeit bis zur Bildung der ersten Pore, wobei der  $EC_{50}$ -Wert von  $\leq 5,7$  ng/ml SLO einen Näherungswert darstellt. Die auf jeden Fall im picomolaren Bereich liegende Konzentration weist auf eine sehr hohe Affinität von SLO zur Bindung an die Zellmembran und zur Bildung von Poren. Die Abschätzung des Hill-Koeffizienten von etwa 3,6 aus den Patch-Clamp Experimenten wurde durch die Hämolyseexperimente mit einem mittleren Hill-Koeffizienten von 3,7 bestätigt. Die Werte der Hill-Koeffizienten lassen darauf schließen, dass mindestens 4 SLO-Moleküle an der Bildung einer funktionsfähigen Pore beteiligt sind. Für Listeriolysin O wird beschrieben, dass aufgrund der Konzentrations-Wirkungskurve mindestens 3 Toxinmoleküle zur Bildung einer Pore benötigt werden (Repp et al. 2002, Butler 2005), für eine Pneumolysin-Pore sind es mindestens 2 Toxinmoleküle (Schramm, 2004). Für zwei andere nicht zu der Gruppe der CDTX zählende porenbildende Toxine, Aerolysin (Iachovache et al. 2006) und Staphylococcus  $\alpha$ -Toxin (Menestrina et al. 2003), wurde aus kristallographischen und biochemischen Untersuchungen geschlossen, dass 7 Moleküle zu Ausbildung einer Toxinpore benötigt werden. Auch für SLO und die anderen CDTX könnte man eine solche Heptamerbildung vermuten. Eher

unwahrscheinlich erscheint dagegen die von Sekiya et al. (1996) beschriebene Möglichkeit, dass sich 40 bis 50 SLO-Monomere zu einer Pore zusammenlagern. Bei diesen elektronenmikroskopisch beobachteten Strukturen handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine einzelne große Pore, sondern um bis zu 50 ringförmig aneinandergelagerte Einzelporen, die miteinander interagieren können, um synchron zu öffnen und zu schließen. Dies würde mit unserer Interpretation, dass die Porenstromamplituden ganzzahligen Vielfachen des Elementarstroms der SLO-Grundpore entsprechen, übereinstimmen. Die größten von uns beobachteten Porenströme betragen etwa 500 pA. Dies entspräche der synchronen Öffnung von 30 SLO-Grundporen. Dass voneinander unabhängige Kanäle miteinander interagieren und simultan öffnen und schließen können, ist z.B. für Chloridkanäle schon seit einiger Zeit bekannt (Chen 2005).

Desweiteren wurde die Porenkinetik in Abhängigkeit von Calcium untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die SLO-induzierte Porenbildung nicht von der Anwesenheit extrazellulären Calciums abhängig ist. Die Latenzzeiten bis zur Bildung der ersten Pore unterschieden sich in calciumfreien und calciumhaltigen Lösungen nicht. Allerdings nahmen die Porenöffnungen pro Zeiteinheit in calciumfreien Lösungen (125/h) im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit calciumhaltigen Lösungen (62/h) signifikant zu. Auch der Verlauf der Porenschlüsse änderte sich drastisch. Die Anzahl der Gesamtporenschlüsse war ohne Calcium signifikant kleiner (30/h) als mit Calcium (52/h). Vor allem für die schnellen Porenschlüsse konnte eine starke Calciumabhängigkeit nachgewiesen werden. Unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen waren die schnellen Porenschlüsse (4/h) um das Achtfache reduziert verglichen mit den Messungen unter physiologischen Calciumbedingungen (29/h). Interessanterweise scheinen die langsamen Porenschlüsse nicht calciumabhängig zu sein. Die Häufigkeit des Auftretens der langsamen Porenschlüsse unter calciumfreien Bedingungen (27/h) unterschied sich nicht signifikant von den Experimenten mit Calcium (22/h). Zhang et al. (2004) beobachteten eine calciumunabhängige Endozytose an Ganglienneuronenzellen, die durch Zelldepolarisation getriggert wird. Ein ähnlicher Endozytosemechanismus, der durch einen poreninduzierten

Kationeneinstrom getriggert wird, wäre auch für die langsamen Porenschlüsse denkbar.

