

Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin O-induzierten Membranporen

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

vorgelegt von
Jörg Thomas Bittenbring

aus Groß-Gerau

Gießen 2005

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. Florian Dreyer

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann

Tag der Disputation: 08.06.06

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Medizinische Bedeutung von <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2 Die Pathogenese der <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion	3
1.3 Der intrazelluläre Lebenszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.4 Cholesterin-abhängige Zytolysine: Struktur und Mechanismen	6
1.5 Listeriolysin O von <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.6 Aufgabenstellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Zelllinien	13
2.2 pH-Wert Messungen	14
2.3 Bakterien	14
2.4 Toxine	16
2.5 Elektrophysiologische Messungen	16
2.6 Substanzliste	22
2.7 Hämolyse-Titer-Test	30
2.8 Ca ²⁺ -Imaging	31
2.9 Statistische Auswertungen	32
3 Ergebnisse	33
3.1 LLO-induzierte Porenbildung	33
3.2 Aktivierbarkeit von LLO durch Dithiothreitol (DTT) und Senkung des pH-Wertes	34
3.3 Abhängigkeit der Porenschlüsse der LLO-Poren von der intrazellulären ATP-Konzentration, der Ca ²⁺ -Konzentration und der zytoskelettalen Funktion	35
3.4 Screening auf blockierende Substanzen der LLO-Porenströme	42
3.5 Blockade der LLO-Porenströme durch Lanthanoide	44
3.6 Blockade der LLO-Porenströme durch weitere Ionen	57
3.7 Blockade der Porenbildung durch Eosin Y	59

3.8 LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen	61
4 Diskussion	66
4.1 Aktivierbarkeit des LLO	66
4.2 Die Porenschlüsse	67
4.3 Pharmakologische Blockade der LLO-induzierten Poren	69
4.4 LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen	72
5 Zusammenfassung	74
6 Summary	75
7 Literaturverzeichnis	76
8 Lebenslauf	85
Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 Medizinische Bedeutung von *Listeria monocytogenes*

Das Bakterium *Listeria monocytogenes* wurde von Murray und Swann (1926) erstmalig als Verursacher einer Sepsis bei Nagern isoliert und beschrieben (Vazquez-Boland et al. 2001). *L. monocytogenes* ist ein fakultativ anaerobes, grampositives, nicht sporenbildendes, nicht kapselbildendes Stäbchen von 0,4 - 1,5 μm Länge, das ubiquitär vorkommt und sich durch intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit auszeichnet. *L. monocytogenes* kann bei gesunden Menschen eine Gastroenteritis auslösen. Insbesondere jedoch in Situationen, in denen eine physiologische Immuntoleranz oder eine pathologische Immundefizienz besteht, werden schwere Infektionen beobachtet. In der Fetalperiode verursachen Listerien die tödliche Granulomatosis infantiseptica, bei der nach septischer Streuung des Erregers in allen Organen Granulome auftreten (Erdmann & Potel 1953). Bei postpartaler Infektion können Meningitis oder Pneumonie auftreten. Bei Erwachsenen mit Immundefekten verläuft die Infektion als Meningitis, Endokarditis oder Sepsis. Listerien sind bei besonderen Risikopatienten, wie Karzinompatienten in fortgeschrittenen Stadien, die häufigste Ursache einer Meningitis (Übersicht bei Schuchat et al. 1997). Bei den ambulant erworbenen Meningitiden stellen die Listerien mit 10 % die vierthäufigste Ätiologie bei einer Letalität von 20 %, trotz effektiver Antibiotikatherapie.

1.2 Die Pathogenese der *Listeria monocytogenes* Infektion

Bei Nahrungsmittelkontamination genügt für die Infektion die orale Aufnahme von ca. 10^2 - 10^6 Bakterien, je nach Immunstatus des Wirts und Pathogenität des Listerienstammes (Vazquez-Boland et al. 2001). Vor allem Rohmilchprodukte können stark kontaminiert sein, insbesondere bei Lagertemperaturen um 4 - 7°C, bei denen *L. monocytogenes* noch vermehrungsfähig ist. Einmal aufgenommen, können sich die Listerien über den Darm weiter im Körper ausbreiten. Einen entscheidenden Beitrag zur Elimination der Listerien in dieser Phase leisten neutrophile Granulozyten (Conlan & North 1994). Im Weiteren wandern IFN- γ (Interferon- γ) aktivierte Monozyten und schließlich CD-8 positive T-Lymphozyten in die Leber beziehungsweise Milz ein (Gregory & Liu 2000) und töten

L. monocytogenes ab. Ein kleiner Teil reproduziert sich jedoch intrazellulär in Makrophagen, vor allem aber in Hepatozyten weiter (Conlan & North 1991). Bei Versagen der Immunantwort des Wirts in diesem frühen Stadium der Infektion kann sich *L. monocytogenes* innerhalb der Zellen vermehren und hämatogen in das Zentralnervensystem und in die Plazenta, sofern vorhanden, gestreut werden.

1.3 Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes besitzt mehrere Pathogenitätsfaktoren, die dem Erreger ermöglichen, sich in verschiedenen Wirtszellen intrazellulär zu replizieren. Diese Faktoren sind im Weiteren anhand des Lebenszyklus aufgeführt und in ihrer Funktion im Ablauf der Infektion in Abb. 1 dargestellt. Listerien produzieren und sezernieren ein porenbildendes Toxin, Listeriolysin O (LLO). Eine besondere Rolle wird der Permeabilität der durch LLO induzierten Poren für Ca^{2+} -Ionen zugeschrieben, da Dramsi et al. (2003) zeigen konnten, dass Ca^{2+} -freies Medium die Invasivität reduziert. Die Adhäsion an die Wirtszelle erfolgt über spezielle Oberflächenproteine. Dies geschieht bei nicht-professionell phagozytierenden Zellen, also Zellen die üblicherweise eine geringe phagozytierende Aktivität aufweisen, wie zum Beispiel Enterozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten mittels der Listerien-Oberflächenproteine Internalin A und B (InA und InB). Diese binden über Leucin-reiche Regionen an E-Cadherin (Cossart & Lecuit 1998). Bei professionell phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen oder Mikroglia, werden andere Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen verwendet, wie Complement-Rezeptor 3 oder C1q (Alvarez-Dominquez et al. 1992). Nach der Phagozytose durch die Wirtszellen wird das Phagosom mit den darin enthaltenen Listerien durch LLO und die Phospholipase A (PlcA) lysiert. Dieser Prozess funktioniert bei niedrigem pH effektiver (Beauregard et al. 1997). Anschließend gelangen die Listerien in das Zytoplasma der Wirtszelle. Dort können sie mittels des ActA-Proteins Aktin polymerisieren und sich dadurch mit 0,12 -1,46 $\mu\text{m/s}$ fortbewegen (Dabiri et al. 1990, Theriot et al. 1992). Bei Kontakt mit der Zellmembran stülpt sich diese mehrere μm weit aus. Diese Ausstülpungen werden von manchen Autoren Listeriopoden genannt (Gedde et al. 2000). Geschieht dies im Kontakt mit einer anderen Wirtszelle, führt dies zur Aufnahme dieser doppelwandigen Vakuole in die zweite Zelle. Die Listerien sind auch in der Lage,

diese Vakuole von innen mittels der Phospholipase B (PlcB) und vermutlich auch LLO zu lysieren und ins Zytoplasma der nächsten Wirtszelle zu gelangen, um den Infektionszyklus fortzusetzen (Cossart & Lecuit 1998). Nach der Aufnahme in die 1. Wirtszelle vermehren sich die Listerien ausschließlich intrazellulär. Aus diesem Grund sind Antikörper nicht protektiv gegen Listerieninfektionen und die erfolgreiche Immunantwort auf Listerien ist durch CD-8 positive T-Lymphozyten vermittelt (Kaufmann 1993).

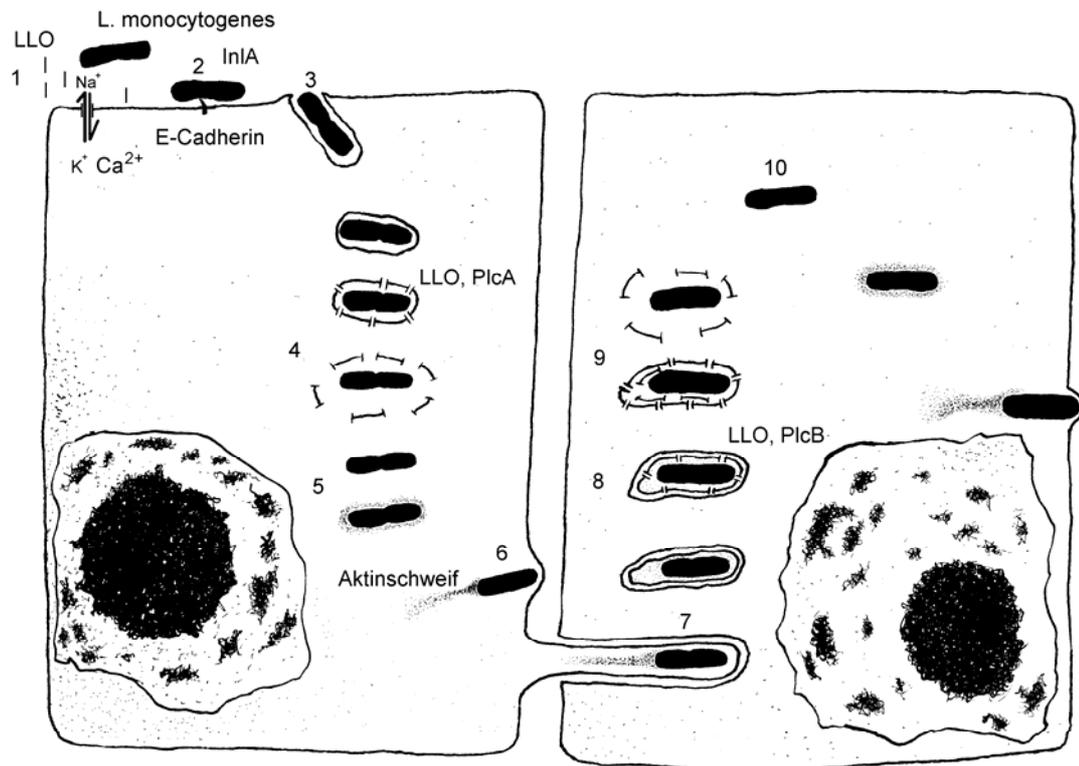


Abb. 1: Der Infektionszyklus des *Listeria monocytogenes* Stammes EGD (1) Sekretion von LLO und Bildung ionenpermeabler Poren, (2) Adhäsion an E-Cadherin der Wirtszellmembran mittels Internalin A (InA), (3) Internalisation in das Phagosom, (4) Lyse des Phagosoms durch LLO und Phospholipase A (PlcA) und dadurch freier Zugang zum Zytoplasma, (5) Bindung des Aktins durch Aktin bindendes Protein A (ActA), (6) Polymerisation und Fortbewegung durch den Aktinschweif, (7) Bildung von Pseudopodien/Listeriopoden, Aufnahme in der doppelwandigen Vakuole durch eine Nachbarzelle, (8) Lyse des inneren Blattes der Doppelmembran durch LLO und Phospholipase B (PlcB), (9) Lyse des äußeren Blattes durch LLO und PlcB, (10) Im Zytoplasma der zweiten Wirtszelle freie *L. monocytogenes* und Beginn des nächsten Zyklus. (Verändert nach Domann, 1997).

Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* ist ein von Harvey und Faber (1941) erstbeschriebenes Hämolyysin, das später als LLO bezeichnet wurde. Geoffroy et al. (1987) zeigten dann, dass dieses Toxin zur Gruppe der Thiolaktivierbaren, Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDTX) gehört. Die Toxine

dieser Gruppe gehören in die übergeordnete Gruppe der β -barrel porenbildenden Toxine, zu denen auch Aerolysin von *Aeromonas hydrophilia* und Staphylokokken α -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* sowie die AB-Toxine, die aus einer membranbindenden B Komponente und einer enzymatisch aktiven A-Komponente bestehen, gehören (Heuck et al. 2001, Gilbert 2002).

1.4 Cholesterol-abhängige Zytolysine: Struktur und Mechanismen

Die Gruppe der Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDTX) besteht zur Zeit aus 23 Mitgliedern und war in den vergangenen Jahren Gegenstand mehrerer Übersichtsartikel (Alouf 2000, Billington et al. 2000, Palmer 2001, Tweten et al. 2001, Gilbert 2002). Gemeinsam ist den meisten CDTX, dass sie eine konservierte Sequenz von 11 Aminosäuren im carboxyterminalen Abschnitt besitzen, die als Undekapeptid (Abb. 2) oder Tryptophan-reiches Motiv bezeichnet wird (Alouf 2000). Die Sequenz lautet ECTGLAWEWWR. Einige Varianten mit einem Austausch einer einzelnen Aminosäure kommen bei Intermedilysin O oder Pyolysin vor. Die Funktion dieser Region ist bis jetzt nicht geklärt. Die Tryptophan-Reste scheinen jedoch essentiell für die hämolytische Aktivität zu sein (Alouf 2000, Billington et al. 2000). Auch Thiol-Aktivierung ist nicht bei allen Mitgliedern nachzuweisen. Pyolysin und Intermedilysin O, die kein Cystein im Undekapeptid haben, zeigen diese Eigenschaft nicht, weswegen im Weiteren nur noch von CDTX gesprochen wird (Billington et al. 2000). Für Perfringolysin O konnte bereits die Kristallstruktur dargestellt werden (Abb. 2, entnommen aus Rossjohn et al. 1997). Es kann angenommen werden, dass die anderen CDTX eine ähnliche Struktur besitzen, da 40 – 70 % Sequenzhomologie besteht (Tweten et al. 2001).

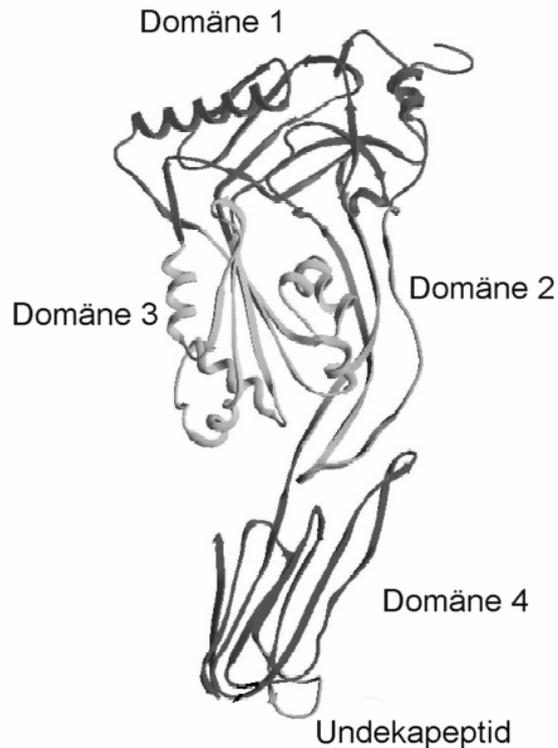


Abb. 2: Kristallstruktur des *Perfringolysin O* nach Rossjohn et al. (1997)

Das Monomer von PFO als Beispiel der Cholesterol-abhängige Zytolysine hat 4 Domänen. In Domäne 4 befindet sich das charakteristische Undekapeptid. Perfringolysin O ist ein langgestrecktes Molekül. Domäne 1 und 4 sind bei der Oligomerisation beteiligt. Domäne 3 und 4 sind bei der Membraninsertion beteiligt (Übersicht bei Billington et al. 2000). In Domäne 4 soll sich auch eine Cholesterol-bindende Domäne in der Nähe des Undekapeptids befinden.

Alle CDTX binden als monomere Proteine an die Membran und oligomerisieren an der Membran. Dies konnte mittels monoklonaler Antikörper von Hugo et al. (1985) für Streptolysin O gezeigt werden. Mittels Biotin-markiertem Perfringolysin konnte gezeigt werden, dass Cholesterolreiche Mikrodomänen oder Lipid-Rafts für die Bindung entscheidend sind (Waheed et al. 2001). Dies wurde auch schon für Shigatoxin von *Shigella sp.* und Cholera toxin von *Vibrio cholerae* sowie Aerolysin beschrieben (Übersicht bei Brown & London 1998). Im gebundenen Zustand oligomerisieren die Monomere zu ring- und bogenförmigen Strukturen. Der Oligomerisierungsschritt ist irreversibel (Palmer 2001). Die elektronenmikroskopisch dargestellten Proteinkomplexe hatten einen Durchmesser von bis zu 25 nm und bestehen aus 30 - 50 oligomerisierten Toxinmolekülen (Sekiya et al. 1996). Eine Oligomerisierung in Lösung, wie sie bei den heptameren Toxinen Aerolysin und Staphylokokken α -Hämolysin beschrieben ist, kann bei der hohen Zahl von bis zu 50 Molekülen aus energetischen Gründen ausgeschlossen werden (Billington et

al. 2000). Die Anreicherung von Monomeren an Lipid-Mikrodomänen würde den Oligomerisierungsschritt einer solchen Anzahl von Proteinen erleichtern (Heuck et al. 2001). Der nächste Schritt der Porenbildung wird kontrovers diskutiert. Es ist nicht klar, welche von den von Bhakdi et al. (1985) erstmalig beobachteten elektronenmikroskopisch beobachtbaren Strukturen (Abb. 3) den Offen-Zustand der Pore darstellt.

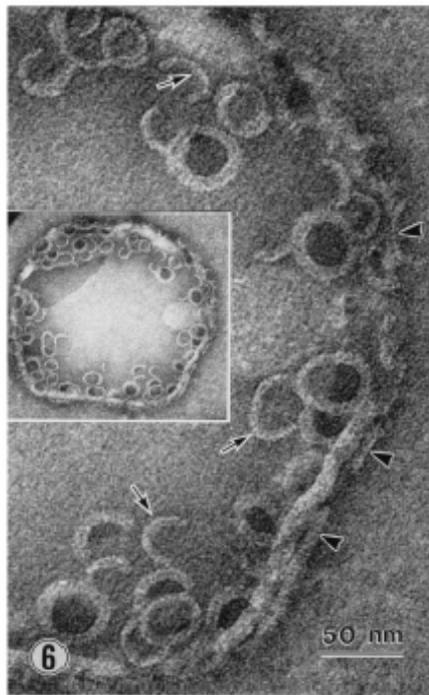


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Streptolysin O Poren in Liposomen
Die Pfeile zeigen auf bogenförmige und runde Proteinkomplexe von Streptolysin O in der Membran nach Inkubation bei Raumtemperatur. Entnommen aus Sekiya et al. (1996)

Tweten et al. (2001) und Heuck et al. (2001) untersuchten Perfringolysin und sehen die Bildung der bogenförmigen Komplexe als Vorstufe zu einem Prä-Poren Komplex an und vermuten, dass die Porenbildung schlagartig im ringförmigen Zustand auftritt (Heuck et al. 2003). Dies würde voraussetzen, dass im Moment der Porenbildung ca.1600 Cholesterol- und Phospholipidmoleküle entfernt werden müssten, wenn man annimmt, dass eine Pore einen Durchmesser von 25 nm hat (Heuck et al. 2001). Palmer et al. (1995,1998) untersuchten Streptolysin O und vermuten, dass bereits bei wenigen oligomerisierten Monomeren die Membran von den Proteinen durchdrungen wird und alle ring- und bogenförmigen Strukturen eine wachsende Pore darstellen. Dieses Modell benötigt weniger Energie, da nicht eine derartig große Pore auf einmal entstehen muss. Sie benutzten dazu eine

Mutante (T250C), die nicht oligomerisieren kann und inkubierten diese mit dem Wildtyp. Hierdurch konnten kleinere Poren und auch mit geringerer Permeabilität für hochmolekulare Dextrane nachgewiesen werden. Gilbert (2002) postuliert, dass die Oligomerisierung stoppt, sobald sich die Pore gebildet hat, und dadurch die Vielfalt der beobachteten Strukturen entsteht. Die Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls sind in Abb. 4 am Beispiel des Perfringolysin O nach Heuck et al. (2001) dargestellt. Dieses Modell beruht auf den Versuchen mittels NBD-markierten CDTX (N,N'-dimethyl-N'-(iodoacetyl)-N-(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl)ethylendiamin), welches in hydrophoben Regionen stärker fluoresziert und dadurch anzeigt, welche Aminosäure sich in der Membran und welche in dem wasserzugewandten Teil der Pore befindet. Bei diesem Modell vermittelt Domäne 4 die Membranbindung, da nachgewiesen werden konnte, dass sich die Autofluoreszenz des dort vorhandenen Tryptophanrestes ändert. Daraufhin finden mehrere Konformationsänderungen im Molekül statt. Zuerst wird die intramolekulare Wechselwirkung zwischen Domäne 2 und Domäne 3 schwächer, worauf Domäne 3 sich, nach Bindung an die Membran, streckt (Abb. 4). Dies geschieht durch die Konformationsänderung zweier dreifach α -Helices zu zwei amphipathischen β -Haarnadeln. Bei dieser Streckung wird die Membran penetriert und die β -Haarnadeln bleiben in der Membran stecken (Shepard et al. 1998, Shatursky et al. 1999).

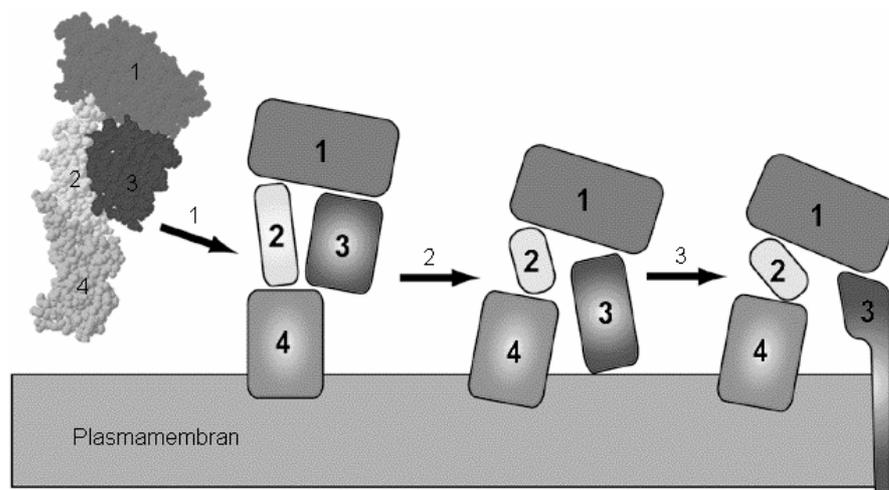


Abb. 4: Mechanismus der Membraninsertion am Beispiel des Perfringolysins nach Heuck et al. (2001). Erläuterungen siehe Text.

Bei diesem Modell besteht das Problem, dass trotz der großen Homologie der CDTX diese transmembranären Regionen von Perfringolysin O nicht konserviert sind. Palmer et al. (1996, 1998), die Streptolysin O mittels Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acrylodan untersucht haben, halten diesem Modell entgegen, dass die transmembranäre Region aus zwei amphipathischen α -Helices besteht. Es wird ebenfalls angenommen, dass CDTX am Beispiel des Streptolysin O ähnliche Funktionen wie die Typ-3 Sekretionsapparate bei den gramnegativen Bakterien übernehmen könnten und bakterielle Enzyme beziehungsweise Pathogenitätsfaktoren in das Zytoplasma der Wirtszelle bringen (Madden et al. 2001).

Es wird seit kurzem kontrovers diskutiert, ob Cholesterol tatsächlich die Bindung an die Zellmembran vermittelt. Jacobs et al. (1999) zeigten mittels Immunblotting, dass LLO an Cholesterol-freie Liposomen bindet. Kürzlich konnte auch für Streptolysin O, Intermedilysin O und Perfringolysin O mittels toxinspezifischen Antikörpern und Durchflusszytometrie an Erythrozyten nachgewiesen werden, dass Cholesterol nicht der Rezeptor für die Membranbindung ist. Bisher konnte die direkte Bindung von CDTX an Cholesterol nicht gezeigt werden und es ist nicht auszuschließen, dass der inhibierende Effekt freien Cholesterols auf die CDTX durch mizellare Bindung zustande kommt (Heuck et al. 2001). Auf der anderen Seite scheint Cholesterol entscheidend für die Insertion der transmembranären Anteile der Domäne 3 zu sein, wie von Giddings et al. (2003) mittels Fluoreszenz-Spektroskopie von NBD-markierten CDTX gezeigt werden konnte. Jacobs et al. (1999) konnten dem entgegen zeigen, dass LLO bei Vorinkubation mit Cholesterol zwar an die Membran bindet, aber als Monomer dort verbleibt, also keine Pore bilden kann. Daraus wurde gefolgert, dass Cholesterol an der Oligomerisierung beteiligt ist.

1.5 Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes*

LLO besteht aus 529 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 58,7 kDa. Es hat eine Signalsequenz und wird von den Listerien sezerniert. Es nimmt unter den CDTX eine Sonderstellung ein, da es das einzige CDTX eines intrazellulären Bakteriums ist. LLO-defiziente Mutanten sind avirulent in der Maus und die Virulenz des Erregers kann durch Rekombination mit dem hly-Genlocus, der für

LLO codiert, wieder hergestellt werden (Cossart et al. 1989). Gaillard et al. (1987) zeigten in Caco-2 Zellen, dass LLO-defiziente Mutanten im Phagosom der Wirtszelle verbleiben.