Neben HEK293-Zellen wurde die SLO-induzierte Porenbildung auch an menschlichen Nierenepithelzellen (IHKE), Schweineendothelzellen (PPAE) und Mäusefibroblastenzellen (NIH-3T3) elektrophysiologisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die beiden Nierenzelllinien IHKE und HEK293 sensitiver auf SLO reagierten als die Endothelzellen PPAE bzw. die Fibroblastenzellen NIH-3T3. Es wäre damit denkbar, dass organspezifische Unterschiede in der Sensitivität auf das Toxin bestehen. Während die Niere im allgemeinen auf Noxen sehr empfindlich reagiert, zählen die Endothelzellen der großen Blutgefäße zu den widerstandsfähigeren Zelltypen. Besonders Fibroblastenzellen gehören zu den Zellen, die im Binde- und Stützgewebe, aber auch im Narbengewebe extremen Belastungen standhalten müssen.

Da es sich bei HEK293- und IHKE-Zellen aber auch um humane Zelllinien handelt, während PPAE- und NIH-3T3-Zellen tierischer Abstammung sind, ist auch ein speziesspezifischer Unterschied in der SLO-Sensitivität denkbar. Da *Streptococcus pyogenes* ein humanpathogener Keim ist, kann man annehmen, dass SLO spezifischer auf menschliche Zellen wirkt als auf tierische und sie stärker zu schädigen vermag.

Zur weiteren Abklärung der Sensitivitätsunterschiede wurde die SLO-induzierte Lyse bei Erythrozyten von Mensch, Schaf und Kaninchen miteinander verglichen. Kaninchenerythozyten ( $EC_{50}$  10,4 ng/ml SLO) wiesen die höchste SLO-Sensitivität auf, humane rote Blutkörperchen eine mittlere ( $EC_{50}$  28,2 ng/ml SLO) und Schafserythrozyten ( $EC_{50}$  43,7 ng/ml SLO) die geringste. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Tat speziesspezifische Unterschiede im Aufbau der Zellmembranen zu den beobachteten Sensitivitätsunterschieden führen. Auch in der Literatur finden sich Hinweise auf speziesspezifische Unterschiede. Walev et al. (1995) verglichen die lytische Aktivität durch SLO bei Kaninchen-, Mäuse- und Menschenerythozyten. Dabei hatte sich gezeigt, dass die roten Blutkörperchen von Kaninchen und Menschen sehr viel sensitiver für SLO waren als die von Mäusen. Die beobachteten Sensitivitätsunterschiede könnten schließlich aber auch auf interindividuellen Unterschieden beruhen, da jeweils nur Blutproben eines Individuums der

jeweiligen Spezies untersucht worden sind. Beispielsweise wäre es möglich, dass Blutgruppenantigene eine Rolle spielen.

Gerade bei invasiven Infektionen wie der Sepsis und in der Pathogenese des Toxic-Shock-Syndromes spielt die Zellschädigung durch SLO eine wichtige Rolle. Die Mortalität solcher Erkrankungen liegt trotz antibiotischer Therapie und intensivmedizinischer Versorgung über 20 %. Daher wäre es von großer klinischer Bedeutung, eine Substanz zu finden, die die Zellschädigung durch SLO verhindert und die ergänzend zur antibiotischen Therapie eingesetzt werden könnte. Von den in dieser Arbeit getesteten Substanzen hat Lanthan eine porenblockierende und Eosin Y sowie Ruthenium Rot eine die Porenbildung hemmende Wirkung gezeigt.

Lanthan erwies sich als sehr potenter Porenblocker, der in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die durch SLO gebildeten Poren vollständig blockierte. Diese Blockade der SLO-Poren konnte elektrophysiologisch an mehreren Zelllinien (HEK293, PPAAE) sowie unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen (37° C, Azidose) nachgewiesen werden. Auch im Hämolyseassay konnte die SLO-induzierte Lyse der Erythrozyten durch Lanthan vollständig verhindert werden. Die sehr steile Konzentrations-Inhibitionskurve mit einem Hill-Koeffizienten von 6,5 läßt vermuten, dass mindestens 7 Lanthanionen an einer Porenblockade beteiligt sind. Die Lanthanwirkung ist ein reversibler Prozeß, der durch Gabe von äquimolaren Konzentrationen an EDTA wieder aufgehoben werden kann. EDTA ist ein Kationenchelator, der mit Lanthanoiden sehr viel festere Bindungen eingeht als mit Calcium- oder Magnesiumionen und daher bevorzugt die Lanthanionen in der Extrazellulärlösung bindet.