Zur weiteren Bestätigung der Bedeutung des LLO trugen die Experimente von Bielecki et al. (1990) bei, die zeigen konnten, dass *Bacillus subtilis*, rekombiniert mit dem für das LLO codierenden *hly*-Genlocus, intrazellulär überlebens- und replikationsfähig wurde. Repp et al. (2002) konnten erstmals elektrophysiologisch zeigen, dass LLO tatsächlich Poren in der Zellmembran erzeugt. Diese Poren zeigten eine geringe Ionenselektivität und hatten definierte Porenströme. Diese reichten von kleinen Poren von 45 pA bei -50 mV Membranpotential über mittlere von ca. 85 pA bis zu großen Porenströmen von 125 pA. Dies entspricht Leitfähigkeiten von 1150 pS für die kleinen Poren über 2074 pS für die mittleren bis 2950 pS für die großen Poren. Die Häufigkeit der Bildung großer Poren stieg mit höheren LLO-Konzentrationen. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass in der Membran befindliche Poren sich auch wieder schließen konnten.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch LLO Ca^{2+} -Oszillationen in HEK-293 Zellen ausgelöst werden. Die Ca^{2+} -Oszillationen könnten ein entscheidender Mechanismus der LLO-vermittelten Pathogenität als Voraussetzung für Listerieninfektionen sein, denn Dramsi et al. (2003) konnten diesbezüglich nachweisen, dass Ca^{2+} -freies Medium als auch Bindung des extrazellulären Ca^{2+} durch Chelatoren, sowie Ca^{2+} -Kanalblocker wie Nickel (Ni^{2+}) und Lanthan (La^{3+}) die Invasionsrate von *L. monocytogenes* in Hep2 Zellen reduzieren. Ca^{2+} als Second Messenger reguliert viele zelluläre Reaktionen wie Muskelkontraktion, Sekretion, Metabolismus, Genexpression sowie Phagozytose und programmierten Zelltod (Übersicht bei Berridge et al. 1998). Es wurde über viele weitere Phänomene berichtet, die nach LLO Exposition auftreten. So erhöht LLO die Zytokinexpression (Nishibori et al. 1996), die Expression von Adhäsionsmolekülen über die Aktivierung der I κ B Kinase (Kayal et al. 1999, 2002), aktiviert MAP-Kinasen (Tang et al. 1996) und induziert Apoptose über noch unbekannte Mechanismen in dendritischen Zellen (Guzman et al. 1996, Gao & Kwai 2000). Es ist denkbar, dass viele dieser Effekte durch LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen verursacht sind.

1.6 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe der Patch-Clamp Methode die Eigenschaften des LLO weiter charakterisiert werden. Dies sind die Aktivierbarkeit des LLO durch Thiole und durch Senkung des pH-Wertes. Des Weiteren sollte untersucht werden auf welchen Mechanismen die Porenschlüsse basieren und es sollte versucht werden, diese pharmakologisch zu charakterisieren. Es sollte geklärt werden, ob LLO in der Lage ist von der intrazellulären Seite der Zellmembran her Poren zu induzieren. Dies ist wichtig, da bei der Infektion die Zellmembran von beiden Seiten von den Listerien überwunden werden müssen. Ein weiteres Ziel war es, Substanzen zu finden, welche die LLO-induzierte Porenbildung selektiv blockieren, um eventuell die Invasion der Listerien in vitro und in vivo zu hemmen. Mit Methoden des Ca^{2+} -Imaging sollen die Mechanismen der Ca^{2+} -Oszillationen, vor allem die Beteiligung intrazellulärer Speicher an der Entstehung der LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen genauer aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

HEK-293 (human embryonic kidney cells), erhalten von der European Tissue Type Collection, wurden in DMEM (Dulbecco`s modified eagle Medium) mit Hams F12 (1:1 v/v), 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 2 mM Glutamin kultiviert. Die HEK-293 Zellen wurden mittels der Lipofektin-Transfektionsmethode (GIBCOBRL® Life Technologies GmbH, Karlsruhe) mit dem Gen für den humanen Kaliumkanal kleiner Leitfähigkeit hSK4 stabil transfiziert und anschließend kloniert. Diese HEK-293 Zellen wurden zusätzlich in 64,8 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin sowie 400 µg/ml Geneticin (Sigma-Aldrich, Steinheim) kultiviert. Geneticin wurde beigefügt, um den Selektionsdruck der transfizierten Zelllinie zu erhalten. Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO₂-Inkubator 6220, Fa. Heraeus, Hanau) bei 37° C und 95 % Luftfeuchte in einer 6 % CO₂ und 94 % Luft Atmosphäre kultiviert. Alle zwei Tage, wenn der Boden der Petrischalen (95 mm, Fa. Greiner, Nürtingen) dicht bewachsen war, wurden die Zellen umgesetzt. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS (phosphat buffered saline) gespült (120 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 10,1 mM NaH₂PO₄ 2,2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml trypsinhaltiger (0,05 % w/v) PBS-Lösung behandelt, bis eine sichtbare Ablösung der Zellen stattfand. Die Zellen wurden dann mit einer 10 ml Glaspipette in Kulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Menge auf neue Petrischalen überführt. Die übliche Verdünnung betrug 1:10 bis 1:3.

2.2 pH-Wert Messungen

Die pH-Werte wurden mittels des pH-Meters 761 (Calimatic, Fa. Knick, Berlin) gemessen, beziehungsweise orientierend mit pH-Teststreifen (Neutralit pH 5 - 10, Fa. Merck, Darmstadt).

2.3 Bakterien

2.3.1 Übernachtkultur

Für die Experimente wurde der *L. monocytogenes* Stamm EGD in BHI (brain heart infusion) Medium kultiviert. Die Dauerkultur wurde auf einer BHI-Agarplatte im

Kühlschank aufbewahrt. Als Vorbereitung für elektrophysiologische Experimente mussten die Bakterien angezüchtet werden.

Dazu wurde unter einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus, Hanau) 10 ml BHI-Medium in einen 100 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt. Mit einer Öse wurden ein bis zwei Bakterienkolonien von der Agarplatte abgenommen und in das vorgelegte Medium überführt. Der Erlenmeyerkolben wurde dann in den Schüttelinkubator (Aerotron, INFORS AG, Bottmingen) gestellt und 16 Stunden bei 37° C und 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Diese Übernachtskultur stellt die Basis für den Bakterienkultur-Überstand und die Bakteriensuspension dar, die im Folgenden beschrieben sind.

2.3.2 Herstellung des 2 h-Kulturüberstands

L. monocytogenes sezerniert Listeriolysin O besonders dann, wenn die Bakterien in eine neue Umgebung, sprich ein anderes Kulturmedium überführt werden (Domann, Med. Mikrobiologie der JLU Gießen). Dies nutzten wir aus, um große Mengen des Toxins zu produzieren und den aufwendigen Reinigungsprozess zu umgehen, wenn es auf die genaue LLO-Konzentration nicht ankam. Die in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Übernachtskultur wurde mit einer 10 ml Glaspipette in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) überführt und 20 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Henle Z 380, Fa. Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde das BHI-Medium abgesaugt und die Bakterien wurden in 10 ml Extrazellulärlösung mit 0,5 % FAFBSA (fatty acid free bovine serum albumine) resuspendiert und 2 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. In diesem Schritt produzieren die Listerien das Toxin. Als Maß der Bakterienkonzentration wurde die optische Dichte photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Bakteriensuspension in 10-facher Verdünnung betrug 0,15 – 0,35 bei 650 nm (Spektrophotometer UV Visible, Fa. Pharmacia Biotech, New Jersey, USA). Die Suspension wurde danach ein zweites Mal 20 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Bakterien-Pellet verworfen und der Überstand aliquotiert à 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße.

2.3.3 2h-Kulturüberstand

Für einen Teil der Experimente wurde der 2h-Kulturüberstand eingesetzt. Da hier keine exakte Proteinbestimmung möglich ist, wurde er anhand der Porenbildungszeit t_{10} (nähere Erläuterungen Abschnitt 3.2) mit dem gereinigten Toxin kalibriert. Der 2h-Kulturüberstand wurde in Konzentrationen von 100, 10 und 1% appliziert. Es wurden 50 μ l auf das Messkammervolumen von 1950 μ l appliziert. Bei dieser 1:40 Verdünnung entspricht dies Konzentrationen von 2,5, 0,25, 0,025 und 0,0025% (jeweils $n=3$). Die Messungen wurden an HEK-293 Zellen gemessen. Abbildung 5 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung.

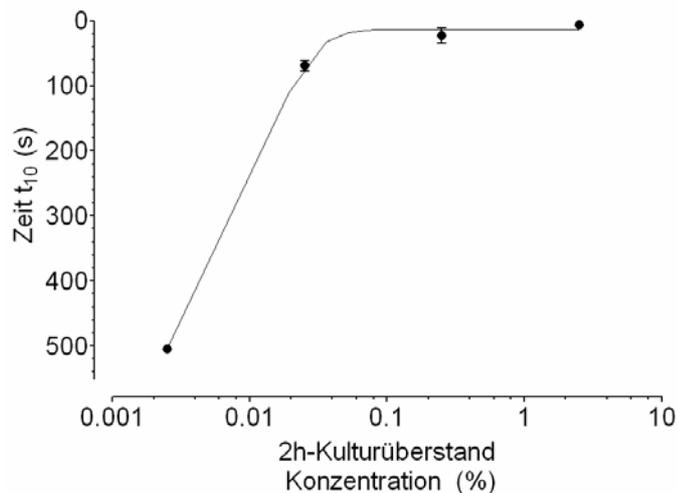


Abb. 5: Konzentrations-Wirkungsbeziehung des 2h-Kulturüberstandes. Drawn by eye. Aufgetragen ist die Zeit t_{10} in Sekunden als Maß der porenbildenden Aktivität auf der Ordinate gegen die Konzentration des 2h-Stunden Kulturüberstandes in % auf der Abszisse. Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV.

Der 0,025%ige 2h-Kulturüberstand zeigt eine t_{10} von 69 ± 5 s ($n=3$) vergleichbar mit 5 ng/ml gereinigtem LLO mit 64 ± 7 s ($n=23$). Im Weiteren wird die Bezeichnung KÜ für die 0,025%ige Verdünnung des 2h-Kulturüberstandes verwendet.

2.3.4 Herstellung der Bakteriensuspension

In manchen Experimenten, bei denen sehr hohe Toxinkonzentrationen notwendig waren, wurden Bakteriensuspensionen verwendet. Dazu wurde 1 ml der Bakterienkultur in BHI Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 6000 Umdrehungen pro min zentrifugiert (Biofuge 15 Fa. Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abgesaugt, anschließend wurden die Bakterien in

einem Waschschrift in 1 ml Extrazellulärlösung erneut resuspendiert. Die optische Dichte wurde in 10-facher Verdünnung bestimmt (0,6 - 0,9 bei 650 nm). Danach wurde die Bakteriensuspension wiederum für 5 min bei 6000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt. Schließlich wurden die Bakterien für die Experimente in 250 µl Extrazellulärlösung aufgenommen.

2.4 Toxine

Gereinigtes Listeriolysin O wurde unserem Labor von Dr. Ayub Darji (Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen) in einer Konzentration von 273 µg/ml zur Verfügung gestellt. Die Toxine wurden für die Versuche mit Extrazellulärlösung auf die Stammkonzentration von 50 ng/ml bis 4 µg/ml verdünnt, die jeweils 0,5 % FAFBSA enthielten. Dies entsprach eingesetzten Konzentrationen von 1,2 bis 100 ng/ml.

2.5 Elektrophysiologische Messungen

2.5.1 Vorbereiten der Zellen

Die HEK-293 wurden 36 bis 48 Stunden vor dem Experiment auf die 35 mm durchmessenden Petrischalen in geringer Dichte ausgesät. Die Petrischalen wurden dann als Messkammer in den Experimenten eingesetzt. Die Zellen wurden kurz vor dem Experiment 4 - 5 mal mit 2 ml Extrazellulärlösung gewaschen und die Messkammer anschließend mit 2 ml Extrazellulärlösung aufgefüllt. Zur Messung wurden total isoliert liegende Zellen verwendet, da diese die geringsten Grundströme hatten.

2.5.2 Aufbau des Patch-Clamp Messtandes

Der schematische Aufbau der Messanordnung ist in Abb. 6 dargestellt. Die Messkammern können direkt in eine Halterung eingesetzt werden, die die Zellen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Zeiss Axiovert 35, Oberkochen) fixiert.

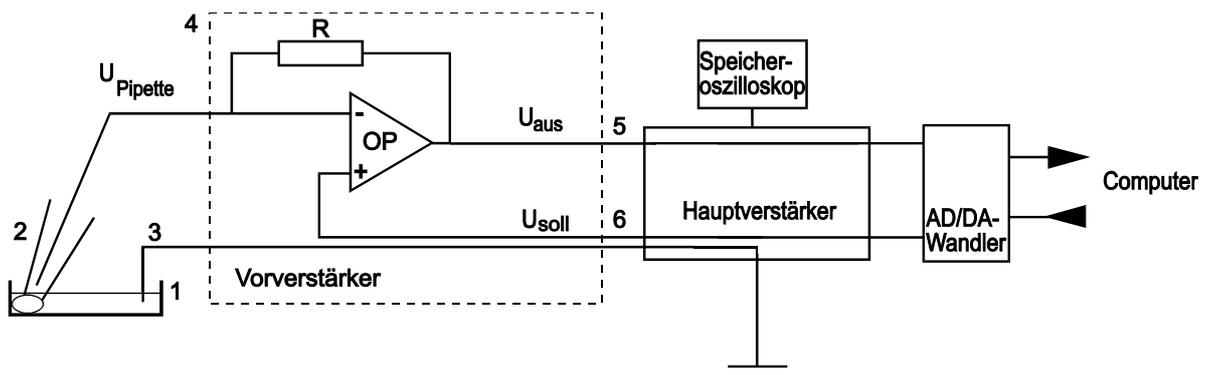


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Messtandes. (1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patch-Clamp Pipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand R in einen Strom umgerechnet wird,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

Diese Halterung ermöglicht zudem die Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung während der Experimente (Temperatur Control System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). In die Messkammer hinein ragen die Badelektrode und die Pipettenelektrode in einer Borosilikat-Glaskapillare „Patch-Pipette“. Die Glaskapillare ist über den Pipettenhalter und einen Silikonschlauch mit einer 50 ml Kolbenspritze verbunden, was das Erzeugen eines Über- und Unterdruckes in der Patch-Pipette ermöglicht. Mit Hilfe eines elektromechanisch getriebenen Mikromanipulators (Märzhauser, Wetzlar-Steindorf) wird die Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Die Aufnahme der Ionenströme erfolgt über die in der Elektrolytlösung der Badkammer bzw. der Patch-Pipette befindlichen chlorierten Silberelektrode (Fa Heraeus, Hanau). Die hier aufgenommenen Ströme werden über den, direkt mit der Elektrode in Verbindung stehenden externen Vorverstärker zunächst vorverstärkt und dabei in Spannungssignale umgewandelt. Der Vorverstärker ermöglicht durch seinen extrem hohen Eingangswiderstand bei kleinem elektrischem Grundrauschen die Messung von Einzelkanalströmen im Bereich weniger pA. Vom Vorverstärker werden diese Signale in den Hauptverstärker übertragen (EPC 9, List Electronics GmbH, Darmstadt). Die Daten werden vom EPC-9 direkt in den PC übertragen und gespeichert. Über den PC (Macintosh Quadra 840 AV, Apple Computer, Ismaning) kann der EPC 9 gesteuert werden und Signale in Form von Spannungen durch den Vorverstärker übertragen werden, die über die Silberelektrode auf die Zelle übertragen werden. Analyse und Auswertung erfolgten mit den Programmen Pulse und PulseFit (HEKA Elektronik,

GmbH, Lambrecht) sowie dem Programm Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Bilderstellung und Bearbeitung erfolgten mit den Programmen Igor (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, USA) und Picture Publisher 7.0 (Microsoft, Redmond, USA). Invertmikroskop, Messkammerhalterung und Mikromanipulator sind innerhalb eines Faraday'schen Käfigs pneumatisch gedämpft gelagert, um elektrische und mechanische Störeffekte zu minimieren.

2.5.3 Herstellung der Patch-Pipetten

Aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) werden in einem mehrstufigen Prozess mit einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co. Novato CA, USA) die Patch-Pipetten gezogen, wobei je nach Einstellung Spitzenform und Öffnungsdurchmesser sehr variabel gewählt werden können. Danach werden die Pipettenspitzen mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolitur-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH Ratingen) feuerpoliert. Durch das Feuerpolieren kann der Öffnungsdurchmesser der Pipette noch etwas beeinflusst werden. Weiterhin werden durch das Feuerpolieren mögliche Oberflächen-Unebenheiten des Glases eingeschmolzen und Verunreinigungen von der Pipettenspitze entfernt. Dies ermöglicht einen besseren Kontakt zwischen der Glaswand der Pipettenspitze und der Zellmembran.

2.5.4 Einzelkanal- und Ganzzelleableitungen

Eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Patch-Pipette wird mit Hilfe des Mikromanipulators unter bestehendem Überdruck von ca. 80 mbar an die zu messende Zelle herangeführt (Abb. 7). Der Überdruck verhindert das Vermischen der Intrazellulärlösung mit der Badlösung. Zusätzlich wird durch die ausströmende Intrazellulärlösung ein Verschmutzen der Spitze durch Partikel in der Badlösung verhindert. Der Überdruck führt zusätzlich zu einer leichten Eindellung der Zellmembran, die im Phasenkontrastmikroskop gut zu erkennen ist. Der elektrische Widerstand wird ständig durch einen 10 mV Testpuls und dem daraus resultierenden Strom kontrolliert. Mit der Elektrode in der Badlösung beträgt der Elektrodenwiderstand zwischen 5 und 10 M Ω . Bei Zellkontakt und Ablassen des

Überdrucks steigt dieser Widerstand auf ca. 20 - 100 M Ω an. Bei Erzeugen eines Unterdrucks entsteht im Idealfall ein so enger Kontakt, dass der Widerstand auf 2-10 G Ω ansteigt. Dies wird als Giga-Seal bezeichnet (Hamill et al. 1981). Ausgehend von dieser Cell-Attached Konfiguration kann man durch einen Unterdruckpuls oder einen Spannungspuls von 1 mV und wenigen Millisekunden Dauer die Membran unter der Pipette durchbrechen und man erreicht die Whole-Cell Messkonfiguration, bei der die Ströme der gesamten Zelle gemessen werden können. Durch vorsichtiges Wegziehen der Pipette von der Zelle kommt man in die Outside-Out Konfiguration, bei der man ein Membranstück aus der Zelle herausgelöst hat, das mit der Außenseite in die Badlösung zeigt. Wenn man ausgehend von der Cell-Attached Konfiguration die Pipette zurückzieht, kommt man zum Inside-Out Patch, bei dem ein Membranstück auf der Pipette sitzt, der mit der Innenseite in die Badlösung zeigt.

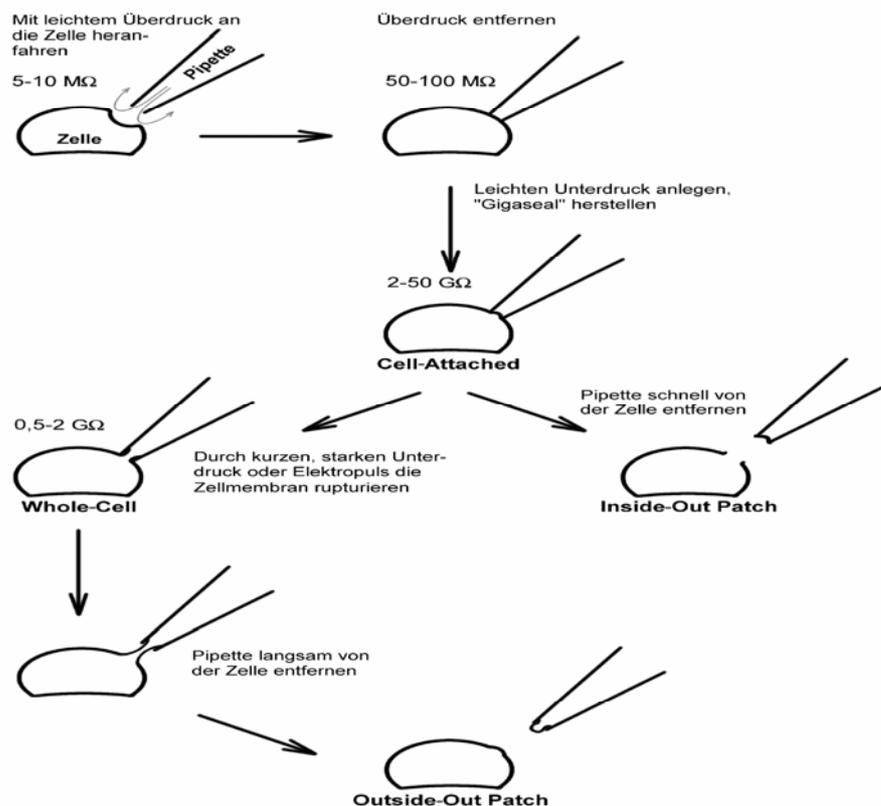


Abb. 7: Die vier klassischen Ableitungskonfigurationen der Patch-Clamp Technik (verändert nach Hamill et al 1981). Erläuterungen siehe Text.

Der Übergang in die Outside-Out Messkonfiguration kann sehr gut kontrolliert werden, weil zuerst eine Whole-Cell Messung erfolgt. Anhand des Testpulses kann die Entwicklung des sich erhöhenden Widerstandes und damit die Ausbildung des Patches beim Zurückziehen der Pipette gut kontrolliert werden. Im Gegensatz zum Inside-Out Patch, bei dem nach Ausbildung der Cell-Attached Konfiguration nicht bestimmt werden kann, ob sich ein wirklicher Patch oder nur ein Membranvesikel an der Pipettenspitze gebildet hat.

2.5.5 Bad-Superfusion

Um unter Patch-Clamp Messbedingungen die Zellen mit verschiedenen Lösungen umspülen zu können oder Substanzen schnell auswaschen zu können, wurde die in Abb. 8 dargestellte Bad-Superfusionsanlage verwendet.

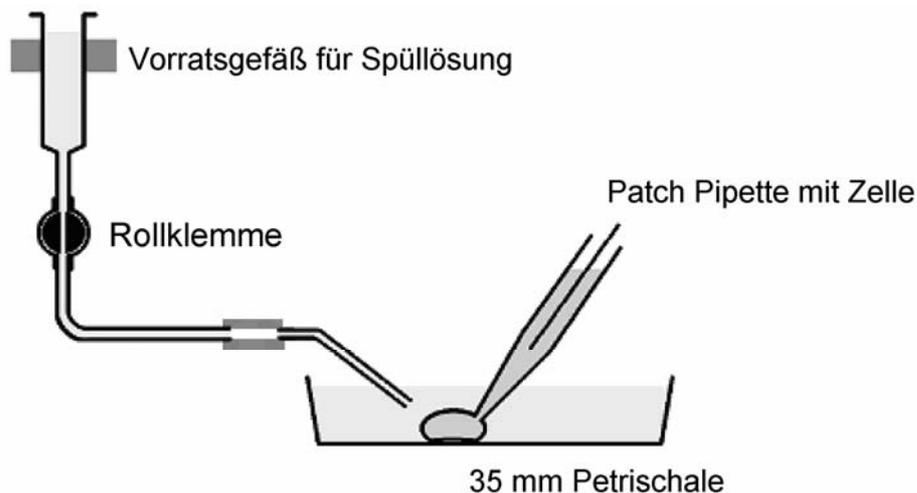


Abb. 8: Schematische Darstellung der Superfusionslage für Wash-Out Experimente und bei Patch-Clamp Messungen. Genaue Beschreibung bei Koschinski (1999).

Als Vorratsgefäß wurde eine handelsübliche 10 ml Einwegspritze (Braun, Melsungen) verwendet. Die Schläuche sind aus Polyethylen (Innendurchmesser 0,5 mm Carl Roth GmbH, Karlsruhe) beziehungsweise zu Beginn der Leitung in Höhe der Rollklemme aus Silikon. Der Zulauf wird über Rollklemmen aus handelsüblichen Infusionsbestecken geregelt, die ein an dieser Stelle befindliches Silikonstück zuquetschen. Die Ausstromdüse besteht aus einer zurechtgebogenen Injektionsnadel, (Innendurchmesser 0,5 mm Anschliff entfernt), die im abgehenden Kanal mit einem etwa 3 mm langen Silikonschlauchstück eingepasst und über Feststellschrauben festgeklemmt wird. Die gesamte Apparatur ist über einen

Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar-Steindorf) steuerbar und kann so vor der zu messenden Zelle platziert werden. Die Durchflussmenge wird über die Höhe des Vorratsgefäßes über dem Flüssigkeitsspiegel der Messkammer eingestellt.

Alle verwendeten Lösungen werden partikelfrei gefiltert und das Vorratsgefäß staubfrei gelagert, da mitgerissene, auf die Zelle treffende Partikel bei diesen Strömungsgeschwindigkeiten zu deutlichen Membranreaktionen führen können.

2.5.6 Ionenlösungen

Bei den Patch-Clamp Experimenten wurden die Extrazellulärlösungen (Tab. 1) an der Membranaußenseite und die Intrazellulärlösungen (Tab. 2) an der zytologischen Seite der Zellmembran eingesetzt. Die Osmolalität wurde über Gefrierpunktserniedrigung gemessen (Osmomat 030, Fa. Gonotec, Berlin). Die Zugabe von 1 µl Sorbitol (2mM) in die 2 ml Extrazellulärlösung erhöht deren Osmolalität um 1 mosmol. Es wurde jeweils vor der Messung Sorbitol zur Extrazellulärlösung zupipettiert, um einen Osmolalitätsunterschied von 20 mosmol intrazellulär höher als extrazellulär zu erreichen. Die Extrazellulärlösung mit dem pH-Wert von 5,9 wurde mit dem MES Puffer angesetzt (s. unten, Index: MES).

Tab. 1: Extrazellulärlösungen

Name	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES	MES
Extrazellulärlösung	140	3	2	2	15	10	0
E _{MES}	140	3	2	2	15	0	10

Alle Konzentrationen sind soweit nicht anders angegeben in mM

Extrazellulärlösung mit 4 mM NaOH auf pH 7,35 eingestellt. Gemessene Osmolalität 280-305 mosmol. E_{MES} mit 3 mM HCl auf pH 5,9 eingestellt. Gemessene Osmolalität 310 mosmol.

HEPES 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonat: Puffer pKa 7,5,

MES (2[N-Morpholino]ethan-sulfonsäure: Puffer pKa 6,1,

Die Intrazellulärlösungen unterschieden sich hinsichtlich der freien Ca²⁺-Konzentration. Die IBL₁₀₀ Lösung war mit dem Ca²⁺-Chelator BAPTA (s. unten) niedrig Ca²⁺-gepuffert (BAPTA, low buffered Kurzschreibweise BL) mit einer freien Ca²⁺-Konzentration von 100 nM (Index: 100), während die I_{10B} Lösung stark Ca²⁺-gepuffert war (10 mM BAPTA, Index: 10B) mit einer nominellen Ca²⁺-Konzentration von 0.

Tab. 2: Intrazellulärlösungen

Name	Freie Ca ²⁺ -Konzentration	K-Glu	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂ μM	BAPTA	HEPES
IBL ₁₀₀	100 nM	140	20	2	29,69	0,1	10
I _{10 B}	0	140	15	2	0	10	10

Alle Konzentrationen sind soweit nicht anders angegeben in mM

Mit 0,3 mM KOH auf pH 7,30 eingestellt. Gemessene Osmolalität: 320-335 mosmol.