Auch für andere CDTX wie Listeriolysin O (Bittenbring 2006) und Pneumolysin (Schramm 2004) konnte eine porenblockierende Wirkung der Lanthanoide Lanthan und Gadolinium nachgewiesen werden. Für den möglichen klinischen Einsatz von Lanthan als Porenblocker spricht, dass einige Lanthanoide bereits am Patienten angewandt werden. Allerdings wird Lanthan als Lanthancarbonat (Fosrenol®) in einer Verbindung eingesetzt, die bei oraler Gabe kaum aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird. Es dient der enteralen Phosphatbindung bei Dialysepatienten. Auch Gadolinium, welches in Form von Gadolinium-DTPA (Magnevist®) intravenös als Röntgenkontrastmittel appliziert wird, liegt komplexiert und nicht in Form freier Ionen in der Blutbahn vor. Es gibt also

bisher keine klinischen Erfahrungen mit freien Lanthanoidionen. Palasz und Czekaj (2000) beschreiben protektive, aber auch toxische Effekte von Lanthanoiden im Tierversuch. In den von mir durchgeführten Experimenten gab es auch in höheren Konzentrationen (1 mM Lanthan) keine mikroskopisch sichtbaren zytolytischen Effekte. Es ist jedoch fraglich, ob therapeutische Wirkspiegel an freien Lanthanionen im Serum überhaupt erreicht werden könnten, da bekannt ist, dass sie in hohem Maße an Serumalbumin gebunden werden (Schomacker et al. 1988).

Eosin Y ist ein weit verbreiteter Farbstoff in der Mikroskopie. Er wurde zunächst nach Beginn der SLO-induzierten Porenbildung in die Badlösung appliziert. Auf diese Weise zeigte sich weder eine Beeinflussung der Porenbildung noch eine porenblockierende Wirkung. Wurde jedoch eine 10-minütige Vorinkubation mit 1 mM Eosin Y durchgeführt, so konnte die Porenbildung vollständig gehemmt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine notwendige Interaktion von Eosin Y mit der Zellmembran hin und nicht auf eine einfache Blockade offener SLO-Poren durch den Farbstoff. Auch für Eosin Y ergab sich mit einem Hill-Koeffizienten von 4,4 eine steil verlaufende Konzentrations-Inhibitionskurve im Hämolyseassay. Die vollständige Lysehemmung läßt auf eine effektive Wirkung des Farbstoffs schließen. Die Hemmung der Porenbildung durch Eosin Y konnte an verschiedenen Zelltypen (HEK293, PPAE) und unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen (37° C, Azidose) nachgewiesen werden. Ein therapeutischer Einsatz von Eosin Y ist bisher nicht beschrieben.

Interessant ist, dass sowohl Lanthan, Eosin Y, als auch Ruthenium Rot  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bzw. -transporter blockieren. Lanthan blockiert verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und mechanisch aktivierte unselektive Ionenkanäle (Übersicht Palasz und Czekaj 2000), Eosin Y blockiert plasmamembranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (Gatto et al. 1993) und Ruthenium Rot blockiert den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (Moore 1971). Dies läßt vermuten, dass SLO-Poren eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter-ähnliche Struktur aufweisen. Möglich wäre auch, dass es sich um in der Membran vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle handelt, die durch SLO permanent offen gehalten werden. Diese Vorgehensweise, Kationenkanäle als Poren zu nutzen, ist zum Beispiel für Maitotoxin aus *Gambierdiscus toxicus*, einem marinen Dinoflagellaten, bekannt (Dietl und Volkl 1994).

Mit elektrophysiologischen Messungen an HEK293-Zellen konnte ich außerdem zeigen, dass die Porenbildung durch SLO ein stark temperaturabhängiger Prozeß mit einem  $Q_{10}$ -Wert von etwa 2,8 ist. Gegenüber den Messungen bei Raumtemperatur (21° C) war das Toxin bei Körpertemperatur (37° C) signifikant stärker porenbildend. Ich konnte nachweisen, dass sogar ein Temperaturunterschied von wenigen Grad Celsius (zwischen 37° und 40° C), der im Rahmen eines febrilen Infektes beim Menschen auftreten kann, zu einer signifikanten Erhöhung der Toxinaktivität führt. Mehrere Autoren haben beschrieben, dass SLO in der Lage ist, die Expression bzw. Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Interleukinen (1, 6, 8), Tumornekrosefaktor, Leukotrienen, Prostaglandinen ( $PGE_2$ ) und Hitze-Schock-Proteinen sowie die Complement-Aktivierung zu stimulieren (Bhakdi und Tranum-Jensen 1985; Hackett und Stevens 1992; Ruiz et al. 1998; Alouf 2000). Interessant ist, dass es damit einen selbstverstärkenden Effekt von SLO über Interleukin- (1 und 6) oder Prostaglandin- ( $PGE_2$ ) -stimulierung zu geben scheint, da diese Entzündungsmediatoren zu den wichtigsten fiebererzeugenden Faktoren zählen (Kaefer et al. 2005). Ihre Stimulierung könnte über die Erhöhung der Körpertemperatur zu einer Aktivitätssteigerung von SLO führen. Außerdem wird vermutet, dass SLO über die Stimulation von Tumornekrosefaktor zur Genese des Toxic-Shock-Syndromes beiträgt (Hackett und Stevens 1992). Demzufolge wäre die Fiebersenkung eine einfache und effektive Methode, die Auswirkungen einer Streptokokkeninfektion zu reduzieren.

Ein weiterer typischer Entzündungsparameter ist die Azidose des betroffenen Gewebes. Die Absenkung des pH-Wertes wird durch den relativen Sauerstoffmangel des entzündeten Gewebes und durch Stoffwechselprodukte wie Lactat und Wasserstoffprotonen verursacht. Ich konnte an HEK293-Zellen im Patch-Clamp Experiment und an Schafserythrozyten im Hämolyseassay eine pH-Abhängigkeit der SLO-Wirkung beobachten. Im Hämolyseassay zeigte sich eine streng lineare Korrelation. Eine Änderung des pH-Wertes um 0,2 hatte eine Änderung der Hämolyseaktivität um knapp 10 % zur Folge. Dadurch kam es schon bei leichter Absenkung des physiologischen pH-Wertes von 7,35 auf 7,15 zu einer hochsignifikanten Aktivitätssteigerung von SLO, während eine geringe Alkalisierung des Milieus von 7,35 auf 7,55 zu einer signifikanten Minderung der Toxinaktivität führte. Das rechtzeitige Ausgleichen des Säure-

Base-Haushaltes und die Gewährleistung einer ausreichenden Oxygenierung des Gewebes könnten demzufolge wichtige therapeutische Ergänzungen bei der Behandlung von systemischen Streptokokkeninfekten sein.

Da Calcium als intrazellulärer Messenger für viele Prozesse essentiell ist und über Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration Prozesse wie Zellproliferation, Genexpression und Apoptose gesteuert werden (Berridge et al. 1998), ist die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase eine zentrale Aufgabe jeder Zelle. In dieser Arbeit konnte an zwei verschiedenen Systemen gezeigt werden, dass SLO-Poren für Calciumionen permeabel sind. Bei HEKhsK4-Zellen kam es durch den Calciumioneneinstrom nach Porenbildung zur Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle, wodurch indirekt die Calciumpermeabilität der SLO-Poren nachgewiesen werden konnte. Im Calcium-Imaging mit FURA-2 AM konnte der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration dann direkt gezeigt werden. Die synchrone Messung der Porenbildung im Patch-Clamp Versuch und der intrazellulären Calciumkonzentration im Calcium-Imaging an derselben Zelle zeigte die unmittelbare zeitliche Korrelation und damit den Zusammenhang beider Prozesse. Außerdem konnte im Calcium-Imaging mit FURA-2-AM der Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration über mehrere Stunden gemessen werden. Es zeigten sich steile, spikeartige Anstiege, die in der Mehrzahl der Fälle nur Minuten andauerten. Die Calciumionen wurden also nach dem Schluß der Poren sehr rasch wieder aus dem Zytoplasma eliminiert. Um die intrazelluläre Calciumkonzentration zu senken, stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung: Die Aufnahme von Calciumionen über  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen ins sarco- oder endoplasmatische Retikulum, die Aufnahme über  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter in Mitochondrien und die Ausschleusung nach extrazellulär über plasmamembranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen oder  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (Orrenius et al. 2003).

Bei niedrigen SLO-Konzentrationen ließen sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes über mehrere Stunden aufzeichnen. Sie variierten dabei stark bezüglich ihrer Häufigkeit und Dauer. Das Auftreten der Spikes hängt damit vom statistischen Auftreten und von den Offenzeiten der SLO-Poren ab und läßt nicht auf die Induktion von endogenen Oszillationen in den betroffenen Zellen schließen, wie es z.B. für Alpha-Haemolysin postuliert wurde (Uhlen et al. 2000). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes zeigten

nach etwa einer Stunde ein Häufigkeitsmaximum, um dann gegen Ende der Messung immer seltener zu werden. Diese Beobachtung könnte zum einen auf einen Aktivitätsverlust des Toxins durch Inaktivierung bzw. Bindung, zum anderen auf die fortschreitende Endozytose der Poren zurückgeführt werden. Auch nach mehreren Stunden Inkubation mit 4 ng/ml SLO war mikroskopisch keine Schädigung der Zellen zu sehen.