BAPTA 1,2-bis(amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat Ca²⁺-Chelator.

2.6 Substanzliste

Fetales und Neonatales Kälberserum: Das verwendete fetale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich) beziehungsweise das neonatale Kälberserum von der Firma PAN Systems GmbH, (Aidenbach), bezogen und sofort nach Erhalt bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde es bei 56°C komplementinaktiviert. Die Gesamtproteinkonzentration betrug 60 mg/ml. Die Osmolalität betrug bei beiden Chargen 290 mosmol.

DMSO (Dimethylsulfoxid) Lösungsmittel für lipophile Substanzen. Es wurde angestrebt, in der Badlösung während des Experiments eine Konzentration von 0,1 % nicht zu überschreiten, da bei höheren Konzentrationen DMSO-bedingte Effekte auftreten. In Experimenten, in denen diese Konzentration überschritten wurde, wird gesondert darauf hingewiesen.

FAFBSA (Fatty acid free bovine serum albumine): Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an Oberflächen, falls Toxine in niedrigen Konzentrationen (<1μg/ml) eingesetzt wurden (Sigma-Aldrich, Steinheim), Stammlösung: 5 % in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 0,5 %.

DTT (Dithiotreitol), (Merck, Darmstadt), MW: 154,3 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 1 mM.

FURA-2 AM (1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat-pentaacetoxymethylester), Fluoreszenzfarbstoff für Ca²⁺. Acetoxymethylester wird in Zellen aufgenommen und anschließend zum aktiven FURA-2 metabolisiert, das impermeabel ist und in

der Zelle verbleibt, (Molecular Probes, Eugene OR, USA), MW: 1001 g/mol, Stammlösung: 5 mM in DMSO, eingesetzte Konzentration 5 μ M.

2.6.2 Testsubstanzen

Bei der Suche nach Substanzen, die die LLO-induzierte Porenbildung blockierten, wurden zunächst Substanzen getestet, von denen bereits bekannt war, dass sie Ionenkanäle blockieren. Besonderes Augenmerk wurde auf bereits zugelassene Arzneimittel verwendet, jedoch wurden auch andere Pharmaka und Substanzen getestet. Falls kein Literaturverweis genannt ist, stammt die Information über die Wirkungsweise der Substanz aus dem TIPS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement (Alexander & Peters 1999).

Zum Screening der Substanzen wurden Konzentrationen von 100 μ M verwendet. Wenn dies aufgrund von mangelnder Solubilität der Substanz nicht gelang, wurden geringere Konzentrationen oder Lösungsvermittler wie DMSO eingesetzt. Alle Lösungen wurden bei -20°C eingefroren und kurz vor dem Versuch aufgetaut. Es wurden immer 50 μ l eingesetzt, was bei einem Messkammervolumen von 1950 μ l einer 40-fachen Verdünnung entspricht.

2.6.2.1 Ionenkanal-blockierende Substanzen

Na⁺-Kanalblocker

Amiloridhydrochlorid blockiert epitheliale Na⁺-Kanäle, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 266,1 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung mit 4 % DMSO, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Procainamid blockiert spannungsabhängige Na⁺-Kanäle, (Novocain[®], Hoechst, Frankfurt), MW: 370,9 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Succinylbischolin aktiviert den n-Acetylcholinrezeptor, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 397,4 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Ca²⁺-Kanalblocker

Nifedipin blockiert L-Typ Ca²⁺-Kanäle (Übersicht bei Striessnig et al. 1988), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 346,3 g/mol, Stammlösung: 100 mM in DMSO, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Verapamil blockiert L-Typ Ca²⁺-Kanäle (Übersicht bei Striessnig et al. 1988), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 491,1 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Trifluoperazin blockiert L-Typ Ca²⁺-Kanäle und Calmodulin (Übersicht bei Taylor et al. 1998), (Merck, Darmstadt), MW: 407,5 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

K⁺-Kanalblocker

Charybdotoxin ist ein basisches Peptid und blockiert Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle (Reinhart et al. 1989), (Latoxan, Dietikon, Schweiz), MW: 4296 g/mol, Stammlösung: 12 µM mit 0,5 % FAFBSA, eingesetzte Konzentration 300 nM.

Iberiotoxin blockiert Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle großer Leitfähigkeit (Garcia et al. 1998), (Latoxan, Dietikon, Schweiz), MW: 4230,9 g/mol, Stammlösung: 1,2 µM in Extrazellulärlösung mit 0,5 % FAFBSA, eingesetzte Konzentration 30 nM.

Margatoxin blockiert spannungsabhängige und nicht spannungsabhängige Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle (Garcia-Calvo et al. 1993), (Bachem, Bubendorf, Schweiz), MW: 4179,0 g/mol, Stammlösung: 1,2 µM in Extrazellulärlösung mit 0,5 % FAFBSA, eingesetzte Konzentration 30 nM.

Cl⁻-Kanalblocker

Nifluminsäure blockiert Cl⁻-Kanäle (White & Aylwin 1990), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 282,2 g/mol, Stammlösung: 10 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 250 µM.

2.6.2.2 Andere Substanzen

Metalle

Aluminiumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 133,3 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Ratte: 450 mg/kg Körpergewicht (Merck Index 2001).

Cadmiumchlorid blockiert Ca²⁺-Kanäle (Übersicht bei Randall 1998), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 183,31 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Gadoliniumchlorid blockiert Ca²⁺-Kanäle und stretch-activated ion-channels (Übersicht Palasz & Czekaj 2000), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 371,7 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Maus: 550 mg/kg i.p. >2g/kg oral (Merck Index 2001).

Lanthanchlorid blockiert Ca²⁺-Kanäle und stretch-activated ion-channels (Übersicht bei Palasz & Czekaj 2000), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 371,4 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Maus: 350 mg /kg i.p. 4,2 g/kg oral (Merck Index 2001).

Lithiumchlorid zur Therapie bipolarer, affektiver Störungen, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 42,4 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Maus: 1,06 g/kg (Merck Index 2001).

Manganchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 125,8 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Maus: 180-250 mg/kg i.v. (Merck Index 2001).

Nickelchlorid blockiert den Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (Beuckelmann & Wier 1989) und Ca²⁺-Kanäle (Übersicht bei Randall 1998), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 129,6 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Ruthenium-chlorid (Hexahydrat) (Sigma-Aldrich, Steinheim) MW: 207,4 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Ytterbiumchlorid blockiert Ca²⁺-Kanäle und stretch-activated ion-channels (Übersicht bei Palasz & Czekaj 2000), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 387,49 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M. LD₅₀ Maus: 395 mg/kg i.p. 6,7 g/kg oral (Merck Index 2001).

Wismutchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 315,34 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Zinkchlorid blockiert Ca^{2+} -Kanäle (Übersicht bei Randall 1998), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 136,3 g/mol, Stammlösung: 40 mM in aqua, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Farbstoffe

Brilliant-Grün Farbstoff für die Mikroskopie (Fluka-Chemika, Buchs, Schweiz), MW: 482,7 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Eosin Y (yellowish) Farbstoff für die Mikroskopie, blockiert plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) (Gatto et al. 1993), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 691,9 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Eosin B (bluish) Farbstoff für die Mikroskopie, blockiert plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) (Gatto et al. 1993), (Sigma-Aldrich, Steinheim) 629,1 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Fuchsin Farbstoff für die Mikroskopie, (Fluka-Chemika, Buchs, Schweiz), MW: 585,54 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Gentianaviolett Farbstoff für die Mikroskopie, (Fluka-Chemika, Buchs, Schweiz), MW: 408,0 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Chelatoren

DTPA (Diethylentriaminepentacetic acid) Chelator, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 393,3 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

EDTA (Etyhlendiamintetraacetic acid) Chelator für mono-, di- und trivalente Kationen, (Titriplex 3[®], Merck, Darmstadt), MW: 372,3 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

EGTA (Ethylen-glycol bis(β -Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetra-acetat) Chelator für mono-, di-, und trivalente Kationen, (Sigma-Aldrich, Steinheim) MW: 380,3 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Muskelrelaxantien/m-Acetylcholinrezeptorantagonisten

Cisatracurium nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans (Nimbex[®], GlaxoSmithKline, Berlin), MW: 1243,5 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit Extrazellulärlösung auf 3,2 mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

d-Tubocurarin nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 682,9 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Biperiden blockiert muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, (Akineton[®], Knoll, Liestal, Schweiz), MW: 311,5 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit 16 μ M, eingesetzte Konzentration 400 nM.

Ca²⁺-Freisetzung / Wiederaufnahme Inhibitoren

2-Aminoethoxydiphenyl-borat inhibiert die IP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung (Maruyama et al. 1997), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 225,1 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Certoparin niedermolekulares Heparin, aktiviert Antithrombin, blockiert IP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung (Michelangeli et al. 1995), (Mono-Embolex[®], Novartis, Basel), Ampulle mit 3000 IE/ml, eingesetzte Konzentration 75 IE/ml.

Dantrolen blockiert Ryanodin-Rezeptoren in erregbaren und nicht erregbaren Zellen (Song et al. 1993), (Dantrolen[®], Röhm-Pharma, Weiterstadt), MW: 314,26 g/mol, Stammlösung: 2,2 mM, eingesetzte Konzentration.

Ruthenium-Rot blockiert mitochondriale Ca²⁺-Uniporter, (Moore 1971), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 858,4 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

Pumpen / Transporter Inhibitoren

Furosemid blockiert $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Co-Transporter, (Furosemid[®], ratiopharm, Ulm), MW: 330,8 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit Extrazellulärlösung auf 4 mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 μM .

Digoxin blockiert $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasen, (Novodigal[®], Lilly, Bad Homburg), MW: 780 g/mol, Ampulle auf 25,5 μM verdünnt, eingesetzte Konzentration 640 nM.

Fluoxetin Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, (Fluoxetin[®], ratiopharm, Ulm), MW: 345,8 g/mol, Lösung mit Extrazellulärlösung verdünnt wegen hoher Osmolalität der Glucoselösung (0,26 mol/l) auf 6,5 μM Fluoxetinhydrochlorid (Glucose: 26 mmol/l), eingesetzte Konzentration 160 nM.

Mirtazapin tetrazyklisches Antidepressivum, (Remergil[®], Organon, Oberschleißheim), MW: 265,4 g/mol, Stammlösung: Lösung mit Extrazellulärlösung auf 4 mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 μM .

Glutamat-Rezeptor Antagonisten

Amantadin blockiert NMDA-Rezeptoren, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 187,3 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μM .

Ketamin S-Enantiomer Analgetikum, (Ketamin[®] Inresa, Freiburg), MW: 274,2 g/mol, Stammlösung: Injektionslösung mit Extrazellulärlösung verdünnt auf 4mM, eingesetzte Konzentration 100 μM .

Histamin-Rezeptor Antagonisten

Dimetinden Histamin₁-Rezeptor Antagonist, (Fenistil[®], Novartis, Basel) MW: 292,4 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit Extrazellulärlösung auf 4 mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 μM .

Promethazin Histamin₁-Rezeptor Antagonist, (Atosil[®], Bayer, Leverkusen) MW: 320,9 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μM .

GABA_A-Agonisten

Diazepam Benzodiazepin, moduliert GABA_A-Rezeptor, (Valium[®], Roche, Grenzach-Wyhlen), MW: 284,7 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit Extrazellulärlösung auf 4 mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Phenobarbital aktiviert GABA_A-Rezeptoren, (Luminal[®] Desitin, Hamburg Fuhlsbüttel), MW: 232,3 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit Extrazellulärlösung auf 4mM verdünnt, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Pharmaka mit unbekanntem Wirkmechanismus

Cromoglycinsäure verhindert die Degranulation von Mastzellen, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 512,3 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Ergotamin Mutterkornalkaloid, (DET MS[®], DrRentschler, Lampheim), MW: 583,7 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit 1,7 µM, eingesetzte Konzentration 42 nM.

Natriumaurothiomalat Rheumatologisches Basistherapeutikum, (Tauredon[®], Byk Gulden, Konstanz), MW: 196,7 g/mol, Stammlösung: 0,5 ml Ampulle mit 22,65 mg mit Extrazellulärlösung auf 400 µM verdünnt, eingesetzte Konzentration 10 µM.

Pentoxifyllin hemmt die Effekte von TNF-α auf Granulozyten (Sullivan et al. 1988), (Trental[®], Aventis), MW: 278,3 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit 71 µM, eingesetzte Konzentration 1,7 µM.

Pirfenidon blockiert in vitro Effekte von *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (Hale et al. 2002), (Biotrend, Köln), MW: 185,23 g/mol, Stammlösung: 40 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Andere Substanzen

Lysin-acetylsalicylat blockiert Cyclooxygenase (COX)-1 und 2, (Aspisol[®], Bayer, Leverkusen) MW: 326,25 g/mol, Stammlösung: Ampulle verdünnt auf 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Erythromycin Antibiotikum, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 733,9 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 µM.

Terbutalin Mischung aus zwei β_2 -Sympathomimetika, (Bricanyl[®], AstraZeneca, Plankstadt), MW: 225,3 g/mol, Stammlösung: Ampulle mit 2,22 mM, eingesetzte Konzentration 55 μ M.

Strychnin Konvulsivum, blockiert Glycin-Rezeptoren, (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 370,9 g/mol, Stammlösung: 4 mM in Extrazellulärlösung, eingesetzte Konzentration 100 μ M.

2.6.3 Inhibitoren zytoskelettaler Proteine

Cytochalasin D inhibiert die Aktin-Polymerisation (Urbanik et al. 1989), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 507,6 g/mol, Stammlösung: 5 mM in DMSO, eingesetzte Konzentrationen 10 μ M.

Nocodazol ist ein Inhibitor der Tubulin-Polymerisation, (Hoebeke et al. 1976), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 301,3 g/mol, Stammlösung: 4 mM in DMSO, eingesetzte Konzentration 10 μ M.

Phenylarsinoxid: hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose (Moss et al. 1991), (Sigma-Aldrich, Steinheim), MW: 168,0 g/mol, Stammlösung: 40 mM in DMSO, eingesetzte Konzentration 10 μ M.

2.7 Hämolyse-Titer-Test

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität des LLO wurde der Hämolyse-Titer-Test eingesetzt. Hierzu werden Schafserythrozyten in Phosphatpuffer (50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) zu einer 0,5 % Erythrozytensuspension angesetzt. Diese Suspension wird auf einer 96 well Mikrotiterplatte in 2 Reihen à 50 μ l pipettiert. Jede Reihe enthält eine Erythrozytensuspension von 0,5 %, wobei eine Kontrollreihe zur Verfügung steht. Anschließend wird das zu testende Toxin in aufsteigenden Titrationsstufen dazu pipettiert, wodurch eine aufsteigende Verdünnungsreihe entsteht. Die Platte wird 1 Stunde bei 37° C mit dem zu testenden Toxin inkubiert. Anschließend wird die gesamte Titerplatte zentrifugiert. Wenn Hämolyse eintritt, ist kein Hämoglobin-Pellet am Boden der Kavität zu sehen. Das Ergebnis wird photographisch dokumentiert, ausgewertet und in tabellarischer Form dargestellt.

2.8 Ca²⁺-Imaging

2.8.1 Vorbereiten der Zellen

Die HEK-293 Zellen wurden auf speziellen Petrischalen mit 35 mm Durchmesser ausgesät, die in der Mitte einen 15 mm durchmessenden Glasboden haben. Vor den Versuchen wurden die Zellen mit 5 µM FURA-2 AM eine Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende intrazelluläre Beladung zu erreichen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht, zweimal mit etwa 1 ml Extrazellulärlösung gespült, die Petrischale schließlich mit 4 ml Extrazellulärlösung aufgefüllt. Die Experimente wurden dann bei Raumtemperatur in Extrazellulärlösung durchgeführt.

2.8.3 Theoretische Grundlagen des Ca²⁺-Imaging

Mit dem Imaging-System (VisiChrom, Visitron Systems, Puchheim) wurde FURA-2 alternierend bei 340 und 380 nm mit einer Quecksilberdampf-Lampe angeregt und die Fluoreszenz bei 425 nm registriert. FURA-2 hat die besondere Eigenschaft, bei hohen Ca²⁺-Konzentrationen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 380 nm zu haben. Die Fluoreszenz bei einer gegebenen Wellenlänge hängt von der FURA Konzentration c , der Dicke der Zelle d , einer Konstante K sowie der Ca²⁺-Konzentration ab. Misst man die Fluoreszenz bei den beiden Wellenlängen 340 und 380 nm, kann man den Quotienten bilden. Dabei lassen sich die Werte c , d und K kürzen. Das Verhältnis F_{340}/F_{380} hängt also nur von der Ca²⁺-Konzentration ab. (Einzelheiten bei Poenie et al. 1986). Die gemessenen F_{340}/F_{380} Verhältnisse wurden, in Falschfarben kodiert, auf dem PC Monitor dargestellt, wobei blau niedrige und rot hohe Ca²⁺-Konzentrationen anzeigen. Als Referenz für den Nullwert wurde jeweils ein Messpunkt auf ein zellfreies Stück auf den Boden der Petrischale gesetzt. Ausgewertet wurde mit der mitgelieferten Software MetaFluor (Universal Imaging Cooperation, Downington, USA), sowie mit dem Programm Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

2.9 Statistische Auswertungen

Alle Mittelwerte sind stets als SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. Die Prüfung des Signifikanzniveaus zweier Stichproben bzw. Messwerten wurde mit dem t-Test durchgeführt.

Die Häufigkeitsgipfel der Amplitudenhistogramme in Abschnitt 3.3.5 wurden aus der kumulativen Häufigkeit berechnet (Brockmeier 1991). Konkurrierende Anpassungen wurden mittels des f-Tests überprüft.

In Abschnitt 3.3 wurden, um zu überprüfen ob eine gemessene Verteilung von Ereignissen der erwarteten Verteilung aus Kontrollmessungen entspricht, die Daten in eine Vierfeldertafel eingetragen und der χ^2 -Test verwendet, da die Kontrollverteilung als variable Größe selbst einer Variation unterliegt. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass sich die gemessenen Verteilungen nicht von der Kontrollverteilung unterscheiden. Die Nullhypothese wurde bei einem $p \leq 0,05$ abgelehnt. Die Signifikanzschranken des χ^2 -Test wurden aus den Tabellen von Fisher & Yates (1963) für einen Freiheitsgrad entnommen.

Bei niedriger Anzahl von Messungen $n \leq 6$ wurden die Ergebnisse mittels Fishers exaktem Test überprüft. Die statistischen Analysen wurden im Sinne einer explorativen Datenanalyse durchgeführt. Als Auswertungsprogramme für statistische Analysen wurden die Software Excel (Microsoft, Redmond, USA) und Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 LLO-induzierte Porenbildung

Listeriolysin O (LLO) verursacht elektrophysiologisch nachweisbare Porenströme in HEK-293 Zellen (Abb. 9). Alle Messungen wurden bei einem Membranpotential von -50 mV durchgeführt, um die Aktivierung endogener K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle in HEK-293 Zellen zu verhindern (Berjukow et al. 1996, Repp et al. 2002). Die porenbildende Wirkung ist stark von der LLO-Konzentration abhängig, wobei die Porenbildung bei hohen Konzentrationen schneller abläuft und insgesamt einen höheren Membranstrom induziert (Abb. 9B).

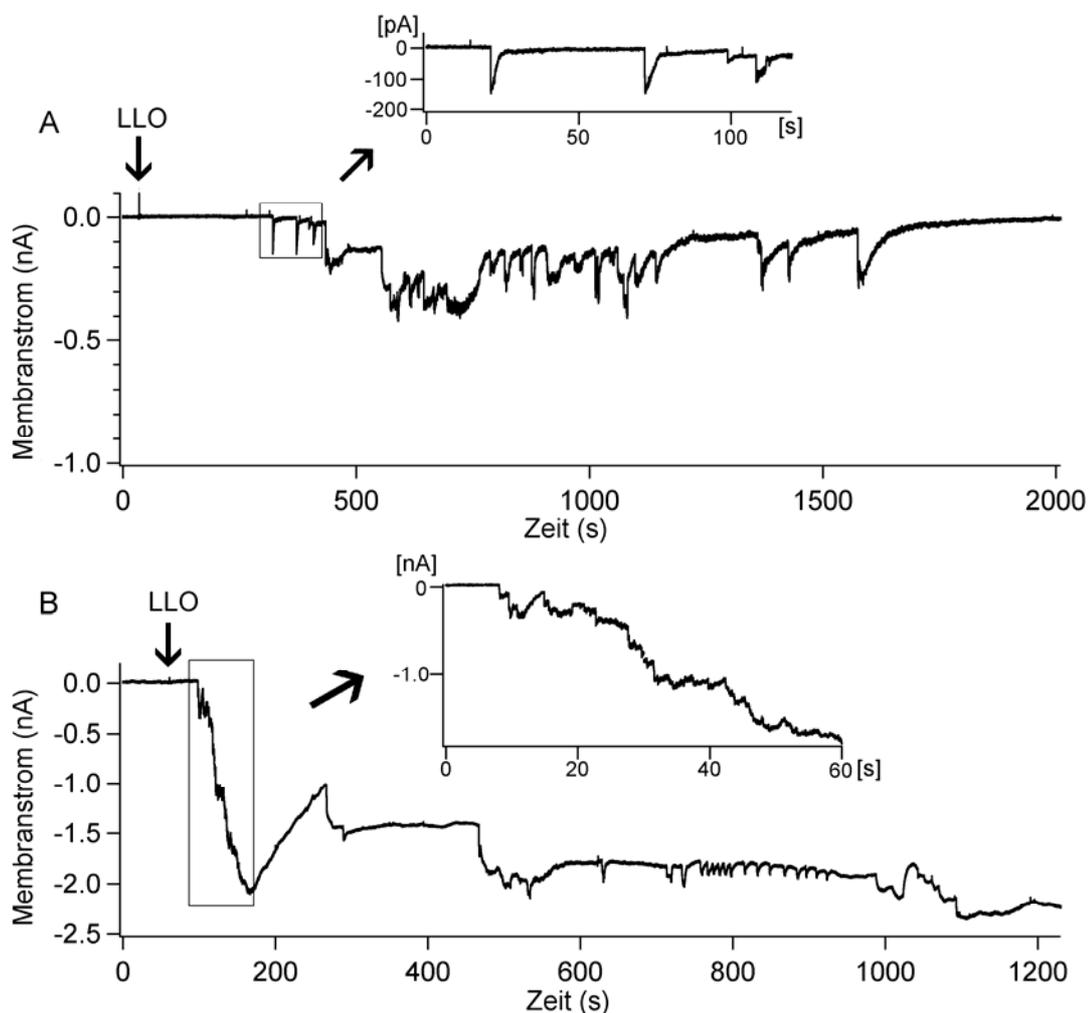


Abb. 9: LLO-induzierte Porenströme in HEK-293 Zellen

A: Pfeil: Applikation von 1,2 ng/ml LLO appliziert. Nach einer Latenz von 340 s sieht man einzelne, sprunghafte Stromzunahmen, die der Porenbildung entsprechen und Inaktivierungen dieser Ströme.

B: Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO. Die Porenbildung beginnt bereits nach einer Latenz von 35 s. Es kommt zu Porenbildungen und Porenschließungen, wobei jedoch die Porenbildung überwiegt.

Im Inset von **A** und **B** ist die initiale Porenbildung in höherer Zeitaufösung zu sehen.

Der Porenstrom wird von den Kationen Na^+ und K^+ sowie von den Anionen Cl^- und Glutamat getragen, wie bereits durch Strom-Spannungsmessungen von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Repp et al. 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die LLO-induzierten Poren (LLO-Poren) auch für divalente Kationen wie Ca^{2+} und Ba^{2+} permeabel sind (Repp et al. 2002). Eine besondere zellphysiologische Bedeutung kommt dem Einstrom von Ca^{2+} und den dadurch induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Oszillationen zu (siehe Abschnitt 3.8), die wiederum die Regulation der Zellfunktionen beeinflussen können (Berridge et al. 1998).

3.2 Aktivierbarkeit von LLO durch Dithiotreitol (DTT) und Senkung des pH-Wertes

Fast alle Cholesterol-abhängige Zytolysine (CDTX) wie LLO lassen sich durch Thiole aktivieren. Der Wirkmechanismus der Thiol-Aktivierung könnte auf einer Reduktion der SH-Gruppe des einzigen Cysteins im LLO-Molekül beruhen. Dieses Cystein befindet sich im CDTX-gruppenspezifischen Undekapeptid und ist für die Porenbildung essentiell. Die *L. monocytogenes*-Mutante W492A, bei der das Cystein gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, zeigte in Patch-Clamp Whole-Cell Messungen keine porenbildende Aktivität (Butler 2005).

Zur Bestimmung der porenbildenden Aktivität von LLO wurde die Porenbildungszeit t_{10} , die Zeit von der ersten bis zur zehnten Porenbildung, eingeführt. LLO-Poren haben entweder einen Elementarstrom von 45 pA bei -50 mV Membranpotential oder Porenströme mit ganzzahlig Vielfachen davon. Es wird vermutet, dass dies durch synchrones Öffnen mehrerer LLO-Poren zustande kommt (Repp et al. 2002). Dementsprechend wurde bei der Bestimmung der Porenbildungszeit t_{10} ein größerer Porenstrom als ein entsprechendes Vielfaches des Elementarstroms gezählt. Ein Erreichen des Gesamtstroms von 450 pA entspricht dann der Bildung von 10 Poren.

Zur Thiol-Aktivierung des LLO wurde Dithiotreitol (DTT) eingesetzt. Dazu wurde LLO (5 ng/ml) mit 1 mM DTT für 5 Minuten vorinkubiert, in die Extrazellulärlösung appliziert und die Porenbildungszeit t_{10} bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der porenbildenden Aktivität von thiol-aktiviertem LLO um das 3,6fache

gegenüber der Kontrolle (Abb. 10). Thiol-aktiviertes LLO bewirkte keine Veränderung in der Amplitudenverteilung der Porenströme.

Eine einzigartige Eigenschaft von LLO unter den CDTX ist die Aktivierung durch niedrige pH-Werte mit einem Optimum um pH 5,9. Dies konnte durch Hämolyse-Experimente gezeigt werden (Geoffroy et al. 1987). Es sollte nun die pH-Abhängigkeit der LLO-Aktivierung elektrophysiologisch charakterisiert werden. Dazu wurde die in Abschnitt 2.6.6 beschriebene Extrazellulärlösung E_{MES} mit einem pH von 5,9 eingesetzt. Die Zeit t_{10} , als Maß der porenbildenden Aktivität, wurde für 5 ng/ml LLO gemessen und diese mit LLO bei pH 7,3 verglichen. Es kam zu einer Steigerung der porenbildenden Aktivität von LLO um das 4,9fache (Abb.10).

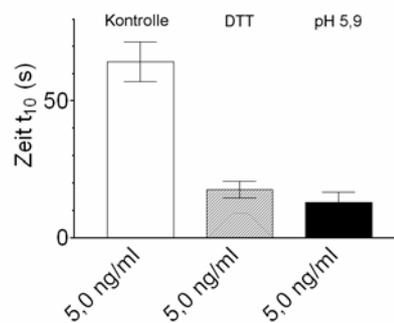


Abb. 10: Dithiotreitol (DTT) und Senkung des pH-Wertes aktivieren die porenbildenden Eigenschaften von LLO.

Offener Balken: unbehandeltes LLO pH 7,3

Schraffierter Balken: thiol-aktiviertes LLO pH 7,3

Geschlossener Balken: pH 5,9

Zeit t_{10} = 64 ± 7 s (n=23).

Zeit t_{10} = 18 ± 3 s (n=5).

Zeit t_{10} = 13 ± 4 s (n=4).

Die LLO-Konzentration betrug 5 ng/ml, pH-Messung in E_{MES} .

3.3 Abhängigkeit der Porenschlüsse der LLO-Poren von der intrazellulären ATP-Konzentration, der Ca^{2+} -Konzentration und der zytoskelettalen Funktion

3.3.1 Allgemeine Beobachtung der Porenschlüsse

Eine weitere Charakterisierung von LLO-Porenströmen sollte sich auf die Porenschlüsse konzentrieren. Die LLO-induzierten Porenströme treten immer schlagartig auf (Abb. 11). Im Gegensatz dazu laufen die Porenschlüsse prinzipiell auf zwei verschiedene Arten ab. Es gibt schnelle Porenschlüsse (Abb. 11A) oder langsam verlaufende Porenschlüsse (Abb. 11B). Die Zeiten zwischen Porenöffnung und -schluss sind äußerst variabel. Es stellte sich die Frage, ob die langsamen Porenschlüsse eine aktive Zelleistung darstellen und die schnellen Porenschlüsse auf passiven, physikochemischen Eigenschaften der Zellmembran

oder auf Konformationsänderungen der LLO-Moleküle selbst beruhen. Es wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass sich die Lipid-LLO-Komplexe von der Zelle ablösen könnten, wie von Gilbert (2002) für das CDTX Pneumolysin berichtet wurde.

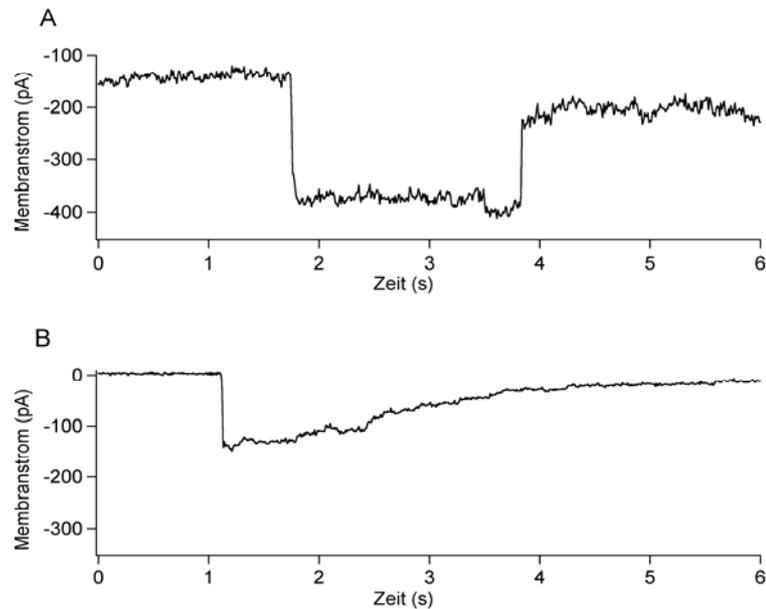


Abb. 11: Schneller (A) und langsamer (B) Porenschluss von zwei typischen LLO-Poren Applikation von 50 μ l KÜ. Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV.

Eine weitere Hypothese ist, dass bei den langsamen Porenschlüssen eine Aufnahme der porenbildenden Lipid-LLO-Komplexe durch Endozytose stattfinden kann (Butler 2005). Hierbei kommen prinzipiell alle bekannten Endozytoseprozesse in Betracht, wie Phagozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose als auch Makropinozytose, sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (Übersicht bei Conner & Schmid 2003). Diese Prozesse sind energieabhängig, wobei die Zelle bei der Polymerisation der für die Endozytose notwendigen Proteine ATP hydrolysiert.

Es wurden nun die Versuchsbedingungen variiert, um Rückschlüsse auf die Ursachen der Porenschlüsse ziehen zu können. Es wurde jeweils getestet, ob die Anzahl der Porenschlüsse niedriger ausfällt als zu erwarten ist und, ob das Verhältnis von langsamen zu schnellen Porenschlüssen verändert ist. Die Ergebnisse dieser Berechnungen und die Rohwerte befinden sich in Tab. 3 und 4. In Tabelle 4 wurden die Ergebnisse jeweils mittels des χ^2 -Tests mit der Kontrolle verglichen. Die Vorgehensweise bedingt zwar eine Fehlerinflation durch multiples Testen, wurde aber trotzdem gewählt, um bei der geringen Datenmenge

Hypothesen zu generieren und nicht um eine konfirmatorische Datenanalyse durchzuführen. Es wurde deshalb auf die Bonferoni-Korrektur verzichtet.

Die LLO-Konzentration bei den folgenden Experimenten betrug 1,2 ng/ml, da bei dieser Konzentration mehr Porenschlüsse zu beobachten sind als bei höheren Konzentrationen. Es schließen sich die Hälfte der gebildeten Poren (Tab. 4) und es besteht ein ausgeglichenes Verhältnis von langsamen zu schnellen Porenschlüssen (Tab. 4). Diese Werte dienten als Kontrolle. Es sollte nun untersucht werden, ob diese beiden Messwerte (Anzahl an Porenschlüssen und Verhältnis langsamer zu schnellen Porenschlüssen) durch Modifikation einzelner Parameter wie ATP-Versorgung, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration oder durch Blockade möglicher an der Endozytose beteiligten Proteine, verändert werden können.

3.3.2 Änderung der intrazellulären ATP Konzentration

Im Whole-Cell Modus wird die ATP-Konzentration beim Austausch des Zytoplasmas durch die Pipettenlösung verdünnt. Im ersten Ansatz wurde eine Pipettenlösung mit 5 mM ATP versetzt, um die ATP Versorgung der Zelle zu gewährleisten. In einem zweiten Ansatz wurden alle HEK-293 Zellen eine Stunde in glucosefreier Extrazellulärlösung bei 22° C inkubiert, um die Energiereserven zu reduzieren.

Um die Fehlerquote bei multiplem Testen zu reduzieren, wurden die Werte aus den ATP-Experimenten direkt miteinander verglichen und nicht gegen die Kontrolle getestet. Es zeigte sich, dass sich durch Verarmung an ATP im Vergleich zu intrazellulärer Versorgung der Zellen mit 5 mM ATP die Zahl der Porenschlüsse sowie das relative Verhältnis von langsamen zu schnellen Porenschlüssen unverändert war (Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich der Porenschlüsse unter verschiedenen ATP-Konzentrationen

Experiment	Porenschlüsse /Porenbildung	Verhältnis Schnelle/ Langsame Porenschlüsse	Chi ² -Ergebnis Anzahl der Porenschlüsse	Chi ² -Ergebnis Verhältnis Schnell/ langsam
5 mM ATP	17/29	7/10		
ATP-verarmt	24/43	13/11	0,01	0,67

3.3.3 Inhibition zytoskelettaler Proteine, die an der Endozytose beteiligt sind

Es existieren mehrere Inhibitoren der Polymerisation der zytoskelettalen Proteine, die an der Endozytose beteiligt sind. In den nächsten Versuchen wurde untersucht, ob diese Inhibitoren die Zahl an Porenschlüssen oder das Verhältnis von langsamen zu schnellen Porenschlüssen ändern können. Phenylarsinoxid hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose. HEK-293 Zellen wurden mit 10 μM für 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Cytochalasin D wirkt als Inhibitor der Aktin-Polymerisation und hemmt die Caveolin-abhängige Endozytose und Phagozytose. HEK-293 Zellen wurden mit 10 μM für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nocodazol als Inhibitor der Tubulin-Polymerisation wurde ebenfalls eingesetzt. Mikrotubuli sind vor allem beim Transport endozytotischer Vesikel beteiligt (Löffler & Petrides 1999). HEK-293 Zellen wurden mit 10 μM für 30 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Es zeigte sich bei keinem der Inhibitoren signifikante Änderungen der Häufigkeit der Porenschlüsse oder des Verhältnisses von langsamen zu schnellen Porenschlüssen im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 4).

3.3.4 Nominell Ca^{2+} -freie Intrazellulärlösung

Ca^{2+} nimmt in der Regulation der Zellphysiologie eine zentrale Rolle ein. Es wurde bereits gezeigt, dass bei Applikation von LLO auf HEK-293 Zellen Ca^{2+} -Ionen in die Zellen einströmen (Repp et al. 2002) und dass die Zahl der langsamen Porenschlüsse in Ca^{2+} -freiem Medium reduziert ist (Butler 2005).

HEK-293 Zellen wurden mit 2 verschiedenen Intrazellulärlösungen gemessen. Dies war zum einen die Standardlösung IBL₁₀₀ als Kontrolle mit 100 nM freier Ca^{2+} -Konzentration (Kontrolle in Tab. 4), zum anderen eine Ca^{2+} -freie, stark BAPTA-gepufferte Intrazellulärlösung I_{10B}, bei der das durch LLO-Poren einströmende Ca^{2+} abgepuffert wird und daher die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht ansteigt (Ca^{2+} -frei in Tab. 4). Bei Ca^{2+} -freier Intrazellulärlösung fand sich bei normaler Zahl an Porenschlüssen eine signifikante Abnahme von langsamen Porenschlüssen gegenüber der Kontrolle (Tab. 4).

3.3.5 LLO-induzierte Porenbildung im Outside-Out Patch

Outside-Out Patches sind eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob Porenschlüsse eine eigenständige Zelleistung oder einen passiven Prozess darstellen. Outside-Out Patches sind, wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben wurde, eine Möglichkeit, ein zellfreies Membranstück elektrophysiologisch zu untersuchen. Durch Bestimmung der Membrankapazität konnte die ungefähre Größe der Membranstückes in Relation zur Membranoberfläche einer Zelle in der Whole-Cell Messkonfiguration bestimmt werden. Die gemessene Kapazität der Outside-Out Patches betrug $0,3 \pm 0,1$ nF (n=5) (spezifische Membrankapazität = $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) entsprechend einer Fläche von $30 \mu\text{m}^2$. Zum Vergleich betrug die Kapazität der ganzen Zelle $12,4 \pm 3,6$ nF (n=5) entsprechend $1200 \mu\text{m}^2$.

Im Outside-Out Patch dürften, die in Abschnitt 3.3.2 genannten Endozytose-Mechanismen nicht möglich sein, da das Membranstück vom Zytoskelett abgetrennt ist, welches ebenfalls für die Endozytose wichtig sein könnte.

Abbildung 12 zeigt, dass sich Poren im Outside-Out Patch sowohl bei Zugabe von LLO in einer Konzentration von 10 ng/ml (n=3) als auch bei Zugabe von Bakteriensuspensionen (n=13) bilden und elektrophysiologisch nachweisen lassen. Die höhere Toxinkonzentration war nötig, um bei der kleineren Oberfläche des Membranpatches die Wahrscheinlichkeit für die LLO-induzierte Porenbildung zu erhöhen.

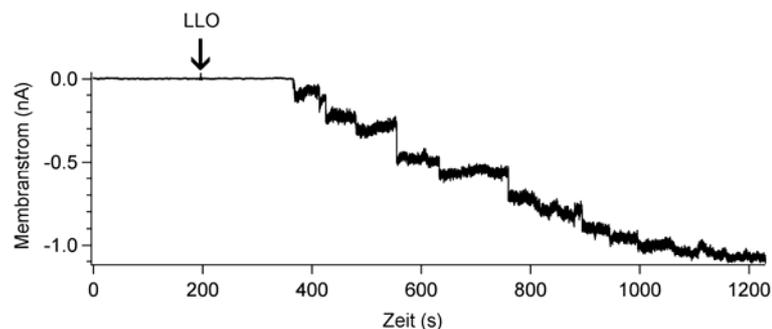


Abb. 12: LLO-induzierte Porenbildung im Outside-Out Patch einer HEK-293 Zelle
Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO. Nach einer Latenz von 170 s bilden sich Poren.
Messung an einem Outside-Out Patch einer HEK-293 Zelle bei einem Membranpotential von -50 mV.

In der Outside-Out Messkonfiguration finden sich im Vergleich zu den Kontrollmessungen signifikant seltener Porenschlüsse als in der Kontrolle (Tab. 4).

Schnelle Porenschlüsse wurden bei der geringen Anzahl an Porenschlüssen signifikant häufiger registriert als langsame Porenschlüsse.

Die Verteilung der Porenstromamplituden entspricht den Beobachtungen im Whole-Cell Modus (Butler 2005). Es findet sich aufgrund der höheren Toxinkonzentrationen ein erstes Maximum bei 45 pA (Abb. 13).

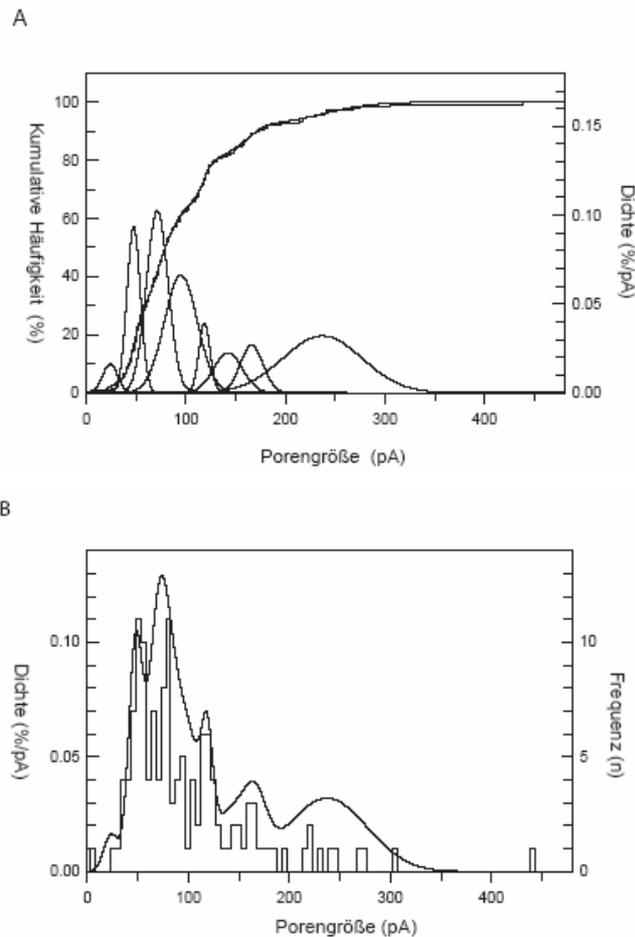


Abb. 13: Häufigkeitsverteilung der Amplituden der LLO-Porenströme im Outside-Out Patch (**A**) Aus der kumulativen Häufigkeit wurden die einzelnen Häufigkeitsgipfel bestimmt. (**B**) zeigt die Anzahl der Porenströme in 5 pA Schritten mit einer umhüllenden Kurve der einzelnen Häufigkeitsgipfel.

Messung an Outside-Out Patches von HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV. LLO-Konzentration 10 ng/ml

3.3.6 LLO-induzierte Porenbildung im Inside-Out Patch

Mit dem Inside-Out Patch wurde eine weitere Patch-Clamp Konfiguration genutzt, um zu prüfen, ob LLO von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran her Poren induzieren kann. Die Membrankapazität der Inside-Out Patches betrug $0,03 \pm 0,01$ nF ($n=4$). Daraus konnte die ungefähre Membranfläche mit $2,7 \mu\text{m}^2$ abgeschätzt werden. Diese ist um den Faktor 12 kleiner als Outside-Out Patches

und um den Faktor 500 kleiner als die Membranoberfläche in Whole-Cell Messkonfiguration. Applikation von LLO in einer Konzentrationen von 100 ng/ml führte in Inside-Out Patches (n=10) zu Porenbildung (Abb. 14). Die hohen Konzentrationen waren nötig, um die Wahrscheinlichkeit der Porenbildung an diesen kleinen Membranpatches zu erhöhen. Durch die hohe LLO-Konzentration (100 ng/ml) treten die LLO-Poren in schneller Folge auf.

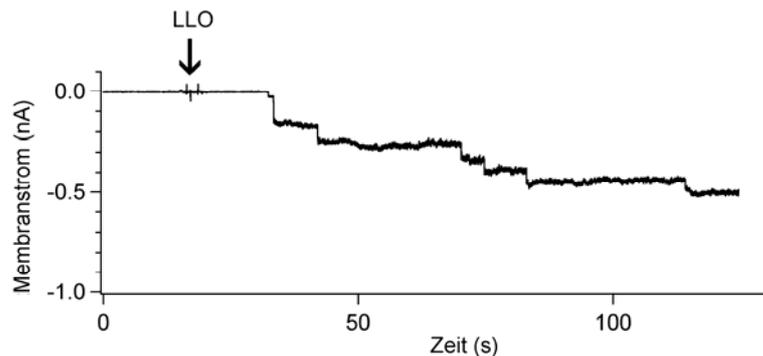


Abb. 14: Porenbildung durch LLO bei einem Inside-Out Patch einer HEK-293 Zelle
Pfeil: Applikation von 100 ng/ml LLO. Nach einer Latenz von 20 s bilden sich Poren.
Messung an einem Inside-Out Patch einer HEK-293 Zelle bei einem Membranpotential von -50 mV.

In der Inside-Out Konfiguration konnten keine Porenschlüsse beobachtet werden (Tab. 4). Die Experimente im Inside-Out Patch beweisen, dass LLO in der Lage ist, Poren von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran her zu bilden.

Tab. 4: Vergleich der Porenschlüsse unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Experiment	Porenschlüsse /Porenbildung	Verhältnis Schnelle/ Langsame Porenschlüsse	Chi ² -Ergebnis Anzahl der Porenschlüsse	Chi ² -Ergebnis Verhältnis Schnell/ langsam
Kontrolle	59 / 125	27/32		
Phenylarsinoxid	14/26	8/6	0,13	0,59
Cytochalasin D	35/60	21/14	0,64	1,78
Nocodazol	55/103	33/22	0,29	2,31
Ca ²⁺ -frei	67/134	51/16	0,07	12,25 *
Outside-Out	15/235	12/3	50,91 **	5,62 *
Inside-Out	0/33	0/0	14,53 *	

signifikant gegenüber der Kontrolle * (p< 0,05) ** (p< 0,001)

3.4 Screening auf blockierende Substanzen der LLO-Porenströme

3.4.1 Experimentelles Vorgehen

Listeriolysin O spielt eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Listerieninfektion. Ideal wäre es, eine Substanz an der Hand zu haben, die selektiv LLO inhibieren bzw. eine porenbildende Wirkung verhindern oder vorhandene Poren schließen kann. Zum Screening wurden zuerst Substanzen ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie Ionenkanäle blockieren. Dies geschah in der Hoffnung, dass Ionenkanal-blockierende Pharmaka aufgrund eventueller struktureller Ähnlichkeit der Ionenkanäle mit den LLO-Poren zu einer Blockade führen. Ein Schwerpunkt wurde auf bereits zugelassene Pharmaka gelegt, da diese im Falle einer erfolgreichen Testung als „off-label-use“ direkt eingesetzt werden könnten. Zur Testung wurden HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV verwendet. 50 µl KÜ wurden zur Porenbildung verwendet. 10 - 20 s nach der zweiten eindeutigen LLO-induzierten Porenbildung wurde die Testsubstanz appliziert. Es wurde darauf geachtet, ob sich die Poren schließen, oder die weitere LLO-induzierte Porenbildung gestoppt wird. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt (n=2 für jede Messung).

Tab. 5: Substanzliste und Effekt

Na⁺-Kanalblocker

Testsubstanz	Konzentration (µM)	Effekt
Amiloridhydrochlorid	100	Kein Effekt
Procainamid	100	Kein Effekt
Succinylbischolin	100	Kein Effekt

Ca²⁺-Kanalblocker

Nifedipin	100	Kein Effekt
Verapamil	100	Kein Effekt
Trifluoperazin	100	Kein Effekt

K⁺-Kanalblocker

Charybdotoxin	0,1	Kein Effekt
Iberiotoxin	0,3	Kein Effekt

Margatoxin	0,3	Kein Effekt
------------	-----	-------------

NMDA-Rezeptor Antagonisten

Amantadin	100	Kein Effekt
Ketamin	100	Kein Effekt

n-/m-Acetylcholin-Rezeptor Antagonisten

Biperiden	16	Keine weitere Porenbildung
Cisatracurium	100	Kein Effekt
d-Tubocurarin	100	Kein Effekt

Pumpen/ATPasen-Blocker

Furosemid	100	Keine weitere Porenbildung
Fluoxetin	0,16	Kein Effekt
Mirtazapin	10	Kein Effekt
Digoxin	0,64	Kein Effekt

Histamin-Rezeptor Antagonisten

Promethazin	100	Kein Effekt
Dimetinden	100	Kein Effekt

Inhibitoren der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung

Certoparin	3000 IE/ml	Kein Effekt
Dantrolen	55	Kein Effekt

Metalle

Lithiumchlorid	100	Kein Effekt
Manganchlorid	100	Kein Effekt
Wismutchlorid	100	Kein Effekt
Natriumaurothiomalat	10	Kein Effekt

Farbstoffe

Brilliant-Grün	100	Kein Effekt
Fuchsin	100	Kein Effekt

Gentianaviolett	100	Kein Effekt
Sonstige		
Diazepam	100	Keine weitere Porenbildung
Erythromycin	100	Kein Effekt
Nifluminsäure	250	Kein Effekt
Phenobarbital	100	Keine weitere Porenbildung
Strychnin	100	Kein Effekt
Terbutalin	2200	Kein Effekt
Cromoglycinsäure	100	Kein Effekt
Ergotamin	42,5	Keine weitere Porenbildung
Pentoxifyllin	100	Kein Effekt
Pirfenidon	1000	Kein Effekt
Lysin-acetylsalicylat	100	Kein Effekt

Die Substanzen Biperiden, Diazepam, Ergotamin, Furosemid, und Phenobarbital schienen die weitere Porenbildung zu verhindern. Um zu überprüfen, ob es sich um spezifische Effekte dieser Substanzen handelte, wurden die HEK-293 Zellen mit diesen Substanzen vorinkubiert und anschließend LLO appliziert. Keine der oben genannten Substanzen verhinderte bei Vorinkubation die LLO-induzierte Porenbildung (jeweils n=2).

3.5 Blockade der LLO-Porenströme durch Lanthanoide

Im Rahmen des Screenings erwiesen sich die Lanthanoide als wirksame Blocker der LLO-Poren. Abbildung 15A zeigt, dass LLO-Poren durch 100 μM Gadolinium (Gd^{3+}) sofort und vollständig blockiert werden. In den Outside-Out Patches (Abb. 15B) und Inside-Out Patches (Abb. 15C) werden die LLO-Poren ebenfalls durch Gd^{3+} blockiert.

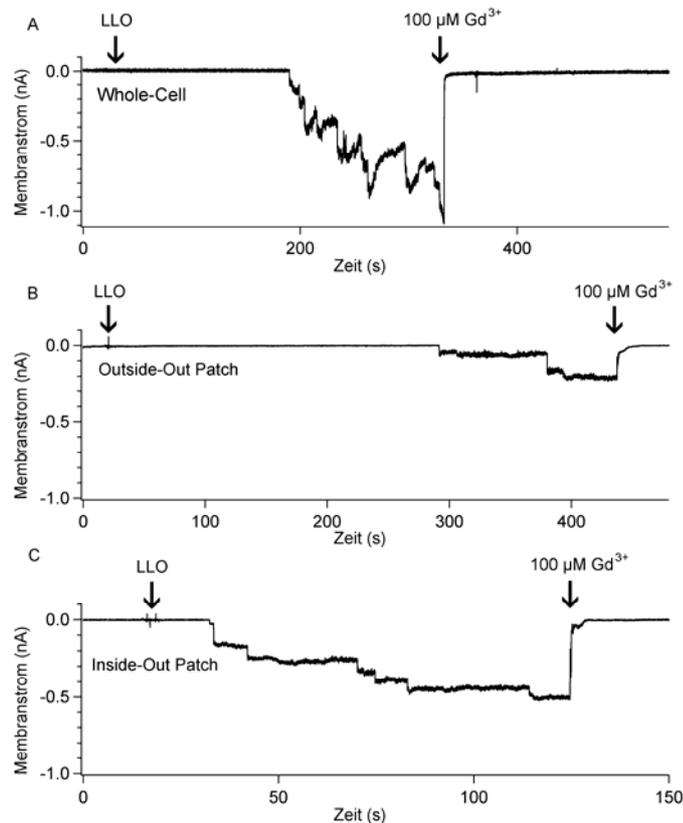


Abb. 15: Blockade eines LLO-induzierten Porenstroms durch Gd^{3+} (**A**) im Whole-Cell Ableitungsmodus (**B**) im Outside-Out Patch und (**C**) im Inside-Out Patch einer HEK-293 Zelle. 1. Pfeil: Applikation des LLO (**A**) 5 ng/ml (**B**) 10 ng/ml und (**C**) 100 ng/ml. Die Porenbildung wurde abgewartet. 2. Pfeil: Applikation von $100 \mu M Gd^{3+}$. Messungen an HEK-293 Zellen bzw. an Membranpatches aus diesen Zellen bei einem Membranpotential von $-50mV$.