Um zu untersuchen, ob die toxinbedingte Störung der Calciumhomöostase dennoch negative Folgen für die betroffenen Zellen hat, wurden die Zellen auf apoptotische Vorgänge hin überprüft. Es ist bekannt, dass gerade unphysiologisch hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen zu einer Apoptoseinduktion führen können. Eine Induktion des programmierten Zelltodes konnte beispielsweise für Pneumolysin (Braun et al. 2002) und Listeriolysin O (Guzman et al. 1996, Rogers et al. 1996) nachgewiesen werden. Tsai et al. (1999) zeigten, dass Gruppe A Streptokokken eine Apoptoseinduktion in menschlichen Endothelzellen auslösen können. Cywes-Bentley et al. (2005) vermuteten einen Zusammenhang zwischen intrazellulärer Calciumdysregulation und der Apoptose von Keratinozyten als Folge einer Streptokokkeninfektion.

Die von uns durchgeführten Experimente an humanen Nierenepithelzellen (IHKE) zeigten, dass apoptotische Zellen bei denjenigen SLO-Konzentrationen auftraten, bei denen im Calcium-Imaging eine Calciumüberladung der Zellen beobachtet worden war. Zellen, denen es gelang, ihre Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten, wurden nicht apoptotisch. Somit war für die Apoptoseinduktion die intrazelluläre Calciumdysregulation durch SLO ausschlaggebend. Die Grenzkonzentration, ab der eine Apoptose zu beobachten war, lag bei 20 ng/ml SLO. Ab einer Konzentration von 50 ng/ml SLO wurden die Fluoreszenzen etwas schwächer. Dies wurde auf eine Lyse der Zellen durch Membranzerstörung zurückgeführt, könnte aber auch darauf beruhen, dass bei höheren Toxinkonzentrationen keine Apoptose mehr auftritt, da die Zellen sofort nekrotisch werden.

Es ist in dieser Arbeit gelungen, die Wirkung von SLO elektrophysiologisch zu charakterisieren und Faktoren zu determinieren, die die Aktivität des Toxins stark beeinflussen. Klinisch bedeutsam ist dabei vor allem die Aktivitätssteigerung des Toxins durch Temperaturerhöhung und pH-Wert-

---

Absenkung. Der Einsatz von Substanzen, die die Porenbildung hemmen, wie Eosin Y, oder die offene Poren blockieren, wie Lanthan, könnte eventuell in Zukunft die Zahl letal verlaufender invasiver Streptokokkeninfektionen reduzieren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zellen die Porenbildung bei niedrigen SLO-Konzentrationen überleben. Wurde allerdings bei höheren Toxinkonzentrationen die Porenbildung und damit der Calciumeinstrom durch die Poren zu stark, führte diese Calciumüberladung zu einer Apoptoseinduktion in den betroffenen Zellen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Alouf JE, Palmer M (1999) Streptolysin O. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Academic Press, Harcourt Brace and Co., Chapter 25:457-475
- Alouf JE (2000) Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. Int J Med Microbiol 290:351-356
- Berjukow S, Doring F, Froschmayr M, Grabner M, Glossmann H, Hering S (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. Br J Pharmacol 118:748-754
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. Nature 395:645-648
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J (1985) Complement activation and attack on autologous cell membranes induced by streptolysin-O. Infect Immun 48:713-719
- Birringer J A (2004) Modulation von calciumabhängigen Kaliumkanälen und Calciumkanälen durch Phospholipide in Mäusefibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bittenbring J (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin O- induzierten Membranporen. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002) Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. J Clin Invest 109:19-27
- Brockmeier D (1991) HOEGIP-PC: An interactive program package for the evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data. User Manual. Internal Report, Hoechst AG