3.5.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der LLO-Porenstromblockade

Um knapp verfügbares LLO zu sparen, wurden in den Experimenten dieses Abschnittes die LLO-Porenströme mit $50 \mu l$ KÜ induziert (Abschnitt 2.3.3). Die porenbildende Wirkung dieses Überstandes entspricht ungefähr der porenbildenden Wirkung von 5 ng/ml LLO (vgl. Abb. 15A). Nach Anstieg des Membranstroms auf etwa -1 nA wurden die jeweiligen Lanthanoid (Ln^{3+})-Stammlösungen in die Extrazellulärlösung appliziert. Abbildung 16 zeigt Konzentrations-Wirkungskurven für die Blockade der LLO-Porenströme durch die verschiedenen Lanthanoide. Die Ln^{3+} unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihres IC_{50} -Wertes (Tab. 6), wobei Lanthan (La^{3+}), das ganz links in der Periode der Ln^{3+} steht, einen um den Faktor 6 kleineren IC_{50} -Wert aufweist als Ytterbium (Yb^{3+}), das rechts in der Periode der Ln^{3+} steht. Der Hill-Koeffizient dagegen hat für alle drei Lanthanoide ungefähr den gleichen Wert von 1. Dies macht eine 1:1 Wechselwirkung zwischen den LLO-Poren und den Lanthanoiden wahrscheinlich.

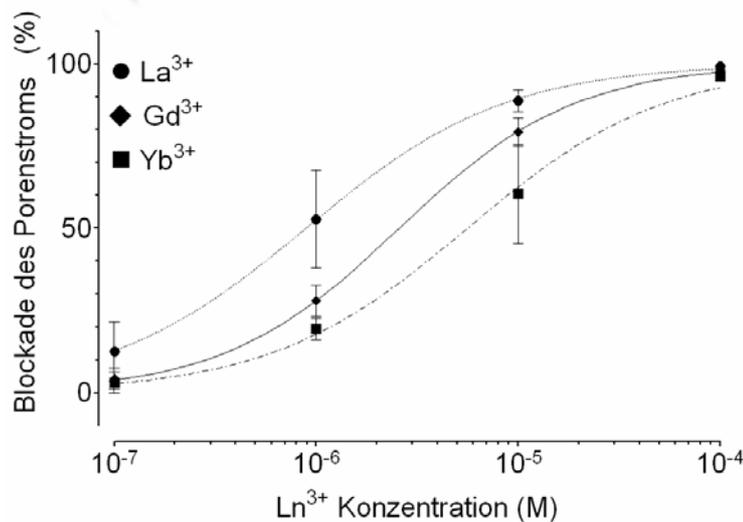


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die Blockade der LLO-Porenströme durch die Lanthanoide

Gemessen wurde der blockierte Anteil y des Porenstroms in % des Ausgangsstroms vor Applikation des Lanthanoids. Die Hill Gleichung $y = 100 / \left(1 + \left(\frac{IC_{50}}{c} \right)^n \right)$ wurde mittels des

Least-Square-Fit Verfahrens an die Messpunkte angepasst, wobei IC_{50} die Konzentration ist, bei der 50 % des Stroms blockiert werden, n der Hill Koeffizient und c die eingesetzte Ln^{3+} -Konzentration sind. LLO-Konzentration 50 μ L KÜ ($n=3$ für jeden Messpunkt).

Tab. 6: IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten n der verschiedenen Lanthanoide zur Blockade der LLO-Porenströme

Ln^{3+}	IC_{50} -Wert	Hill-Koeffizient n
La^{3+}	$0,90 \pm 0,09 \mu$ M	$0,88 \pm 0,01$
Gd^{3+}	$2,6 \pm 0,1 \mu$ M	$0,99 \pm 0,02$
Yb^{3+}	$5,6 \pm 0,5 \mu$ M	$0,89 \pm 0,06$

Die IC_{50} -Werte der Ln^{3+} unterscheiden sich untereinander signifikant $p < 0,01$

Der Ionenradius der Ln^{3+} verkleinert sich in ihrer Periode von links nach rechts. Diese Reduktion der Ionenradien tritt bei der Füllung der 4f Elektronenschale in der 5. Periode auf. Die inneren 4f Elektronen werden von äußeren Schalen nicht beeinflusst und von der positiven Ladung des Atomkerns angezogen. Durch die Anziehung der Elektronen durch den Kern reduziert sich der Radius des gesamten Ions (Holleman-Wiberg 1995). Trägt man nun den Ionenradius der Lanthanoide gegen die IC_{50} auf, so ergibt sich Abb. 17. Die Zunahme der inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) korreliert mit den zunehmenden Ionenradien der Lanthanoide.

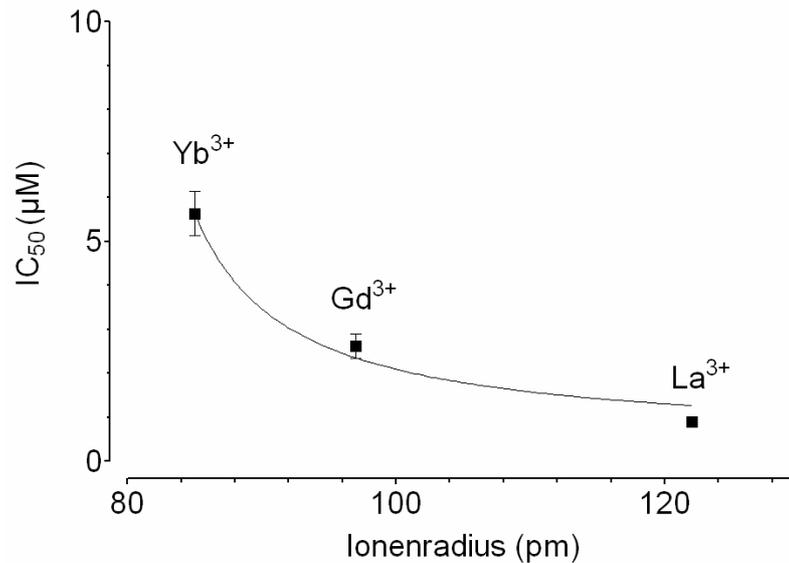


Abb. 17: Inhibitorische Konzentration IC_{50} der Lanthanoide La^{3+} , Gd^{3+} und Yb^{3+} zur Blockade der LLO-induzierten Porenströme in Abhängigkeit von ihrem Ionenradius. IC_{50} -Werte aus Tab. 6.

3.5.2 Hemmung der LLO-induzierten Hämolyse durch La^{3+}

Klassischerweise wird die hämolytische Aktivität der CDTX mit dem Hämolyse-Titer-Test bestimmt. Es sollte nun überprüft werden, ob La^{3+} auch die hämolytische Aktivität von LLO inhibieren kann. Tabelle 7 zeigt das Ergebnis des Hämolyse-Titer-Tests. Es wurde eine Erythrozytensuspension von 0,5 % (v/v) auf eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde LLO in absteigenden Konzentrationen von 1,25 µg/ml bis 1,25 ng/ml dazu pipettiert. Diese Konzentrationen umfassen auch den in den Patch-Clamp Experimenten verwendeten Konzentrationsbereich (1,25 ng/ml - 12,5 ng/ml).

Tab. 7: Aufhebung der hämolytischen Aktivität von LLO durch La^{3+}

Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100 µM La^{3+}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LLO-Konzentration (ng/ml)	1250	625	312	166	78	39	20	10	5	2,5	1,25

In der Verumreihe wurde 100 µM La^{3+} zugegeben. Bei der 0,5 %igen Erythrozytensuspension ist bereits in der Titrationsstufe 1:8 (4. von links) der

Ausgangskonzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ mit La^{3+} keine Hämolyse mehr zu beobachten ist. Dies entspricht 166 ng/ml LLO.

3.5.3 Blockade des LLO-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in HEK-293 Zellen durch Gd^{3+}

Nachdem die Blockade der LLO-Porenströme durch Lanthanoide gezeigt werden konnte, war die nächste Frage, ob auch der LLO-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in HEK-293 Zellen durch Lanthanoide blockiert wird. In einer Arbeit von Uhlen et al. (2000) wurde für *E.coli* α -Hämolysin behauptet, dass Ca^{2+} durch endogene Ca^{2+} -Kanäle und nicht durch die α -Hämolysin-induzierten Poren in das Zytoplasma einströmt. Als Beispielsubstanz für die Lanthanoide wurde im Weiteren Gd^{3+} verwendet, da es als Röntgenkontrastmittel in der Medizin die weiteste Verbreitung hat und deswegen den genauesten toxikologischen Untersuchungen unterzogen wurde. Für die folgenden Experimente wurden hSK4-exprimierende HEK-293 Zellen ausgewählt. Der hSK4 K^+ -Kanal ist ein spannungsunabhängiger, Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanal, der aktiviert wird, wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Dies geschieht auch, wenn LLO-Porenströme in der Membran auftreten (Abb. 18A). Kurz nach Öffnung der LLO-Pore (Abb. 18A Inset) kommt es zu einem Netto-Einwärtsstrom von Na^+ und Ca^{2+} . Daraufhin sieht man einen schnell ansteigenden Auswärtsstrom, der durch die hSK4-Kanäle getragen wird. Diese K^+ -Kanäle sind für 2 min transient aktiv. Der transiente K^+ -Auswärtsstrom zeigt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an. Während der Aktivierung sind keine weiteren Porenöffnungen zu sehen, da diese vom hohen K^+ -Auswärtsstrom überdeckt sind. Nach der Inaktivierung des K^+ -Auswärtsstroms bleibt ein LLO-induzierter Netto-Einwärtsstrom.

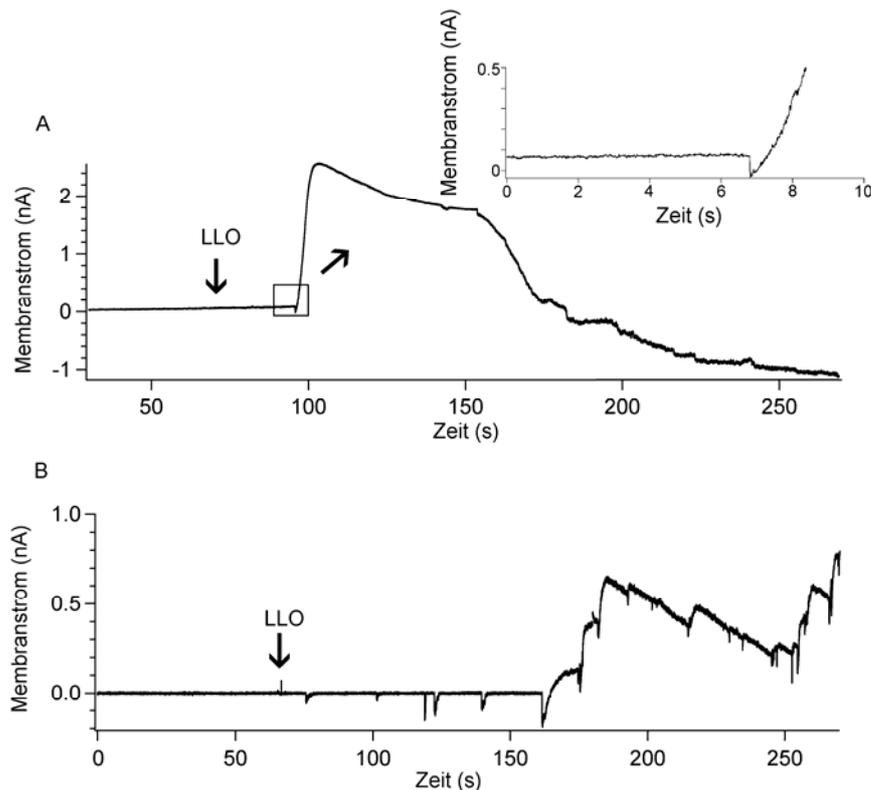


Abb. 18: LLO-induzierte Poren aktivieren spannungsunabhängige und Ca^{2+} -abhängige hSK4 K^+ -Kanäle in HEK-293 Zellen.

A: Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO induziert Poren nach einer Latenz von 30 s und aktiviert die hSK4 K^+ -Kanäle. Im Inset ist die Aktivierung der K^+ -Kanäle direkt nach Porenbildung zu sehen.

B: Vorinkubation mit 100 μM Gd^{3+} . Pfeil: Applikation von LLO (10 ng/ml LLO). Nach einer Latenz von 10 s beginnen die Porenöffnungen. Nach einigen Poren kommt es zur Aktivierung der hSK4 K^+ -Kanäle. **A** und **B** Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV.

hSK4-exprimierende HEK-293 Zellen wurden mit 100 μM Gd^{3+} in der Extrazellulärlösung inkubiert und anschließend 10 ng/ml LLO appliziert. Abbildung 18 B zeigt, dass sich zunächst einzelne LLO-Poren öffnen, diese jedoch innerhalb von Sekunden durch Gd^{3+} -Ionen wieder verschlossen werden. Die Ca^{2+} -Menge reicht noch nicht aus, um hSK4-Kanäle in der Umgebung der LLO-Poren zu aktivieren. Erst die 6. Porenbildung, deren Amplitude sehr groß ist (200 pA), ist in der Lage genügend Ca^{2+} in die Zellen einströmen zu lassen um die hSK4-Kanäle zu aktivieren. Der Stromanstieg ist deutlich langsamer als in Abb. 18A. Weitere Porenbildungen erhöhen den K^+ -Auswärtsstrom. Erhöht man die Gd^{3+} -Konzentration auf 1 mM, kommt es zu keiner Aktivierung der hSK4 K^+ -Kanäle ($n=3$), da der Ca^{2+} -Einstrom in die hSK4-exprimierenden HEK-293 Zellen vollständig blockiert ist.

3.5.4 Reversibilität der durch Lanthanoide blockierten LLO-Poren

3.5.4.1 Auswaschen von Gd^{3+} hebt die Blockade der LLO-Porenströme auf.

Die Wirkung des Gd^{3+} auf die LLO-Porenströme ist reversibel. Mittels der in Abschnitt 2.6.5 beschriebenen Badperfusionsanlage konnte durch Superfusion einer HEK-293 Zelle mit LLO- und Gd^{3+} -freier Extrazellulärlösung die blockierende Wirkung des Gd^{3+} auf die LLO-Porenströme aufgehoben wird (Abb. 19). Es sind erneut Porenöffnungen und -schließungen zu sehen. Der Porenstrom erreicht jedoch nicht die Ausgangsstromamplitude vor Gd^{3+} -Applikation. Es ist möglich, dass die Superfusion nicht alle Gd^{3+} -Ionen entfernt.

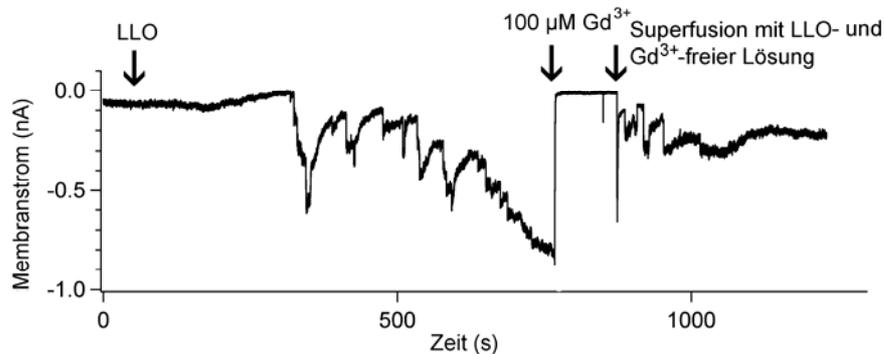


Abb. 19: Reversibilität der Gd^{3+} -Blockade der LLO-Porenströme durch Superfusion mit LLO- und Gd^{3+} -freier Extrazellulärlösung

1. Pfeil: Applikation von 1,2 ng/ml LLO. Die Porenbildung wurde abgewartet.
2. Pfeil: Blockade durch 100 μM Gd^{3+} . 3. Pfeil: Nach weiteren 100 s wurde die Zelle mit LLO- und Gd^{3+} -freier Extrazellulärlösung superfundiert. Messung an einer HEK-293 Zelle bei einem Membranpotential von -50mV.

3.5.4.2 EDTA hebt die Blockade der LLO-Porenströme durch Gd^{3+} auf.

EDTA (Ethyldiamin-tetraacetic acid) ist ein Chelator, der eine hohe Affinität für di- und trivalente Kationen besitzt. EDTA wird deshalb bei Schwermetall-Intoxikationen in der Medizin wie z. B. bei Blei-Intoxikation zur Bindung und Elimination des Metalls aus dem Körper eingesetzt. EDTA hat eine höhere Affinität für die Lanthanoide als für andere Ionen in der Extrazellulärlösung. So beträgt die Dissoziationskonstante für Gd^{3+} -EDTA $10^{-17,2}$ M (Sillaen et al. 1964), die für Ca^{2+} hingegen nur $10^{-10,6}$ M und für Mg^{2+} $10^{-8,6}$ M (Forth et al. 2001). Es werden also nahezu alle Gd^{3+} -Ionen durch die EDTA-Moleküle gebunden. Abbildung 20 zeigt, dass nach Blockade der LLO-Porenströme durch Zugabe von 100 μM EDTA die Porenströme wieder auftreten ($n=6$). Bei 3 Messungen bei einer EDTA-Konzentration von 100 μM überstieg der Membranstrom sogar den Ausgangsstrom vor Blockade. Ursache könnte sein, dass sich zusätzlich neue

Poren bilden können, weil im EDTA-Experiment die LLO-Konzentration in der Extrazellulärlösung unbeeinflusst bleibt.

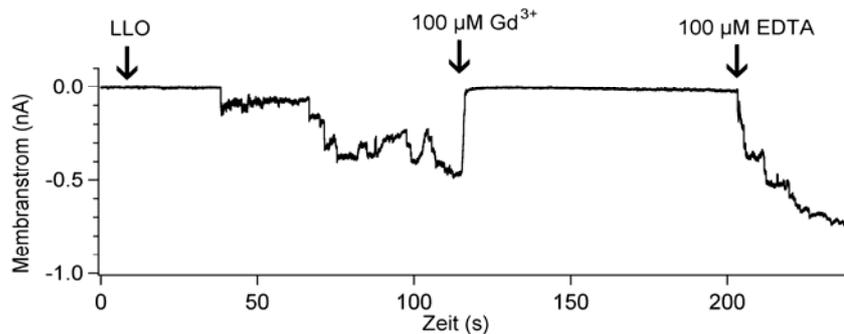


Abb. 20: Einfluss von EDTA auf die Blockade der LLO-Porenströme durch Gd³⁺
 1. Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO 2. Pfeil: Blockade durch 100 μM Gd³⁺.
 Nach 90 s 3. Pfeil: Applikation von 100 μM EDTA.
 Messung an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV.

Abbildung 21 zeigt die Konzentrationswirkungskurve der Deblockade Gd³⁺-blockierter LLO-Porenströme durch EDTA. Die EC₅₀ beträgt 21,7 ± 0,1 μM, bei einem Hill-Koeffizienten von 2,2 ± 0,1. Aus der Literatur ist aber bekannt, dass ein Gd³⁺-Ion pro EDTA Molekül gebunden wird. Bei 3 Messungen war, wie oben erwähnt, der Membranstrom nach Applikation von 100 μM EDTA höher als die Ausgangsstromamplitude. Dadurch ergeben sich bei dem 100 μM Messpunkt zu hohe Mittelwerte, wodurch die Kurve steiler und der Hill-Koeffizient mit > 1 zu hoch bestimmt wurde.

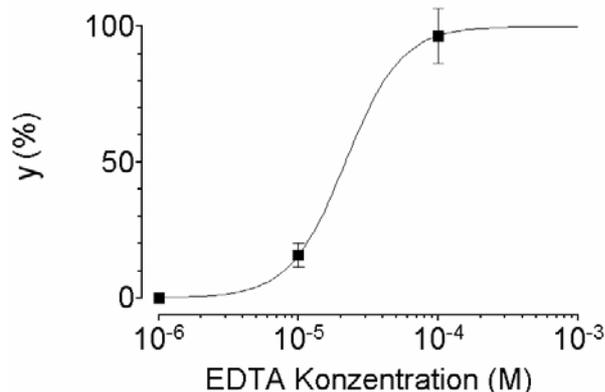


Abb. 21: Konzentrations-Wirkungskurve der Deblockade Gd³⁺-blockierter LLO-Porenströme durch EDTA

Die LLO-Porenströme wurden zu Beginn mit 100 μM Gd³⁺ blockiert. Der deblockierte LLO-Porenstrom y ist in % des Porenstroms vor Gd³⁺-Applikation (Ausgangsstrom) auf der Ordinate dargestellt. Die Hill Gleichung $y = 100 / \left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{c} \right)^n \right)$ wurde mittels des Least-Square-Fit Verfahrens

an die Messpunkte angepasst, wobei EC₅₀ Konzentration ist, bei der 50 % des Stroms deblockiert werden, n der Hill Koeffizient und c die eingesetzte EDTA-Konzentration sind.

Der EC₅₀-Wert beträgt 21,7 ± 0,1 μM, Hill Koeffizient n = 2,2 ± 0,1.

LLO-Konzentration 5 ng/ml (n=3 für 1 und 10 μM EDTA n=6 für 100 μM EDTA).

Alleinige Applikation von 100 μM des Chelators EDTA auf HEK-293 Zellen führten zu keiner Porenbildung ($n=3$). Der pH-Wert der applizierten EDTA-Lösung betrug 5,3 führte zu keiner Veränderung des pH-Wertes der Extrazellulärlösung.

Auch andere Chelatoren wie DTPA (Diethylenamintriaminpenta-acetat) und EGTA (Ethylen-glycol bis(β -Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetra-acetat) waren in äquimolaren Konzentrationen in der Lage die LLO-Poren nach Blockade durch Gd^{3+} wieder zu eröffnen.

3.5.4.3 Neonatales Kälberserum eröffnet Gd^{3+} -blockierte LLO-Poren.

Albumin als wichtigstes Serumprotein bindet freie Ionen. Es ist bekannt das Lanthanoide im Serum an Albumin gebunden werden (Schomacker et al. 1988). So könnten auch Gd^{3+} -Ionen gebunden werden und die Blockade der LLO-Poren aufgehoben werden. Abbildung 22 demonstriert dies deutlich.

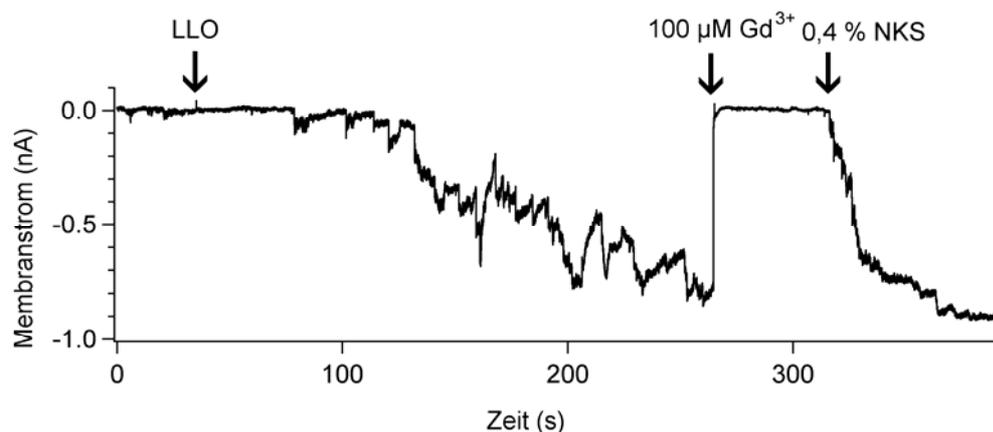


Abb. 22: Neonatales Kälberserum (NKS) hebt die Gd^{3+} -Blockade der LLO Poren wieder auf.
 1. Pfeil: Applikation von 10ng/ml LLO. Die Porenbildung wurde abgewartet.
 2. Pfeil: Applikation von 100 μM Gd^{3+} .
 Nach 50 s 3. Pfeil Applikation von 0,4 %igem neonatalem Kälberserum (NKS).
 Messung an einer HEK-293 Zelle bei einem Membranpotential von -50mV.

Die Gd^{3+} -Blockade der LLO-Porenströme wird durch NKS konzentrationsabhängig mit einem EC_{50} -Wert von $0,22 \pm 0,03\%$ sofort wieder aufgehoben (Abb. 23). Auffallend ist der hohe Hill Koeffizient n von 2,8. Dies kann die gleichen Gründe haben wie bei EDTA im vorangegangenen Abschnitt, deutet jedoch daraufhin, dass mehrere Gd^{3+} -Ionen pro Albuminmolekül gebunden werden.

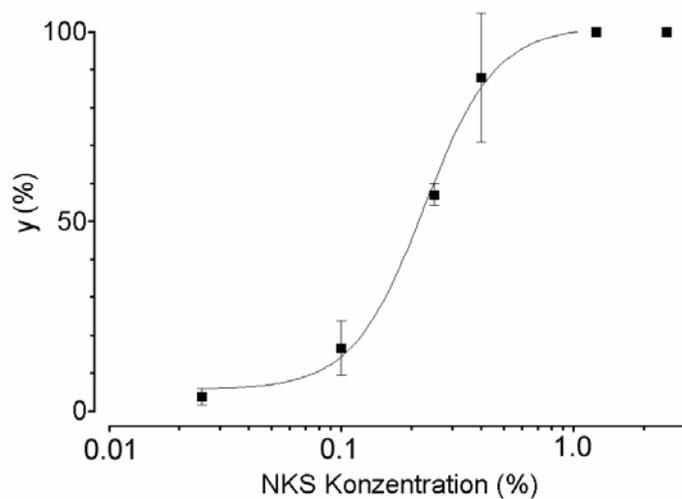


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungskurve für die Aufhebung der Gd^{3+} -Blockade von LLO-Porenströmen durch NKS.

Die LLO-Porenströme wurden zu Beginn mit $100 \mu M Gd^{3+}$ blockiert. Der deblockierte Porenstrom y ist in % des Porenstroms vor Gd^{3+} -Applikation (Ausgangsstrom) auf der Ordinate dargestellt.

Die Hill Gleichung $y = 100 / \left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{c} \right)^n \right)$ wurde mittels des Least-Square-Fit Verfahrens an die

Messpunkte angepasst, wobei EC_{50} die Konzentration ist, bei der 50 % des Stroms deblockiert werden, n der Hill Koeffizient und c die eingesetzte NKS-Konzentration sind.

Der EC_{50} -Wert beträgt $0,22 \pm 0,03\%$, Hill Koeffizient $n = 2,8 \pm 0,5$. LLO-Konzentration 5 ng/ml ($n=3$ für jeden Messpunkt).

3.5.4.4 Die Blockade der LLO-Porenströme durch Gd^{3+} ist abhängig vom Membranpotential

Bei Ionenkanal- bzw. Poren-blockierenden Substanzen, die geladen sind, stellt sich immer die Frage, ob diese Blockaden vom Membranpotential abhängig sind. Zu diesem Zweck wurden bei HEK-293 Zellen mit 5 ng/ml LLO Poren induziert und anschließend mit $50 \mu M Gd^{3+}$ blockiert. Diese Konzentration wurde verwendet, um die LLO-Poren nicht vollständig zu blockieren. Dann wurden bei den Zellen sequentiell positive und negative Membranpotentiale von $+30/-10$ und $+40/-30$ $+70/-50 \text{ mV}$ für jeweils 15 Sekunden pro Membranpotential angelegt.

In Abb. 24 zeigen sich zunehmend Porenöffnungen bei positiven Membranpotentialen und beim Wechsel auf negative Membranpotentiale ein Porenstrom dessen Amplitude innerhalb von 5 s durch Gd^{3+} -Blockade wieder abnimmt. Der Vorgang wird mit zunehmenden positiven und negativen Membranpotentialen deutlicher.

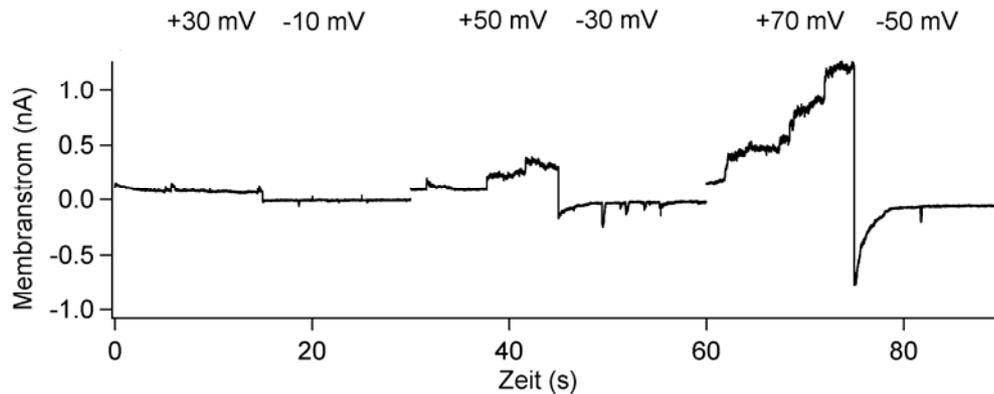


Abb. 24: Gd^{3+} -Blockade der LLO-Porenströme bei positiv-negativen Membranpotentialen
Vor Beginn der Messung wurden 5 ng/ml LLO appliziert und anschließend die LLO-Poren mit 50 μM Gd^{3+} blockiert, um einen fast vollständigen Block zu erreichen. Dann wurden abwechselnd positiv-negative Spannungspaare für jeweils 15 Sekunden angelegt.

Man unterscheidet zwischen einem Membranstrom direkt nach Änderungen des Membranpotentials auf einen neuen Wert („instantaneous Current“) und einem Membranstrom im Gleichgewicht („Steady-State Current“). Trägt man die Strom-Spannungsbeziehung für die „Steady-State currents“ auf, so zeigt sich bei negativen Membranpotentialen eine Blockade und bei positiven Membranpotentialen eine Deblockade der LLO-Poren (Abb. 25). Der „instantaneous current“ bei der Membranpotentialänderung von +70 auf – 50 mV ist ein „ohmscher“ Strom und hat ein Umkehrpotential von 0, wie man es bei dem unspezifischen LLO-Porenstrom erwartet.

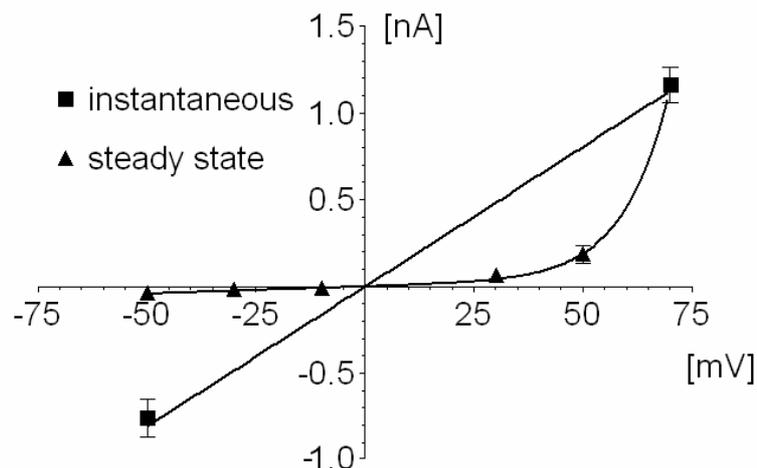


Abb. 25: Strom-Spannungsbeziehung des „instantaneous current“ und des „steady-state current“
Messungen an Hek-293 Zellen, LLO-Konzentration 5 ng/ml, Blockade mit 50 μM Gd^{3+} (Anzahl der Messungen n=6).

Um zu sehen, ob durch das positive Membranpotential bereits alle LLO-Poren deblockiert sind, wurde nun EDTA bei einem Membranpotential von +50 mV appliziert, um alle Gd^{3+} -Ionen zu binden (Abb. 26). Man erkennt einen deutlichen Anstieg des Membranstroms, der am Ende des +50mV Membranpotentialsprungs eine Amplitude von $1,9 \pm 0,3$ nA ($n=3$) hatte und damit signifikant höher war als bei +50 mV Membranpotential ohne EDTA, mit einer Amplitude von 186 ± 52 pA ($n=7$). Dies zeigt, dass nicht alle LLO-Poren bei +50 mV deblockiert werden, sondern der weitaus größere Teil der LLO-Poren bei positiven Potentialen blockiert bleibt.

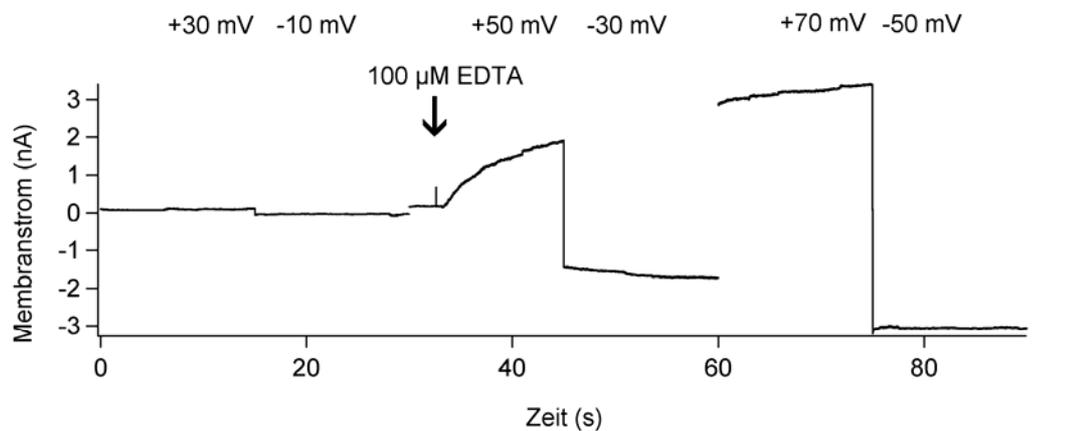


Abb. 26: EDTA-Applikation bei Gd^{3+} -blockierten LLO-Poren bei positiv-negativen Haltepotentialen. Vor Beginn der Messung wurden 5 ng/ml vermisch mit $50 \mu M Gd^{3+}$ appliziert, um einen fast vollständigen Block der LLO-Porenströme zu erreichen. Es wurde abgewartet bis sich bei -50 mV spontan Porenöffnungen zeigten. Pfeil: Applikation von $100 \mu M$ EDTA bei +50 mV. Messung an einer HEK-293 Zelle, LLO-Konzentration 5 ng/ml.

3.5.5 Porenschlüsse der LLO-Poren unter La^{3+}

Es wurden die Porenschlüsse der LLO-Poren unter Lanthan näher charakterisiert. Zuerst wurden die Porenschlüsse in „schnelle“ (Abb. 27A) und „langsame“ Schlüsse (Abb. 27B) eingeteilt. Diejenigen Poren, die sich innerhalb von 100 ms mit steilem Aufstrich wieder verschließen, wurden als schnell bezeichnet, während die Porenschlüsse, die wie eine Inaktivierung verliefen, als langsam bezeichnet wurden.

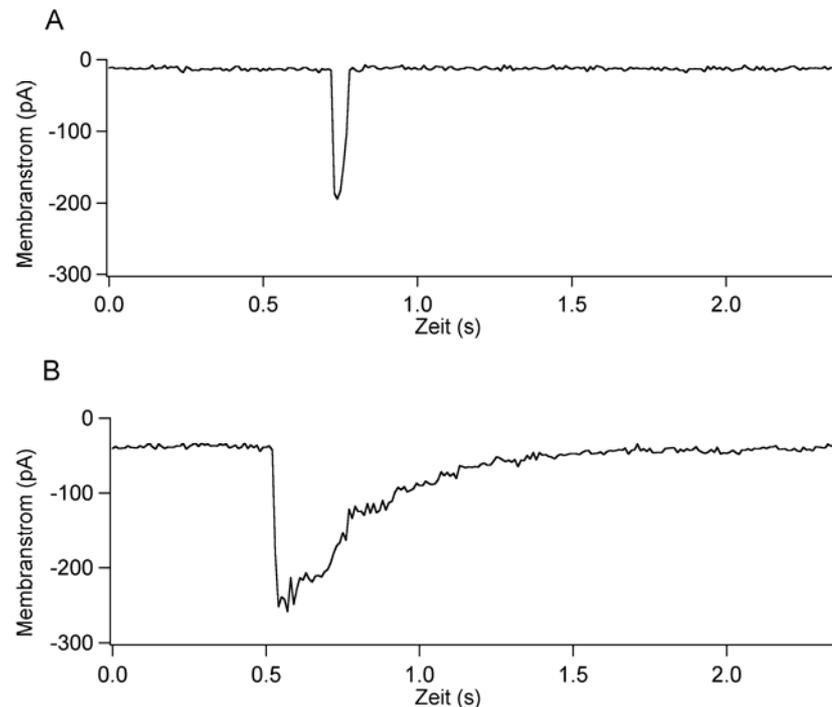


Abb. 27: Schneller (**A**) und langsamer (**B**) Porenschluss von LLO-Poren bei $100 \mu\text{M La}^{3+}$. Eingesetzte LLO-Konzentration $50 \mu\text{l KÜ}$. Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV .

Die Zeitkonstanten τ der langsamen Porenschließungen wurden mit einer Exponentialfunktion des Programms PulseFit bestimmt. Zugrunde gelegt wurde die Funktion $I(t) = I_0 + I \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$, wobei I_0 der Grundstrom, I der Porenstrom, t die Zeit und τ die Zeitkonstante sind. Hier zeigte sich, dass sich die Zeitkonstante τ mit zunehmender La^{3+} -Konzentration verkürzt.

Es besteht eine Assoziationsreaktion zwischen offener LLO-Pore (P) und La^{3+} , die zum Porenblock (P_b) führt: $P + \text{La}^{3+} \xrightarrow{k_a} P_b\text{La}^{3+}$ mit der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a . Diese Assoziationsreaktion lässt sich durch die Formel $1/\tau = k_a \times c + k_0$ beschreiben, wobei τ die Zeitkonstante, k_a die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, c die Konzentration und k_0 der Schnittpunkt mit der Ordinate sind. k_0 ist der Kehrwert der Zeitkonstante τ_0 , die den Porenschluss in Abwesenheit von La^{3+} beschreibt.

Abbildung 28 zeigt $1/\tau$, den Kehrwert der Zeitkonstanten gegen die La^{3+} -Konzentration. Aus der Steigung der Geraden kann man die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a für die La^{3+} -Blockade der LLO-Poren berechnen. Sie

beträgt $0,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dieser Wert für k_a legt nahe, dass es sich bei der Blockade um einen diffusionsabhängigen Prozess handelt.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_d für die Dissoziation der La^{3+} -Ionen von den LLO-Poren lässt sich nur indirekt aus der Zeitkonstante der Deblockade durch EDTA bestimmen: τ_{EDTA} . Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante beträgt demnach $1/\tau_{\text{EDTA}} = 0,48 \text{ s}^{-1}$.

Aus dem Quotient k_d/k_a ergibt sich die Dissoziationskonstante K_d mit $1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$. Dieser Wert um den Faktor 15 höher als der IC_{50} -Wert für La^{3+} von $0,9 \mu\text{M}$ der aus der Konzentrationswirkungskurve (Abb. 16) bestimmt wurde. Dies kann jedoch im Rahmen der Methode als Übereinstimmung gesehen werden.

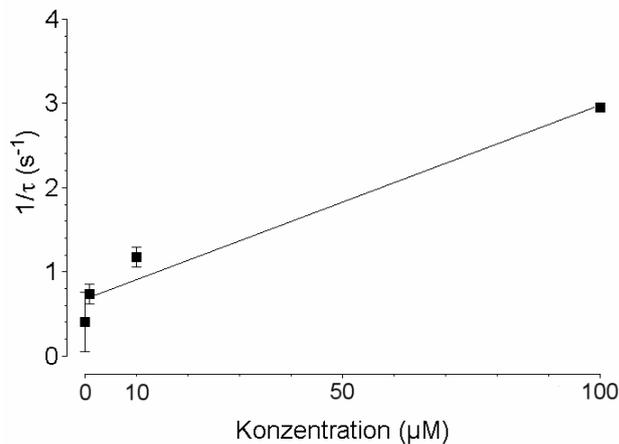


Abb. 28: Geschwindigkeitskonstanten der Blockade der LLO-Poren durch La^{3+} $1/\tau$ auf der Ordinate gegen die Konzentration (μM). Die Steigung der Geraden ergibt k_a . Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV . LLO-Konzentration $50 \mu\text{L KÜ}$.

3.6 Blockade der LLO-Porenströme durch weitere Ionen

3.6.1 Aluminium

Es wurden weitere dreiwertige Ionen auf ihre Poren-blockierenden Eigenschaften hin untersucht. Das dreiwertige Al^{3+} blockierte die LLO Porenströme ebenfalls. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 29) zeigt einen IC_{50} -Wert von $68 \pm 4 \mu\text{M}$ für Al^{3+} , der Hill-Koeffizient n betrug $1,7 \pm 0,2$. EDTA in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ hob die Blockade der LLO-Porenströme durch Senkung der freien Al^{3+} -Konzentration vollständig wieder auf ($n=3$).

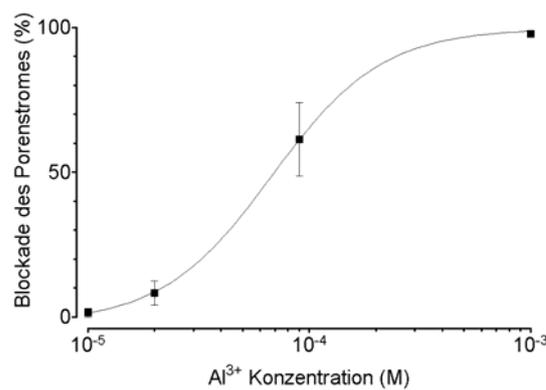


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Blockade der LLO-Porenströme durch Al³⁺. Gemessen wurde der geblockte Anteil des Porenstroms y in % des gebildeten Gesamtstroms. Die Hill Gleichung $y = 100 / \left(1 + \left(\frac{IC_{50}}{c} \right)^n \right)$ wurde mittels des Least-Square-Fit Verfahrens an die Messpunkte angepasst, wobei IC_{50} die Konzentration ist, bei der 50 % des Stroms blockiert werden, n der Hill Koeffizient und c die eingesetzte Al³⁺-Konzentration sind. $IC_{50} = 68 \pm 4 \mu\text{M}$, Hill Koeffizient $n = 1,7 \pm 0,2$. LLO-Konzentration $50 \mu\text{l KÜ}$, $n=3$ für jeden Messpunkt.

3.6.2 Zink, Cadmium, und Nickel

Zn²⁺, Cd²⁺ und Ni²⁺ sind als Blocker spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle bekannt (Busselberg 1990, Randall 1998). Abbildung 30 zeigt beispielhaft die Blockade der LLO-Poren durch Zn²⁺. Der Block betrug bei einer Zn²⁺-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ $59 \pm 8 \%$ ($n=3$). Eine Erhöhung der Zn²⁺-Konzentration auf 1 mM brachte keine signifikante Steigerung der Blockade des Porenstroms. Eine Teilblockade von $52 \pm 1 \%$ ($n=2$) wurde für $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ und von $51 \pm 10 \%$ ($n=4$) für 1 mM Ni^{2+} gemessen. Auffallend im Gegensatz zu den Lanthanoiden war, dass keine vollständige Blockade beobachtet werden konnte. Andere zweiwertige Ionen, die in der Extrazellulärlösung vorhanden sind wie Mg²⁺ und Ca²⁺ blockieren die Porenbildung nicht.

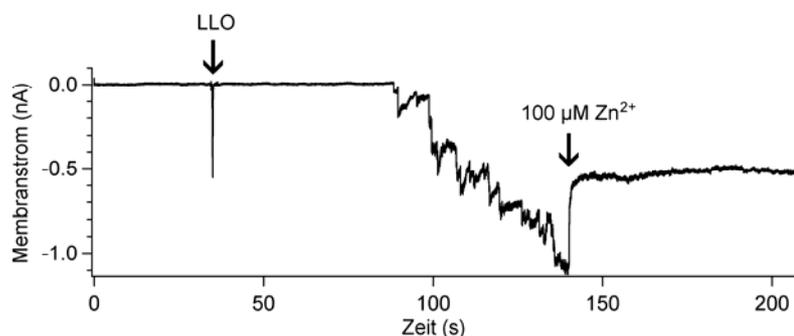


Abb. 30: Blockade der LLO-Porenströme durch Zn²⁺
 1. Pfeil: Applikation von $50 \mu\text{l KÜ}$. Die Porenbildung wurde abgewartet.
 2. Pfeil: Applikation von $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$.
 Messung an einer HEK-293 Zelle bei einem Membranpotential von -50mV .

EDTA (100 μM) war in der Lage, die durch die Metall-Ionen Cd^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+} teil-blockierten LLO-Porenstrom wieder zu deblockieren (jeweils $n=2$). Die Dissoziationskonstanten betragen für Cd^{2+} -EDTA $10^{-16,6}$ M, für Ni^{2+} -EDTA $10^{-18,6}$ M und für Zn^{2+} -EDTA $10^{-16,2}$ M (Sillaen et al. 1964).

3.6.3 Ruthenium-Rot und Ruthenium (Ru^{2+})

Ruthenium-Rot blockiert den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter, der für die Aufnahme von zyttoplasmatischen Ca^{2+} in die Mitochondrien verantwortlich ist (Moore 1971). Ruthenium-Rot blockierte den durch LLO-induzierten Porenstrom in einer Konzentration von 100 μM zu 89 ± 1 % ($n=3$). Ru^{2+} -Ionen liegen in Ruthenium-Rot $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$ komplexiert vor. Der Block könnte auf dem Komplex als Ganzes beruhen oder auf den Ru^{2+} -Ionen, die teilweise aus dem Komplex in Lösung gehen. Es zeigte sich, dass auch Ru^{2+} in einer Konzentration von 100 μM in der Lage ist, die LLO-Porenströme zu blockieren, jedoch um 20 % schlechter als Ruthenium-Rot. Der durchschnittliche Block bei 100 μM Ru^{2+} -Konzentration betrug 68 ± 8 % ($n=3$) des LLO-Porenstroms. Durch Ru^{2+} oder Ruthenium-Rot blockierte Poren ließen sich nicht durch EDTA in äquimolaren Konzentrationen wieder eröffnen ($n=3$). Eine Dissoziationskonstante konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

3.7 Blockade der LLO-Poren durch Eosin Y

Eosin Y ist ein gebräuchlicher Farbstoff in der Mikroskopie, zu dem ist aber auch bekannt, dass es plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) hemmen kann (Gatto et al. 1993). Im Rahmen des Screenings erwies sich Eosin Y in 100 μM Konzentration als wirksamer Blocker der LLO-induzierten Poren bei HEK-293 Zellen (Abb. 31). Erstens blockiert Eosin Y offene Poren, wie in Abb. 31A zu sehen ist ($n=3$). Zweitens verhindert die Applikation des Eosin Y (100 μM) 30 s vor LLO-Applikation (Abb. 31B) das Öffnen der Poren oder die Porenbildung fast vollständig ($n=6$).

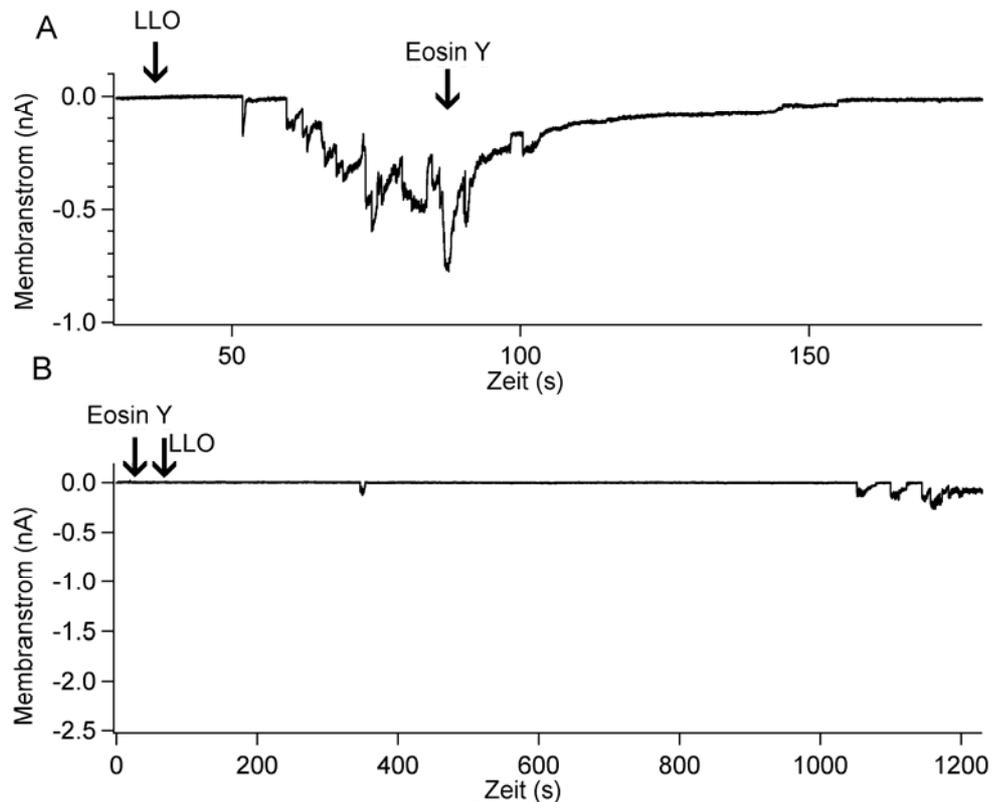


Abb. 31: Blockade der LLO-Porenströme durch Eosin Y (A) bei Applikation auf offene Poren und (B) bei Applikation des Eosin Y 30 s vor LLO-Applikation.

A: 1. Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO. Die Porenbildung wurde abgewartet.

2. Pfeil: Applikation von 100 μ M Eosin.

B: 1. Pfeil: Applikation von 100 μ M Eosin.

2. Pfeil: Applikation von 10 ng/ml LLO.

Messungen an HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV.

3.7.1 Auswaschen von Eosin Y hebt die Blockade der LLO-Poren wieder auf

Es stellte sich die Frage, ob der Eosin Y-Effekt auf LLO-induzierte Poren reversibel war. Dazu wurde die gleiche Versuchsanordnung wie in Abschnitt 3.5.4.1 verwendet. Nach Eosin Y- und darauf folgender LLO-Applikation wurde 10 min gewartet und dann mit LLO und Eosin Y-freier Extrazellulärlösung gespült (Abb. 32). Hierbei ließen sich sofort Porenströme messen ($n=3$). Dies zeigt zum einen, dass die LLO-Porenbildung durch Eosin Y nicht verhindert wird, und zum zweiten, dass die Blockade offener LLO-Poren durch Eosin Y reversibel ist.

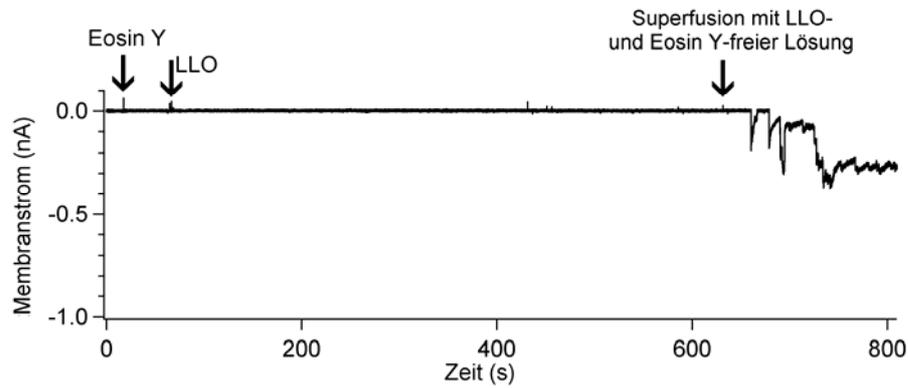


Abb. 32: Der Eosin Y-Effekt ist durch Superfusion reversibel.

1. Pfeil: Applikation von 100 μ M Eosin Y.

2. Pfeil: Applikation von 2,5 ng/ml LLO.

3. Pfeil: Beginn der Superfusion mit Eosin Y und LLO-freier Extrazellulärlösung
Messung an einer HEK-293 Zellen bei einem Membranpotential von -50mV.

3.8 LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen

3.8.1 Das Ca^{2+} strömt allein durch die LLO-Poren in die Zelle.

Zelluläre Ca^{2+} -Oszillationen treten bei den verschiedensten zellulären Prozessen wie Mitose, Apoptose, Kontraktion und Sekretion auf (Übersicht bei Berridge et al. 1998). Repp et al. (2002) konnten zeigen, dass nach Applikation von LLO Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Wir verwendeten zur Untersuchung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von LLO die in Abschnitt 2.8 beschriebene Ca^{2+} -Imaging Anlage. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde FURA-2 eingesetzt.