- Butler 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.
- Chen T-Y (2005) Structure and function of CLC channels. *Annu Rev Physiol* 67:809-839
- Cywes Bentley C, Hakansson A, Christianson J, Wessels MR (2005) Extracellular group A *Streptococcus* induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. *Cell Microbiol* 7:945-955
- Dietl P, Volkl H (1994) Maitotoxin activates a nonselective cation channel and stimulates  $Ca^{2+}$  entry in MDCK renal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 45:300-305
- Garcia ML, Hanner M, Kaczorowski GJ (1998) Scorpion toxins: tools for studying  $K^+$  channels. *Toxicon* 36:1641-1650
- Gatto C, Milanick MA (1993) Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am J Physiol* 264:C1577-1586
- Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* 156:1029-1038
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 20:119-126
- Hackett SP, Stevens DL (1992) Streptococcal toxic shock syndrome: synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. *J Infect Dis* 165:879-885
- Herold G (2006) Wichtige Infektionskrankheiten: Scharlach. *Innere Medizin*, Herausgeber Herold G, Kapitel 11:729-730

- Hille B (2001) Elementary properties of ions in solution. Ion channels of excitable membranes, third edition, Sinauer Associates, Inc., Chapter 10:309-346
- Hotze EM, Wilson-Kubalek EM, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK (2001) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* 276:8261-8268
- Iachovache I, Paumard P, Scheib H, Lesieur C, Sakai N, Matile S, Parker M, van der Goot F (2006) A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *Embo J* 25:457-466
- Kaefer V, Resch K (2005) Pathophysiologie der Entzündung. Herausgeber Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban und Fischer Verlag, Elsevier GmbH, 9. Auflage, Kapitel 16.1:364-369
- Kayser F H, Böttger E C, Zinkernagel R M (1998) Bakterien als Krankheitserreger: Streptococcus pyogenes. Medizinische Mikrobiologie, Thieme Verlag, 9. Auflage:227-233
- Koschinski A (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. Dissertation im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Lincz LF (1998) Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76:1-19
- Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H, Prevost G (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of Staphylococcus aureus. *FEBS Lett.* 522:54-60
- Moore CL (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun* 42:298-305

- Ohno-Iwashita Y, Iwamoto M, Ando S, Iwashita S (1992) Effect of lipidic factors on membrane cholesterol topology-mode of binding of theta-toxin to cholesterol in liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1109:81-90
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565
- Palasz A, Czekaj P (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochim Pol* 47:1107-1114
- Palmer M (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39:1681-1689
- Pinkney M, Beachey E, Kehoe M (1989) The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect Immun* 57:2553-2558
- Repp H, Koschinski A, Decker K, Dreyer F (1998) Activation of a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:509-517
- Repp H, Pamukci Z, Koschinski A, Domann E, Darji A, Birringer J, Brockmeier D, Chakraborty T, Dreyer F (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms  $Ca^{2+}$ -permeable pores leading to intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations. *Cell Microbiol* 4:483-491
- Reinhardt PH, Chung, S. and Levitan, I.B. (1989) A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron* 2:1031-1041
- Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER (1996) *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol* 156:679-684
- Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK, Parker MW (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89:685-692
- Ruiz N, Wang B, Pentland A, Caparon M (1998) Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A streptococci. *Mol Microbiol* 27:337-346

- Schomacker K, Mocker D, Munze R, Beyer GJ (1988) Stabilities of lanthanide-protein complexes. *Int J Rad Appl Instrum [A]* 39:261-264
- Schramm (2004) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Beeinflussung von durch Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae* gebildeten Poren. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Sekiya K, Danbara H, Yase K, Futaesaku Y (1996) Electron microscopic evaluation of a two-step theory of pore formation by streptolysin O. *J Bacteriol* 178:6998-7002
- Todd Ha (1941) Purification and properties of a haemolysin produced by group A haemolytic streptococci (streptolysin O). *Biochem. J.* 35:1124-1139
- Tsai PJ, Lin YS, Kuo CF, Lei HY, Wu JJ (1999) Group A *Streptococcus* induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect Immun* 67:4334-4339
- Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Ce G (2000) Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces  $Ca^{2+}$  oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 405:694-697
- Walev I, Palmer M, Valeva A, Weller U, Bhakdi S (1995) Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers. *Infect Immun* 63:1188-1194
- Weibull W (1951) A statistical distribution of wide applicability. *J Applied Mechanics* 73:293-297
- Weiss KA, Laverdiere M (1997) Group A *Streptococcus* invasive infections: a review. *Can J Surg* 40:18-25
- Weller U, Muller L, Messner M, Palmer M, Valeva A, Tranum-Jensen J, Agrawal P, Biermann C, Dobereiner A, Kehoe MA, Bhakdi S (1996) Expression of active streptolysin O in *Escherichia coli* as a maltose-binding-protein-streptolysin-O fusion protein. The N-terminal 70 amino acids are not required for hemolytic activity. *Eur J Biochem* 236:34-39