Die LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen der HEK-293 Zellen sind interindividuell unterschiedlich und können in drei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 33). Erstens gibt es HEK-293 Zellen, die nach LLO-Applikation (1,5 ng/ml) nicht mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reagieren (Abb. 33A). Diese HEK-293 Zellen wurden als Non-Responder (20 %) bezeichnet. Der größte Anteil der HEK-293 Zellen reagierte mit spikeförmigen, transienten Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 33B). Diese Zellen wurden als Oszillatoren (65%) bezeichnet. Eine dritte Gruppe von HEK-293 Zellen zeigte nach anfänglichen Oszillationen eine konstante Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 33C). Diese wurden als Zellen mit Ca^{2+} -Überladung (15%) bezeichnet. Die Verteilung hinsichtlich der drei Reaktionsformen hing von der LLO-Konzentration ab. Bei 5 ng/ml LLO zeigten bereits 50% der HEK-293 Zellen eine Ca^{2+} -Überladung.

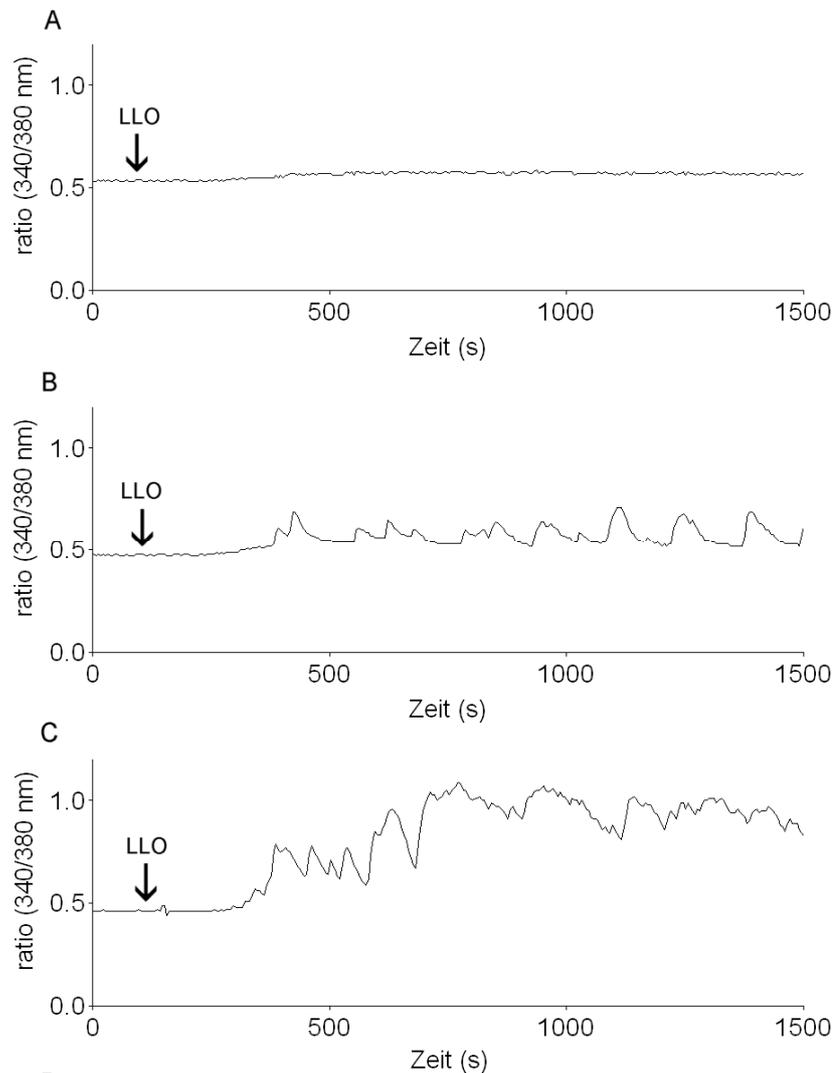


Abb. 33: Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsmessungen nach Induzierung von LLO-Poren

A: Non-Responder: Zellen, die mit keiner Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} reagieren (20 %).

B: Oszillatoren: Zellen, die mit einer spikeförmigen Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels reagieren, der auf das Ausgangsniveau zurückgeht (65%).

C: Ca^{2+} -Überladung: Zellen, die intrazellulär Ca^{2+} akkumulieren und nicht in der Lage sind, die Ca^{2+} -Konzentration wieder zu senken (15%).

Messungen an HEK-293 Zellen bei 22°C. Die ratiometrischen Verhältnisse der beiden gemessenen Wellenlängen 340 nm und 380 nm sind auf der Ordinate, die Zeit ist auf der Abszisse dargestellt. Applikation von 1,5 ng/ml LLO (Pfeile).

Die Hypothese unserer Arbeitsgruppe ist, dass der Ca^{2+} -Einstrom zu Beginn der Ca^{2+} -spikes allein durch das Öffnen der LLO-Poren bedingt ist. Mittels Ca^{2+} -Imaging sollte nun direkt bestätigt werden, dass Gd^{3+} in der Lage ist, die LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen zu verhindern. Abbildung 34A als Kontrollmessung zeigt, dass LLO in einer Konzentration von 1,5 ng/ml in HEK-293 Zellen Ca^{2+} -Oszillationen mit variabler Frequenz erzeugt. HEK-293 Zellen wurden nun mit Gd^{3+} in Konzentrationen von 100 μM bzw. 1 mM für jeweils 10 Minuten

vorinkubiert. Anschließend wurde 5 ng/ml LLO appliziert (Abb. 34). In Anwesenheit von 100 μM Gd^{3+} konnten noch, wenn auch wenige, Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden (Abb. 34B), während 1 mM Gd^{3+} das Auftreten von Ca^{2+} -Oszillationen vollständig verhinderte (Abb. 34C).

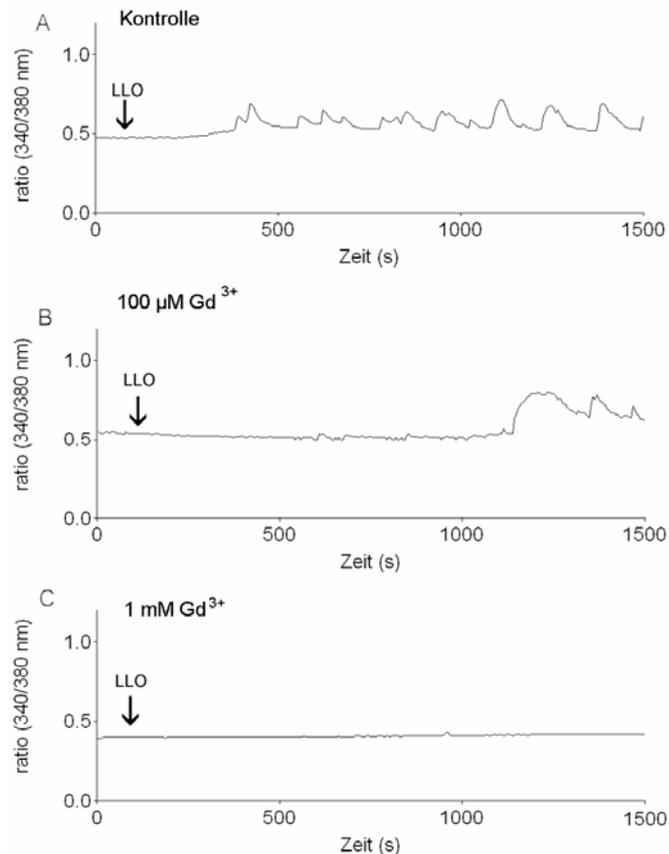


Abb. 34: Blockade der LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen in HEK-293 Zellen **(A)** Kontrolle, **(B)** nach 10minütiger Vorinkubation mit 100 μM und **(C)** mit 1 mM Gd^{3+} . **(A)** Pfeil: Applikation von 1,5 ng/ml LLO **(B,C)** Pfeil: Applikation von 5 ng/ml LLO. Messungen an HEK-293 Zellen bei 22°C. Die ratiometrischen Verhältnisse der beiden gemessenen Wellenlängen 340 nm und 380 nm sind auf der Ordinate, die Zeit ist auf der Abszisse dargestellt.

Die bei den Ca^{2+} -Imaging Versuchen benötigten Gd^{3+} -Konzentrationen waren identisch mit den bei hSK4-exprimierenden HEK-293 Zellen benötigten Gd^{3+} -Konzentrationen zur Blockade der K^+ -Stromaktivierung (vergleiche Abb. 18). Der initiale Ca^{2+} -Einstrom ist also allein durch die LLO-Poren bedingt.

Uhlen et al. (2002) konnten für Ca^{2+} -Oszillationen durch das *E.coli* α -Hämolyysin aus der Gruppe der Repeat-in Toxine zeigen, dass die Ca^{2+} -Oszillationen durch Zugabe des IP_3 -Rezeptor Antagonisten 2-Aminoethoxydiphenyl-borat (2-ABP)

blockiert werden. Uhlen et al. (2002) hatten auch beschrieben, dass Nifedipin, welches spannungsgesteuerte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die NAADP-abhängige Ca^{2+} -Freisetzung (Galione & Churchill 2002) hemmt, die α -Hämolyisin-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen inhibiert. Daraus wurde gefolgert, dass die IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung und L-Typ Ca^{2+} -Kanäle für die Entstehung der α -Hämolyisin-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen von entscheidender Bedeutung sind.

Diese Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismen wurden nun auf eine Beteiligung bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen hin untersucht. Durch eine LLO-Konzentration von 1,5 ng/ml induzierte Ca^{2+} -Oszillationen konnten durch halbstündige Vorinkubation mit 100 μM 2-ABP nicht verhindert werden ($n=2$). Auch Nifedipin in einer sehr hohen Konzentration von 100 μM reduzierte durch LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in HEK-293 Zellen nicht ($n=2$). Diese beiden Prozesse sind also an der Entstehung LLO-induzierter Ca^{2+} -Oszillationen nicht beteiligt.

3.8.2 Ca^{2+} -Sequestration bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen

Die Sequestration, d.h. die Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration bei den Ca^{2+} -spikes ist für die Entstehung der Oszillationen ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Gd^{3+} blockiert LLO-Poren, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde (Abb. 15). Es ist jedoch auch bekannt, dass Gd^{3+} plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) blockieren kann (Carafoli 1991, Konz. 50-100 μM). In Abbildung 35 wurden Ca^{2+} -Oszillationen durch LLO induziert und anschließend Gd^{3+} appliziert, wodurch die Ca^{2+} -Oszillationen gestoppt werden. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration zum Zeitpunkt der Gd^{3+} -Applikation (Abb. 35A) bleibt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hoch. Im Gegensatz dazu bleibt bei Gd^{3+} -Applikation zum Zeitpunkt einer niedrigen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 35B) die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig. Die Ursache dafür könnte sein, dass die plasmamembranständigen Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), die normalerweise die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration regulieren, durch Gd^{3+} blockiert werden. Damit kann das Ca^{2+} , das durch die LLO-Poren einströmt, nicht mehr aus der Zelle herausgebracht werden. PMCA sind also an der Ca^{2+} -Sequestration bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen entscheidend beteiligt.

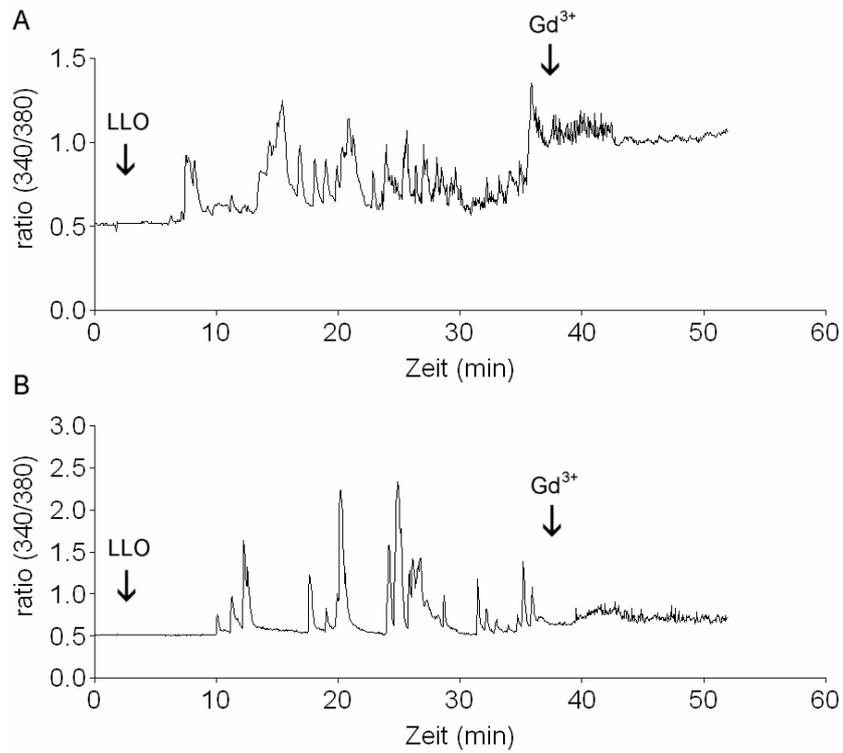


Abb. 35: Gd³⁺-Applikation bei LLO-induzierten Ca²⁺-Oszillationen in Phasen hoher (A) und niedriger (B) Ca²⁺-Konzentration.

1. Pfeil: Applikation von 1,5 ng/ml LLO.

2. Pfeil: Applikation 1 mM Gd³⁺.

Messungen an HEK-293 Zellen bei 22°C.

Die ratiometrischen Verhältnisse der beiden gemessenen Wellenlängen 340 nm und 380 nm sind auf der Ordinate und die Zeit in Minuten ist auf der Abszisse dargestellt

4 Diskussion

Listeria monocytogenes ist ein bedeutsames Pathogen bei der Nahrungsmittelhygiene und stellt insbesondere für abwehrgeschwächte Patienten und Schwangere eine Bedrohung dar. Die gute Vermehrungsfähigkeit des Bakteriums, das etablierte Infektionsmodell bei der Maus und die besonderen Pathogenitätsfaktoren, machen *L. monocytogenes* zu einem idealen Modellorganismus zur Erforschung der Infektionsbiologie eines intrazellulären Bakteriums (Vazquez-Boland et al. 2001). Listeriolysin O (LLO) als Modelltoxin der Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDTX) ermöglicht hier gewonnene Ergebnisse auch auf anderen Infektionserreger, wie *Streptococcus pyogenes* und *Clostridium perfringens*, zu übertragen, die ebenfalls beim Menschen eine große Bedeutung haben.

LLO ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes*. Mutanten, bei denen das Hämolyisin (hly)-Gen, das für LLO codiert, komplett deletiert ist, sind ca. 50 % weniger invasiv (Cossart et al. 1989) und heterologe Rekombination von *Bacillus subtilis* mit dem hly-Gen bringt einen invasiven, aber nicht vollständig pathogenen *Bacillus subtilis* hervor (Bielecki et al. 1990).

Die Patch-Clamp Methode ermöglicht elektrophysiologisch die fortlaufende Beobachtung der Porenbildung durch LLO in sublytischen, Konzentrationen sowie Messungen von Porenschlüssen.

4.1 Aktivierbarkeit des LLO

LLO besitzt in dem CDTX-gruppenspezifischen Undekapeptid das einzige Cystein des gesamten LLO-Moleküls. Es ist bekannt, dass Thiole die hämolytische Aktivität der CDTX steigern können. Dies könnte auf der Reduktion des einzigen Cysteins im LLO-Molekül beruhen, das, wie bereits gezeigt wurde, essentiell für die Porenbildung des LLO ist (Butler 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von LLO mit dem Thiol Dithiotreitol zu einer dreifachen Steigerung der porenbildenden Aktivität führt.

Auch eine Absenkung des pH-Wertes auf 5,9 führt zur Steigerung der porenbildenden Aktivität auf das Fünffache. Dies könnte auch erklären, dass eine Protonendepletion der Lysosomen mit Bafilomycin A1 zu geringerer Invasivität von

L. monocytogenes führt (Beauregard et al. 1997). Die pH-Aktivierbarkeit von LLO gilt als einzigartig unter den CDTX.

4.2 Die Porenschlüsse

Bei sublytischen LLO-Konzentrationen konnte beobachtet werden, dass sich 47 % der gebildeten Poren wieder verschließen (Tab. 4), während bei höheren Toxinkonzentrationen deutlich weniger Porenschlüsse registriert werden konnten. Die Porenschlüsse verliefen zum einen sprunghaft, wie z.B. bei endogenen Ionenkanälen, zum anderen langsam inaktivierend (siehe Abb. 11 A und B). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den schnellen Porenschlüssen um Konformationsänderungen der LLO-Pore handelt und bei den langsamen Porenschlüssen um Endo-/Exozytose-Prozesse der Zelle.

Im ersten Ansatz wurde die Annahme zu Grunde gelegt, dass, wenn es sich um aktive Leistungen der Zelle handelt, diese energieabhängig und somit von der intrazellulären ATP-Konzentration abhängig sind. Eine Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration über die Patch-Pipettenlösung erhöhte nicht die Anzahl der Porenschlüsse. Auch das Verhältnis von schnellen zu langsamen Porenschlüssen war unverändert im Vergleich zu HEK-293 Zellen, bei denen eine Senkung der intrazellulären ATP-Konzentration durch einstündige Inkubation in glucosefreiem Medium vorgenommen wurde (Tab. 3).

Im zweiten Ansatz wurde zunächst davon ausgegangen, dass es sich bei dem langsamen Porenschluss um eine intrazelluläre Aufnahme des Membran-Porenkomplexes durch Endozytose handelt. Hierbei kommen prinzipiell alle bekannten Endozytose-Prozesse in Betracht, wie Phagozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Makropinozytose, sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (Übersicht bei Conner & Schmid 2003). Pharmakologisch lässt sich nur ein Teil dieser Mechanismen blockieren. Durch Cytochalasin D als Inhibitor der Aktin-Polymerisation werden Makropinozytose, Phagozytose und Caveolin-vermittelte Endozytose gehemmt. Phenylarsinoxid wurde eingesetzt um die Clathrin-vermittelte Endozytose zu blockieren. Nocodazol als Inhibitor der Tubulin-Polymerisation wurde ebenfalls eingesetzt. Mikrotubuli sind vor allem beim Transport endozytotischer Vesikel beteiligt (Löffler & Petrides 1999). Bei Vorinkubation der Zellen mit Cytochalasin D,

Nocodazol und Phenylarsinoxid zeigte sich keine Reduktion der Anzahl der Porenschlüsse und keine Veränderung des Verhältnisses von schnellen zu langsamen Porenschlüssen (Tab. 4).

Im Ansatz wurde ein nominell Ca^{2+} -freies intrazelluläres Milieu durch intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung mit dem Chelator BAPTA erreicht, da eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration zelluläre Prozesse wie Endo-/Exozytose aktiviert. Auch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch offene LLO-Poren wird abgepuffert. Hier zeigte sich, bei normaler Anzahl an Porenschlüssen, eine signifikante Abnahme der langsamen Porenschlüsse (Tab. 4). Dies bestätigt die Ergebnisse von Butler (2005) und lässt sich mit der Hypothese, dass es sich um zelluläre Prozesse handelt gut vereinbaren.

Im vierten Ansatz wurden mit Hilfe der Outside-Out und Inside-Out Messkonfigurationen der Patch-Clamp Technik geprüft, ob erstens LLO in zellfreien Membranpatches Poren induzieren kann und zweitens, ob es zu Porenschlüssen kommt. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass in Outside-Out Patches LLO-Poren gebildet werden, wobei die Anzahl der registrierten Porenschlüsse drastisch auf 6 % der gebildeten Poren reduziert war (Tab. 4). Dies ist hochsignifikant seltener als in der Whole-Cell Messkonfiguration. Bei der geringen Zahl an Porenschlüssen insgesamt, waren langsame Porenschlüsse signifikant seltener als schnelle Porenschlüsse, was mit der Hypothese, dass diese auf Endozytose beruhen gut vereinbar ist. Überraschenderweise ist aber auch die Zahl der schnellen Porenschlüsse reduziert, im Gegensatz zu anderen, auf Konformationsänderungen beruhenden Prozessen, wie z.B. dem Öffnen und Schließen von endogenen Ionenkanälen in Outside-Out Patches (Hille 2001). Dies lässt darauf schließen, dass noch weitere, bisher unbekannte, zellabhängige Prozesse beim schnellen Porenschluss eine Rolle spielen.

Inside-Out Patches sind um den Faktor zehn kleiner als Outside-Out Patches, wie durch Kapazitätsmessungen gezeigt werden konnte. In dieser Arbeit ist durch den Nachweis der Porenbildung in Inside-Out Membranpatches erstmals direkt gezeigt worden, dass LLO auch von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran her Poren induzieren kann. Das ist deshalb von Bedeutung, weil LLO bei der interzellulären Ausbreitung in der 2. Wirtszelle einer Doppelvakuole entkommen muss, bei der die zytoplasmatische Seite den Bakterien zugewandt ist (siehe Abb.

1). Dieser direkte Befund könnte die Ergebnisse von Gedde et al. (2000) erklären, die zeigen konnten, dass mit LLO inkubierte, aber genetisch LLO-defiziente Listerien in Zellen hineingelangen, aber nicht in der Lage sind die Nachbarzellen zu invadieren.

In den Inside-Out Membranpatches wurden keine Porenschlüsse mehr beobachtet (Tab. 4). Dies kann bei der geringeren Anzahl von gemessenen Poren statistisch bedingt sein, da bei den 12fach größeren Outside-Out Patches bereits nur 6 % Porenschließungen beobachtet wurden und die Wahrscheinlichkeit der Registrierung eines Porenschlusses von der Größe des Membranpatches abhängig ist. Aufgrund der besonders schwierigen Inside-Out Messkonfiguration konnte jedoch eine größere Datenmenge nicht erhoben werden. Deshalb können wir keine Aussage darüber machen, ob nicht auch im Inside-Out Patch Porenschlüsse schneller und langsamer Art vergleichbar mit den Outside-Out Patches auftreten.

4.3 Pharmakologische Blockade der LLO-induzierten Poren

Aufgrund der herausragenden Bedeutung des LLO in der Pathogenese der Listerien-Infektion bei Mensch und Tier war es Ziel dieser Arbeit eine die Wirkung dieses Toxins blockierende Substanz zu finden. Im Rahmen einer anwendungsorientierten Vorgehensweise wurde zuerst versucht bereits auf dem Arzneimittelmarkt zugelassene Wirkstoffe einzusetzen. Besonderes Augenmerk wurde auf Wirkstoffe gesetzt, die in der Lage sind, endogene Ionenkanäle zu blockieren. Von den 41 geprüften Substanzen konnte bei keiner eine blockierende Wirkung auf LLO-Poren nachgewiesen werden. Deshalb wurden auch andere Substanzen eingesetzt.

4.3.1 Lanthanoide

In der vorliegenden Arbeit konnte mit den Lanthanoiden Lanthan (La^{3+}) Gadolinium (Gd^{3+}) und Ytterbium (Yb^{3+}) Substanzen beschrieben werden, die eine herausragend blockierende Wirkung auf die LLO-Poren zeigten. Die IC_{50} -Werte bewegen sich in einer Größenordnung von $0,90 \pm 0,09 \mu\text{M}$ für La^{3+} und $5,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ für Yb^{3+} . Die Ionenradien der getesteten Lanthanoide liegen zwischen 122 nm (La^{3+}) und 85 nm (Yb^{3+}). Die blockierende Wirkung der Ln^{3+}

hängt von deren Ionenradius ab, wobei mit steigendem Ionenradius die halbmaximale, inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) abnimmt. Eine Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes vom Ionenradius ist in der Literatur bei der Blockade spannungsabhängiger T-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Ln^{3+} bekannt (Milnar et al. 1993). Ln^{3+} sind unter anderem in der Lage, Ca^{2+} -Kanäle (Tsien et al. 1988, Milnar et al. 1993, Beedle et al. 2002), Ca^{2+} -ATPasen (Carafoli 1991) und den zum nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor gehörenden Ionenkanal (Rangel-Gonzalez et al. 2002), sowie Kainat-Rezeptoren (Hüttner et al. 1998) und Dopamin-, Serotonin- und Noradrenalin-Transporter (Bryan-Lluka et al. 1997) zu blockieren. Des Weiteren erhöhen sie die Affinität von GABA für den $GABA_A$ -Rezeptor (Ma et al. 1993, Narahashi et al. 1994), ein Effekt, der mit zunehmender Ordnungszahl zunimmt. Gd^{3+} reduziert den Sauerstoff-Verbrauch von Hepatozyten, und inhibiert die Phagozytose der Kupffer-Zellen (Fereirra et al. 1998, Übersicht bei Palasz & Czekaj 2000). Der Nachweis der poren-blockierenden Wirkung der Ln^{3+} könnte die Ergebnisse von Dramsi et al. (2003) erklären, die zeigen konnten, dass La^{3+} die Invasionsrate von *L. monocytogenes* in Hep2-Zellen reduzierte.

4.3.2 Reversibilität der LLO-Porenblockade durch Lanthanoide

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade LLO-induzierter Porenströme durch Gd^{3+} reversibel ist, da sie durch Superfusion der HEK-293 Zellen mit LLO- und Gd^{3+} -freier Extrazellulärlösung wieder aufgehoben wird (Abb. 19). Dabei wird der LLO-induzierte Ausgangsstrom nicht erreicht, da die Superfusion nicht alle Gd^{3+} -Ionen entfernt.

Die Blockade der LLO-Poren durch Gd^{3+} kann durch den Chelator EDTA mit einem EC_{50} -Wert von $21,7 \pm 0,1 \mu M$ vollständig wieder aufgehoben werden. Hier wird die Ausgangsstromamplitude bei einer EDTA-Konzentration von $100 \mu M$ erreicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ln^{3+} mit EDTA sehr affine Bindungen eingehen. Die Dissoziationskonstanten betragen bei pH 7 für La^{3+} -EDTA $10^{-15,1} M$, für Gd^{3+} -EDTA $10^{-17,2} M$ und für Yb^{3+} -EDTA $10^{-18,7} M$. Berechnet nach dem Massenwirkungsgesetz sind also 10^{-15} - 10^{-18} Mol freie Ionen, in Anwesenheit von EDTA vorhanden. Im Vergleich dazu betragen die Dissoziationskonstanten für Ca^{2+} -EDTA nur $10^{-10,6} M$ und für Mg^{2+} -EDTA $10^{-8,7} M$ (Forth et al. 2001), wodurch

EDTA in der Extrazellulärlösung aufgrund der hohen Affinität primär die dreiwertigen Ln^{3+} bindet und deren freie Konzentration senkt.

Schomacker et al. (1988) konnten nachweisen, dass radioaktive Ln^{3+} mit hoher Affinität durch Serum, beziehungsweise Albumin gebunden werden. Die Blockade der LLO-Poren durch Gd^{3+} wurde durch Zugabe von neonatalem Kälberserum mit einem EC_{50} -Wert von $0,22 \pm 0,03\%$ in der Extrazellulärlösung wieder aufgehoben. Aus diesen Befunden ergibt sich, dass bei einem möglichen klinischen Einsatz der Metalle diese von Serumproteinen effektiv gebunden werden. Die Dosis müsste so hoch gewählt werden, dass die Bindungsstellen der Serumproteine abgesättigt sind und eine freie Konzentration vorliegt.

Bei vielen in der Literatur bekannten Blockaden von Ionenkanälen durch geladene Substanzen bzw. Ionen kann man zeigen, dass die Blockade vom Membranpotential abhängig ist (Hille 2001). Die Blockade durch positive Ionen ist bei positiven Membranpotentialen geringer. Die durch Gd^{3+} -blockierten LLO-Poren lassen sich durch positive Membranpotentiale wieder eröffnen. Bei einer Membranpotentialänderung auf negative Membranpotentiale kommt es erneut zu einer Blockade der LLO-Poren durch Gd^{3+} (siehe Abb. 24). Durch positive Membranpotentiale lassen sich jedoch nicht alle LLO-Poren deblockieren. Dies wird an dem Befund deutlich, dass durch die Applikation von EDTA auf zum Teil, durch ein positives Membranpotential, deblockierte LLO-Poren, weitere Poren deblockiert werden, was sich an der signifikanten Zunahme des Porenstroms zeigt (siehe Abb. 26). Bei der Blockade der LLO-Poren durch Gd^{3+} handelt es sich also um eine spannungsabhängige Blockade offener Poren.

4.3.3 Poren-blockierende Eigenschaften weiterer Metalle

Auch Al^{3+} als Vertreter der dritten Hauptgruppe der Elemente konnte die LLO-Porenströme blockieren. Dazu war jedoch eine um den Faktor 10 höhere Konzentration notwendig als bei den Ln^{3+} . Der IC_{50} -Wert für Al^{3+} betrug $68 \pm 4 \mu\text{M}$. Die zweiwertigen Metalle wie Zn^{2+} und die als Ca^{2+} -Kanalblocker eingesetzten Kationen Ni^{2+} und Cd^{2+} konnten die LLO-Porenströme nur teilweise blockieren. Mn^{2+} und Bi^{2+} hatten in den Screeningversuchen (siehe Tab. 5) keinen Effekt, Ca^{2+} und Mg^{2+} sind beide in 2 mM Konzentrationen in der Extrazellulärlösung vorhanden und blockierten die LLO-Porenströme nicht. Für die Blockade der LLO-

Poren durch Ruthenium-Rot, das den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter hemmt, konnte gezeigt werden, dass dies ein Effekt des Ruthenium (Ru^{2+})-Ions ist. Die Blockade der LLO-Poren durch Ru^{2+} war durch EDTA nicht reversibel. Eine Dissoziationskonstante von Ru^{2+} -EDTA war in der Literatur nicht zu finden.

4.3.4 Eosin Y

Eosin Y ist ein häufig benutzter Farbstoff in der Mikroskopie und ist auch ein Blocker der membranständigen Ca^{2+} -ATPase (PMCA) (Gatto et al. 1993). Eosin Y in einer Konzentration von 100 μM blockierte den LLO-induzierten Porenstrom vollständig. Höhere Konzentrationen hatten einen eigenen membranschädigenden Effekt. Der blockierende Effekt des Eosin Y auf die LLO-induzierten Poren konnte durch Superfusion mit LLO- und Eosin Y-freier Extrazellulärlösung aufgehoben werden. Die Tatsache, dass sich Poren bilden beziehungsweise öffnen, spricht dafür, dass die LLO-Moleküle membrangebunden vorlagen, da nicht membrangebundenes LLO durch die Spülung entfernt wird. Eosin Y blockiert also offene LLO-Poren. Dieser Vorgang ist reversibel. Eosin Y ist der einzige nicht-metallische Blocker LLO-induzierter Poren.

4.4 LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen

LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen wurden bereits beschrieben (Repp et al. 2002). Der Ca^{2+} -Einstrom ist für die Invasivität von *L. monocytogenes* in Hep2-Zellen essentiell, wie kürzlich von Dramsi et al. (2003) gezeigt werden konnte. Uhlen et al. (2002) beschrieben für das α -Hämolyisin von *E. coli*, dass durch dieses Toxin verursachte Ca^{2+} -Oszillationen durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-ABP), ein membran-permeabler Inhibitor der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung, und durch Nifedipin einem Blocker von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und NAADP-abhängiger Freisetzung, blockiert werden. Dies sprach dafür, dass membranständige Ca^{2+} -Kanäle und IP_3 - und NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum an den α -Hämolyisin induzierten Ca^{2+} -Oszillationen beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Experimente, dass die LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen durch diese Substanzen nicht verändert wurden.

Der LLO-Porenblocker Gd^{3+} konnte in einer Konzentration von 1 mM die LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen vollständig verhindern. Es kann also gefolgert werden, dass der initiale Ca^{2+} -Einstrom bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen allein durch LLO-Poren verursacht wird und intrazelluläre Speicher nicht beteiligt sind.

Applikation von Gd^{3+} auf HEK-293 Zellen mit LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen führt zu einem Sistieren dieser Oszillationen. Die Ca^{2+} -Konzentration die zum Zeitpunkt der Gd^{3+} -Applikation besteht, bleibt konstant und fällt nicht ab (Abb. 35). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Gd^{3+} die plasmamembranständigen Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) hemmt (Carafoli 1991) und dadurch die Ca^{2+} -Sequestration verhindert. Die PMCA sind also entscheidend an der Ca^{2+} -Sequestration bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen beteiligt.

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen, von denen eine Ionenkanal-blockierende Wirkung bekannt ist, zeigten nur die Lanthanoide und Eosin Y eine LLO-Poren-blockierende Wirkung.

Damit stehen neue Werkzeuge zur Untersuchung der Rolle des Listeriolysins in der Pathogenese der Listerieninfektion z. B. in Infektions-Assays zur Verfügung. Die hohe Affinität der Lanthanoide zu m Serumalbumin bedingt jedoch bei in vivo Einsatz der Lanthanoide die Gabe hoher Dosen, da nur freie Ionen die Poren blockieren. In solchen hohen Dosen treten jedoch toxische Wirkungen, insbesondere eine Hepatotoxizität, in der Maus auf (Spencer et al. 1998), was einem potentiellen Einsatz z. B. im Tiermodell erschwert.

5 Zusammenfassung

Listeriolysin O (LLO), ein porenbildendes Toxin aus der Gruppe der Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDTX), ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes*.

In dieser Arbeit konnte elektrophysiologisch direkt nachgewiesen werden, dass Dithiotreitol (DTT) und saure (5,9) pH-Werte die porenbildende Aktivität von LLO um das 3-5fache steigern.

Offene LLO-Poren schliessen in der Whole-Cell Messkonfiguration gleich häufig schnell oder langsam. Nominell Ca^{2+} -freie Intrazellulärlösung führte zu einer signifikanten Abnahme langsamer Porenschlüsse, zugunsten schneller Porenschlüsse. In den Outside-Out Patches sind beide Formen des Porenschlusses hochsignifikant seltener, wobei langsame Porenschlüsse signifikant seltener sind als statistisch im Vergleich zu den schnellen Porenschlüssen zu erwarten ist. Dies passt gut zu der Hypothese, dass es sich bei den langsamen Porenschlüssen um Endozytose-Prozesse handelt. In Inside-Out Patches konnte direkt gezeigt werden, dass LLO in der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran Poren induzieren kann, was bei der interzellulären Ausbreitung von *L. monocytogenes* von entscheidender Bedeutung ist. Im Rahmen eines Screenings auf Poren-blockierende Substanzen konnte gezeigt werden, dass die LLO-Poren durch trivalente Ionen, wie Lanthanoide und Aluminium vollständig blockiert wurden. Es handelte sich hierbei um einen vom Ionenradius abhängigen, reversiblen und membranpotentialabhängigen Block. Die zweiwertigen Metallionen, wie Cd^{2+} , Ni^{2+} , Ru^{2+} und Zn^{2+} blockierten die LLO-induzierten Porenströme nur teilweise. Eosin Y war der einzige nicht-metallische Blocker der LLO-Poren.

LLO-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen wurden durch Gd^{3+} vollständig blockiert. Im Gegensatz dazu konnten Inhibitoren der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung oder von Ca^{2+} -Kanälen die Ca^{2+} -Oszillationen nicht verändern. Dies zeigt, dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei den LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen allein durch die LLO-Poren bedingt ist. Die Blockade der plasmamembranständigen Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) durch Gd^{3+} führt zur Hemmung Ca^{2+} -Sequestration bei LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen. Das unterstreicht die entscheidende Rolle der PMCA bei den LLO-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen.

6 Summary

Listeriolysin O is a pore-forming toxin belonging to the family of cholesterol-dependent cytolysins and is the major pathogenicity factor of *L. monocytogenes*.

By electrophysiological measurement studies, it could be directly shown that dithiotreitol (DTT) and acidic (5.9) pH raise LLO's pore-forming activity 3 to 5 fold.

In whole-cell measurements LLO-pores close equally often in a quick or slow way.

Ca^{2+} -free intracellular medium leads to a significant decrease in slow closings in favour of fast closings. In outside-out patches both types of pore closings were significantly decreased compared to whole-cell measurements. Compared to the quick closings the slow closings were furthermore significantly reduced. This observation favours our hypothesis that slow closings are caused by endocytosis.

As clearly shown in the above study, pore formation in inside-out patches proves that LLO can form pores in the cytoplasmatic leaflet of the cell membrane which underlines its importance in cell-to-cell spreading.

On screening several substances for pore blocking abilities, we found several of them that could block the LLO-pores. The trivalent ions like lanthanoids and aluminium blocked the LLO-pores completely. This block induced by lanthanoid was fully reversible and voltage dependent. The IC_{50} of lanthanoids was dependent on its ionic radius. Divalent ions like cadmium, nickel, zinc and ruthenium only partially blocked the current evoked by LLO-pores. Eosin Y could be identified as a non-metal pore blocking agent.

LLO induced Ca^{2+} -oscillations were completely blocked by Gd^{3+} whereas blocking the intracellular Ca^{2+} -release or Ca^{2+} -channels did not lead to any changes. This clearly shows that the Ca^{2+} -influx exclusively goes through the LLO-pores. Gd^{3+} also blocks plasma membrane Ca^{2+} -ATPases thereby inhibiting Ca^{2+} -sequestration in LLO-induced Ca^{2+} -oscillations. This implies the importance of PMCA's in LLO-induced Ca^{2+} -oscillations.

7 Literaturverzeichnis

- Alexander SPH, Peters JA (1999) Receptor & Ion channel nomenclature
Supplement 10th Anniversary Edition.
Trends Pharmacol Sci
- Alouf JE (2000) Cholesterol-binding cytolytic protein toxins.
Int J Med Microbiol **290**: 351-356
- Alvarez-Dominquez E, Carasco-Marin F, Leyva-Cobian (1993). Role of
complement receptor C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by
murine macrophage-like cell lines.
Infect Immun **61**: 3664-3672
- Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ and Swanson JA (1997) pH-dependent
perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria*
monocytogenes.
J Exp Med **186**: 1159-1163
- Beedle AM, Hamid J and Zamponi GW (2002) Inhibition of transiently
expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent
metal cations.
J Membr Biol **187**: 225-238
- Berjukow S, Doring F, Froschmayr M, Grabner M, Glossmann H and
Hering S (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney
(HEK293) cells.
Br J Pharmacol **118**: 748-754
- Berridge MJ, Bootman MD and Lipp P (1998) Calcium: a life and death signal.
Nature **395**: 645-648
- Beuckelmann DJ and Wier WG (1989) Sodium - calcium exchange in
guinea-pig cardiac cells: exchange current and changes in intracellular
 Ca^{2+} .
J Physiol (Lond) **414**: 499-520
- Bielecki J, Youngman P, Connelly P and Portnoy DA (1990) *Bacillus*
subtilis expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can
grow in mammalian cells
Nature **345**: 175-176
- Billington SJ, Jost BH, and Songer JG (2000) Thiol-activated cytolysins:
structure, function and role in pathogenesis.
FEMS Microbiol Lett **182**: 197-205

- Butler S (2005). Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* und chromosomaler Punktmutanten induzierten Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen.
Dissertation aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen.
- Busselberg D, Evans ML, Rahmann H, Carpenter DO (1990) Zn²⁺ blocks the voltage activated calcium current of Aplysia neurons
Neurosci Lett **117** (1-2):117-22
- Brockmeier D (1991) HOEGIP-PC: An interactive program package for the evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data. User Manual.
Internal Report, Hoechst AG
- Brown DA and London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes.
Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-136
- Bryan-Lluka LJ and Bonisch H (1997) Lanthanides inhibit the human noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine transporters.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **355**: 699-706
- Carafoli E (1991) Calcium pump of the plasma membrane.
Physiol Rev **71**: 129-153
- Conlan JW and North RJ (1991) Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium.
J Exp Med **174**: 741-744
- Conlan, J.W. and North, R.J. (1994) Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody.
J Exp Med **179**: 259-268
- Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell.
Nature **422**: 37-44
- Cossart P and Lecuit M (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling.
Embo J **17**: 3797-3806
- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC and Berche P (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation.
Infect Immun **57**: 3629-3636

- Dabiri GA, Sanger JM, Portnoy DA and Southwick FS (1990) *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.
Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 6068-6072
- Domann E (1997) Pathogenitätsfaktoren von *Listeria monocytogenes*: Ein Beitrag zum Verständnis bakterieller Pathogenitätsmechanismen und zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten.
Habilitationsschrift aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Dramsi S and Cossart P (2002) Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite.
J Cell Biol **156**: 943-946
- Dramsi S and Cossart P (2003) Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line.
Infect Immun **71**: 3614-3618
- Erdmann G and Potel J (1953) [Listeriosis in newborn: granulomatosis infantiseptica, until now so-called pseudotuberculosis.].
Z Kinderheilkd **73**: 113-132
- Ferreira J, Tapia G and Videla LA (1998) Effects of the Kupffer cell inactivator gadolinium chloride on rat liver oxygen uptake and content of mitochondrial cytochromes.
FEBS Lett **426**: 263-265
- Fisher RA, Yates F (1963) Statistical Tables for biological, agricultural and medical research, Boyd & Oliver Ltd. Edinburgh S. 47 Tabelle IV
- Forth, Henschler, Rummel, Starke (2001) Pharmakologie und Toxikologie 8. Auflage, Urban-Fischer (Ort), S. 1038
- Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S and Sansonetti P (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2.
Infect Immun **55**: 2822-2829
- Gaillard JL and Finlay BB (1996) Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line.
Infect Immun. **64**: 1299-1308
- Galione A and Churchill GC (2002) Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores.
Cell Calcium **32**: 343-354

- Gao L and Abu Kwaik Y (2000) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens.
Microbes Infect **2**: 1705-1719
- Garcia ML, Hanner M and Kaczorowski GJ (1998) Scorpion toxins: tools for studying K⁺ channels.
Toxicon **36**: 1641-1650
- Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ and Garcia ML (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels.
J Biol Chem **268**: 18866-18874
- Gatto C and Milanick MA (1993) Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues.
Am J Physiol **264**: C1577-1586.
- Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG and Portnoy DA (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*.
Infect Immun **68**: 999-1003
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE and Berche P (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*.
Infect Immun **55**: 1641-1646
- Giddings KS, Johnson AE and Tweten RK (2003) Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins.
Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 11315-11320
- Gilbert RJ (2002) Pore-forming toxins.
Cell Mol Life Sci. **59**: 832-844.
- Gregory SH and Liu CC (2000) CD8⁺ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes.
Immunol Rev **174**: 112-122
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, *et al* (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*.
Mol Microbiol **20**: 119-126
- Hale ML, Margolin SB, Krakauer T, Roy CJ and Stiles BG (2002) Pirfenidone blocks the in vitro and in vivo effects of staphylococcal enterotoxin B.
Infect Immun **70**: 2989-2994

- Harvey PC and Faber JE (1941) Some biochemical reactions of the *Listerella* group.
J Bacteriol **41**:45-46
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflugers Arch **391**: 85-100
- Heuck AP, Tweten RK and Johnson AE (2001) Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins.
Biochemistry **40**: 9065-9073
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes, Third Edition
Sinauer Associates Inc. (Maryland, USA)
- Hoebeke J, Van Nijen G and De Brabander, M (1976) Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin.
Biochem Biophys Res Commun **69**: 319-324
- Holleman-Wiberg (1995) Anorganische Chemie 103. Auflage, de Gruyter Verlag (Berlin, New York).
- Huettner JE, Stack E and Wilding TJ (1998) Antagonism of neuronal kainate receptors by lanthanum and gadolinium.
Neuropharmacology **37**: 1239-1247
- Hugo F, Reichwein J, Arvand M, Kramer S and Bhakdi S (1986) Use of a monoclonal antibody to determine the mode of transmembrane pore formation by streptolysin O.
Infect Immun **54**: 641-645
- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD and Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11013-11018
- Kaufmann SH (1993) Immunity to intracellular bacteria.
Annu Rev Immunol **11**: 129-163
- Kayal S, Lilienbaum A, Poyart C, Memet S, Israel A and Berche P (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines.
Mol Microbiol **31**: 1709-1722
- Kayal S, Lilienbaum A, Join-Lambert O, Li X, Israel A and Berche P (2002) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappaB signalling by activating the I-kappaB kinase complex.
Mol Microbiol **44**: 1407-1419

- Löffler & Petrides: Biochemie und Pathobiochemie (1998) 6. Auflage,
Springer - Verlag (Berlin, Heidelberg, New York) S. 197
- Luo D, Broad LM, Bird GS and Putney JW jr (2001) Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in HEK293 cells.
J Biol Chem **276**: 5613-5621
- Ma JY and Narahashi T (1993) Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated chloride channel currents by lanthanides in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **13**: 4872-4879
- Madden JC, Ruiz N and Caparon M (2001) Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* **104**: 143-152
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T and Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca^{2+} release. *J Biochem (Tokyo)* **122**: 498-505
- Michelangeli F, Mezna M, Tovey S and Sayers LG (1995) Pharmacological modulators of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuropharmacology* **34**: 1111-1122
- Mlinar B and Enyeart JJ (1993) Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol (Lond)* **469**: 639-652
- Moore CL (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun* **42**: 298-305
- Moss AL and Ward WF (1991) Multiple pathways for ligand internalization in rat hepatocytes. I: Effects of anoxia, phenylarsine oxide and monensin. *J Cell Physiol* **149**: 313-318
- Murray EGD, Webb RA, Swann MBR (1926) A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.) *J Pathol Bacteriol* **29**: 407-439
- Narahashi T, Ma JY, Arakawa O, Reuveny E and Nakahiro M (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol* **14**: 599-621

- Nishibori T, Xiong H, Kawamura I, Arakawa M and Mitsuyama M (1996)
Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of
macrophages and NK cells.
Infect Immun **64**: 3188-3195
- Palasz A and 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
- Palmer M, Valeva A, Kehoe M and Bhakdi S (1995) Kinetics of
streptolysin O self-assembly.
Eur J Biochem **231**: 388-395
- Palmer M, Saweljew P, Vulicevic I, Valeva A, Kehoe M and Bhakdi S (1996)
Membrane-penetrating domain of streptolysin O identified by cysteine
scanning mutagenesis.
J Biol Chem **271**: 26664-26667
- Palmer M, Harris R, Freytag C, Kehoe M, Tranum-Jensen J and Bhakdi S (1998)
Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early
membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is
extended gradually during oligomerization.
Embo J **17**: 1598-1605
- Poenie M and Tsien R (1986) Fura-2: a powerful new tool for measuring
and imaging $[Ca^{2+}]_i$ in single cells.
Prog Clin Biol Res **210**: 53-56
- Portnoy DA, Tweten RK, Kehoe M and Bielecki J (1992) Capacity of
listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of
Bacillus subtilis within mammalian cells.
Infect Immun **60**: 2710-2717
- Randall AD (1998) The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel
diversity: is it time for T?
J Membr Biol **161**: 207-213
- Rangel-Gonzalez FJ, Garcia-Colunga J and Miledi R (2002) Inhibition of
neuronal nicotinic acetylcholine receptors by $La(3+)$.
Eur J Pharmacol **441**: 15-21
- Reinhart PH, Chung S and Levitan IB (1989) A family of calcium-
dependent potassium channels from rat brain.
Neuron **2**: 1031-1041

- Repp H, Pamukci Z, Koschinski A, Domann E, Darji A, Birringer J, *et al* (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca^{2+} -permeable pores leading to intracellular Ca^{2+} oscillations. *Cell Microbiol* **4**: 483-491
- Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK and Parker MW (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**: 685-692
- Schomacker K, Mocker D, Munze R and Beyer GJ (1988) Stabilities of lanthanide-protein complexes. *Int J Rad Appl Instrum [A]* **39**: 261-264
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL *et al* (1997) Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* **337**: 970-976
- Sekiya K, Danbara H, Yase K and Futaesaku Y (1996) Electron microscopic evaluation of a two-step theory of pore formation by streptolysin O. *J Bacteriol* **178**: 6998-7002
- Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE and Tweten RK (1999) The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* **99**: 293-299
- Shepard LA, Heuck AP, Hamman BD, Rossjohn J, Parker MW, Ryan KR *et al* (1998) Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **37**: 14563-14574
- Sill  en LG, Martell AE and Bjerrum J (1964) *Stability constants of metal-ion complexes*. London: Chemical Society
- Song SK, Karl IE, Ackerman JJ and Hotchkiss RS (1993) Increased intracellular Ca^{2+} : a critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3933-3937
- Spencer A, Wilson S, Harpur E (1998) Gadolinium chloride toxicity in the mouse. *Hum Exp Toxicol* **11**: 633-637
- Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ and Glossmann H (1998) Structural basis of drug binding to L Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 108-115

- Sullivan GW, Carper HT, Novick WJ, jr and Mandell GL (1988)
Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline.
Infect Immun **56**: 1722-1729
- Tang P, Rosenshine I, Cossart P and Finlay BB (1996) Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells.
Infect Immun **64**: 2359-2361
- The Merck index (2001) In Cambridge, Mass.: CambridgeSoft
- Theriot JA, Mitchison TJ, Tilney LG and Portnoy DA (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization.
Nature **357**: 257-260
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR and Fox AP (1988)
Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation.
Trends Neurosci **11**: 431-438
- Tweten RK, Parker MW and Johnson AE (2001) The cholesterol-dependent cytolysins.
Curr Top Microbiol Immunol **257**: 15-33
- Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, *et al* (2000) Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells.
Nature **405**: 694-697
- Urbanik E and Ware BR (1989) Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H.
Arch Biochem Biophys **269**: 181-187
- Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez Bernal, G., Goebel W, *et al* (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants.
Clin Microbiol Rev **14**: 584-640
- White MM, Aylwin M (1990) Niflumic acid and flufenamic acid are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in *Xenopus* oocytes.
Mol Pharmacology **37**: 720-4

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Geburtsdatum: 23.10.1977
- Geburtsort: Gross-Gerau
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig
- Eltern: Dr. med. Gerhard Bittenbring
FA für Neurologie und Psychiatrie
Karin Maly (Sekretärin)
- Geschwister: Julia, Lutz und Paul

SCHULAUUSBILDUNG

- Aug 1984 – Jul 1988 Grundschule
Grundschule am Treppenweg Erbach/Odenwald
- Aug 1988 – Jun 1997 Gymnasium
Gymnasium Michelstadt
- Jun 1997 Abitur
Note: 1,7

UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG

- Okt 1998 Beginn des Medizinstudiums
Justus-Liebig-Universität Gießen
- Sep 2000 Physikum
Note: 1,66
- Sep 2001 Erstes Staatsexamen
Note: 2,0
- Okt 2001 – Feb 2002 Auslandssemester mit Erasmus-Stipendium
Medical University of Warsaw/Poland, English
Division
- Mär 2004 Zweites Staatsexamen
Note: 1,66
- Mai 2005 Drittes Staatsexamen
Note: 1,0
- Juni 2005 Approbation

SONSTIGE TÄTIGKEITEN

- 1995 – 1997 Kassenwart des SV Vorstandes
Gymnasium Michelstadt
- Sep 1997 – Okt 1998 Zivildienst: Individuelle Schwerst-
behinderten Betreuung in der
Schule für Praktisch Bildbare“ in Erbach/Odw
- Jan 1996 – Mär 2005 Tätigkeit als Arzthelfer in der väterlichen Praxis
Praxis für Neurologie und Psychiatrie
Dr. med. Gerhard Bittenbring, Erbach/Odw
- Okt 2004 – Apr 2005 Lehrtätigkeit im Fach Chirurgie in der
Kinderkrankenpflegeschule am
Klinikum Bad Hersfeld

PUBLIKATIONEN

Pore Formation by Pneumolysin of *Streptococcus pneumoniae* leads to non-periodic intracellular calcium oscillations

Koschinski, P. Schramm, J. Bittenbring, S. Butler, E. Domann, A. Darji, T. Chakraborty, F. Dreyer and H. Repp
Naunyns Schmiedebergs Archives **371** Supplement

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 25.08.05

Jörg Thomas Bittenbring (Arzt)

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Florian Dreyer für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen, für die gute Betreuung und vor allem für die fortwährende Geduld bei der Korrektur der Arbeit. Ebenso möchte ich Dr. Holger Repp danken für die vielen Diskussionen und Informationen zur Pharmakologie an sich und auch für die Organisation der Arbeitsgruppenausflüge und die Gastfreundschaft seiner Familie und Herrn Dr. Andreas Koschinski für die Einführung in die Patch-Clamp- und Ca^{2+} -Imaging Methode. Meinen Doktoranden-Kollegen und Kolleginnen Jan Birringer, Anja Dodt, Patrick Schramm, Susanne Butler, Stanislaw Kaschinski, Brit Jacobus und Anke Bennert danke ich für die gute Zusammenarbeit. Brit danke ich insbesondere für die Übernachtungsmöglichkeit in Giessen. Frau Christiane Zibuschka danke ich für die Einführung in die Zellkultur und auch für die Vorbereitung der Listerien bei so einigen Versuchen. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Brockmeier für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Mein Dank gilt auch den Kooperationspartnern der Mikrobiologie Herrn PD Dr. Eugen Domann, Dr. Ayub Darji und Frau Sylvia Krämer. And thanks to Sanchaita Sonar for being one of my best friends and for helping me to learn English and some Indian culture.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma Gertrud, ohne die ich nicht bis hierhin gekommen wäre. Und ein ganz besonderes Dankeschön an meine Freundin Amelie für ihre Geduld mit mir.