Zhang C, Xiong W, Zheng H, Wang L, Lu B, Zhou Z (2004) Calcium- and dynamin-independent endocytosis in dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 42:225-236

## 6. Zusammenfassung

Streptolysin O (SLO) ist der Prototyp der großen Familie der cholesterolabhängigen Toxine und zählt zu den wichtigsten Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken. Diese ubiquitär vorkommenden Keime sind Verursacher häufiger Haut-, Weichteil-, Knochen- und Organerkrankungen. Trotz antibiotischer Therapie verlaufen generalisierte Infektionen auch heute noch zu einem hohen Prozentsatz letal.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit die Porenbildung durch sublytische SLO-Konzentrationen an kernhaltigen Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik beobachtet werden. Die Porenbildung durch SLO war transients Natur und die Poren wechselten zwischen geöffneten und geschlossenen Zuständen. Wir konnten eine elementare Grundpore mit einer Leitfähigkeit von 425 pS identifizieren und vermuten, dass Cluster von SLO-Poren in der Zellmembran zu synchronen Porenöffnungen und -schlüssen führen. Die Art der Porenschlüsse, die sich in langsame und schnelle Schlüsse unterteilen lassen, war abhängig von dem Gehalt an intra- und extrazellulärem Calcium.

Zudem war die porenbildende und hämolytische Aktivität stark abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösungen. Die Fiebersenkung und der Ausgleich einer metabolischen Azidose scheinen daher effektive Maßnahmen in der Therapie generalisierter Streptokokkeninfekte zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem Substanzen beschrieben, die in der Lage sind, die Zellzerstörung durch SLO zu reduzieren. Der Einsatz von Lanthan und Eosin Y *in vitro* führte zu einer Blockade der Porenströme bzw. einer Hemmung der Porenbildung und konnte die Zellyse verhindern.

In verschiedenen Versuchsansätzen konnte weiterhin gezeigt werden, dass SLO-Poren für Calciumionen permeabel sind. Bei niedrigen SLO-Konzentrationen führte der Calciumeinstrom in die Zellen zu nichtperiodischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes, die von den Zellen toleriert wurden. In höheren Konzentrationen verloren die untersuchten Zellen die Kontrolle über ihre Calciumhomöostase. Die resultierende Calciumüberladung führte zur Apoptose der betroffenen Zellen.

## 6. Summary

Streptolysin O (SLO) is the prototype of the large family of cholesterol-dependent toxins and one of the major virulence factors of group A Streptococci. These bacteria cause frequent infections of the skin, soft parts, bones and organs. Despite antibiotic therapy generalised infections still remain lethal to a high percentage.

For the first time, we observed pore formation by sublytic concentrations of SLO in mammalian cells using the patch-clamp technique. Pore formation by SLO was transient, and the pores switched between open and closed states. An elementary pore with a conductance of 425 pS was identified. It is presumed that pore-clusters in the membrane of the cell lead to synchronized pore openings and closures. The kinetics of pore closure, consisting in slow and fast closings, were dependent on the intra- and extracellular calcium level.

The pore-forming and haemolytic activity of SLO was highly dependent on the temperature as well as on the pH-value of the surrounding. It is presumed, that lowering of the temperature in febrile patients and creation of a physiologic acid-base-balance in patients with metabolic acidosis can contribute to the recovery from severe streptococcal infections.

In the present work, we describe substances that are able to prevent cell-damage by SLO. The application of Lanthanum and Eosin Y in vitro led to a blockade of the pore current and to the inhibition of pore-formation, respectively, and avoided cell-lysis.

SLO-formed pores were permeable for calcium ions, as could be shown in different experimental set-ups. With low toxin concentrations, the flux of calcium ions into the cell led to non-periodic  $\text{Ca}^{2+}$ -spikes, which was tolerated by the cells. With higher SLO-concentrations, the investigated cells lost control about their calcium-homeostasis. The resulting calcium-overload led to the induction of apoptosis in the observed cells.

## Danksagung

Vor allem danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Florian Dreyer, dass ich die vorliegende Arbeit in seinem Labor durchführen konnte. Mit großer Geduld hat er die vorliegende Arbeit durchgesehen und mir viele wertvolle Tipps gegeben. Er war trotz seiner vielen Verpflichtungen stets ein hilfsbereiter Ansprechpartner.

Ich danke Dr. Andreas Koschinski, der mir mit sehr viel Aufopferung die Patch-Clamp Technik beigebracht hat. Er war jederzeit bereit, alles stehen und liegen zu lassen, um mir bei der Lösung meiner Probleme zu helfen. Besonders danke ich ihm für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Fluoreszenzversuche.

Dr. Holger Repp danke ich für die fachliche Unterstützung insbesondere bei der Versuchsplanung und der Evaluation der Ergebnisse.

Auch meiner Mitdoktorandin, Anke Bennert, danke ich für ihre Hilfe bei fachlichen Fragestellungen. Sie ist mir auch außerhalb des Labors zu einer guten Freundin geworden.

Für die intensive Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, insbesondere der Porenstromamplituden und der Porenkinetiken, danke ich Prof. Dr. Dierk Brockmeier.

Bei unserer MTA, Christiane Zibuschka, möchte ich mich für die Unterstützung in der Zellkultur und beim Ansetzen von Medien und anderen Lösungen bedanken.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern aus dem 7. Stock des RBI für Pharmakologie. In der netten, freundschaftlichen Atmosphäre hat mir meine Arbeit sehr viel Spaß gemacht.

Weiterhin danke ich Dr. Ivan Walev (AG Prof. Dr. Bhakdi, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Universität Mainz) für die Bereitstellung des in dieser Arbeit eingesetzten Streptolysin O.

Meinem Freund, Karl Hubenschmid, danke ich für seine Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung der Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Jens und Sabine Jacobus, die mir das Medizinstudium ermöglichten und die immer großes Interesse an der vorliegenden Arbeit gezeigt haben.

## Lebenslauf

**NAME** Brit Kristin Jacobus  
**GEBURTSDATUM** 15.11.1977  
**GEBURTSORT** Düsseldorf

### SCHULBILDUNG

1984-1987 Grundschule am Koggenweg, Lübeck  
1987-1988 Grundschule Schilksee, Kiel  
1988-1997 Ernst-Barlach-Gymnasium, Kiel  
Abitur im Juni 1997 (Note 2,0)

### AUSLANDSAUFENTHALT

1997-1998 Einjähriger Au-pair-Aufenthalt und Spanischstudium an der „Universidad de Complutense“, Madrid, Spanien

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1998-2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen  
09/2000 Physikum (Note 2,0)  
08/2001 1. Staatsexamen (Note 2,0)  
02-08/2002 Auslandssemester (Erasmus) an der „University of Tromsø“, Norwegen  
09/2003 2. Staatsexamen (Note 1,6)  
2003-2004 Praktisches Jahr  
11/2004 3. Staatsexamen (Note 2,0)

### FAMULATUREN

03/2001 Chirurgie im Städtischen Krankenhaus, Kiel  
09/2001 Anästhesie im „Regionssykehuset“, Tromsø, Norwegen  
08/2002 Pädiatrie im „Regionssykehuset“, Tromsø, Norwegen

09/2002 Innere Medizin in der Facharztpraxis  
Dr. Scheunemann, Kiel

### **PRAKTISCHES JAHR**

1.Tertial 16 Wochen Innere Medizin am Universitätsklinikum  
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

2.Tertial 8 Wochen Allgemeinchirurgie am „Royal Brisbane  
Hospital of QLD“, Brisbane, Australien und  
8 Wochen Unfallchirurgie am Universitätsklinikum  
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

3.Tertial 16 Wochen Pädiatrie am “Kilimanjaro Christian  
Medical Center” in Moshi, Tanzania

### **PROMOTION**

Thema der Arbeit: „Elektrophysiologische Charakterisierung und  
pharmakologische sowie pathophysiologische Beeinflussung der durch  
Streptolysin O gebildeten Poren.“

01/2005 Beginn der experimentellen Arbeit am Rudolf-  
Buchheim-Institut für Pharmakologie der JLU-Gießen  
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dreyer

03/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin (BATIIa/2)

04/2006 Vorstellung von Forschungsergebnissen auf der  
Frühjahrstagung der DGPT, Mainz. Titel: „Pore  
formation in mammalian cells by sublytic  
concentrations of Streptolysin O of streptococcus  
pyogenes.“

### **STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN**

1999-2000 Aushilfstätigkeit im Mobilen Pflegedienst der  
Evangelischen Pflegezentrale Gießen

2002-2005 Aushilfstätigkeit in der internistischen Notaufnahme  
Voit A des Uniklinikums Gießen

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 auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 30.05.2006

(Brit Jacobus)