

**Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische
Beeinflussung von durch Pneumolysin aus *Streptococcus
pneumoniae* gebildeten Poren**

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

vorgelegt von Patrick Schramm
aus Frankfurt am Main

Gießen 2004

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Gf. Direktor: Professor Dr. H. Schmidt

Gutachter: Professor Dr. F. Dreyer

Gutachter: PD Dr. A. Scholz

Tag der Disputation: 24.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufgabenstellung	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Zelllinien und Zellkultur	6
2.2	Patch-Clamp-Experimente	7
2.2.1	Vorbereiten der Zellen	7
2.2.2	Der Patch-Clamp-Messstand und die Patch-Clamp-Messung	8
2.2.3	Applikation und Badperfusion	9
2.2.4	Verwendete Lösungen	11
2.2.5	Korrektur der Liquid-Junction-Potentiale	12
2.2.6	Osmolalitäten	12
2.3	Substanzen	13
2.3.1	Pneumolysin	13
2.3.2	Thapsigargin	13
2.3.3	Cholesterol-Oxidase und Methyl-Beta-Cyclodextrin	14
2.3.4	Substanzen zur möglichen Blockade der Pneumolysin-Porenströme	14
2.3.5	Feinchemikalien	16
2.4	Statistische Auswertung und Darstellung	16

3	Ergebnisse	17
3.1	Elektrophysiologische Eigenschaften von HEK293-Zellen	17
3.2	Charakterisierung der durch Pneumolysin gebildeten Poren	18
3.2.1	Porenbildung durch Pneumolysin in der Zellmembran von HEK293-Zellen	18
3.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung durch Pneumolysin	21
3.2.3	Elementare Ströme der Pneumolysin-Poren	24
3.2.4	pH-Abhängigkeit der Kinetik der Pneumolysin-Poren	26
3.2.5	Selektivität der Pneumolysin-Poren	27
3.2.6	Ca ²⁺ -Leitfähigkeit der Pneumolysin-Poren und Aktivierung Ca ²⁺ -abhängiger, spannungsunabhängiger K ⁺ -Kanäle durch Pneumolysin	30
3.2.7	Verlauf der Porenbildung nach Austausch der Pneumolysin-haltigen Extrazellulärlösung gegen Pneumolysin-freie Extrazellulärlösung	34
3.2.8	Cholesterolabhängigkeit der Pneumolysin-Wirkung	34
3.3	Pneumolysin-Wirkung an NIH3T3- und BV2-Zellen	38
3.3.1	NIH3T3-Zellen	38
3.3.2	BV2-Zellen	39
3.4	Experimente zur Blockade des Pneumolysin-Porenstroms	41
3.4.1	Substanzen ohne blockierenden Effekt auf den Pneumolysin-Porenstrom	41
3.4.2	Substanzen mit blockierenden Effekt auf den Pneumolysin-Porenstrom	43
4	Diskussion	52
5	Literaturverzeichnis	62
	Zusammenfassung	67
	Summary	68
	Danksagung	69
	Lebenslauf	70

1 Einleitung

Bakterien der Spezies *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) sind α -hämolyisierende, grampositive, fakultativ anaerobe Diplokokken. Die humanpathogenen Pneumokokken haben eine Kapsel und bilden auf Nährböden schleimige Kolonien (s-Formen). Pneumokokken besiedeln den oberen Respirationstrakt von 30-70 % gesunder Menschen. Klinisch manifeste Infektionen sind meist endogenen Ursprungs bei reduzierter Immunabwehr. Pneumokokken führen besonders bei kleinen Kindern, älteren Personen, splenektomierten Patienten und bei Immunsuppression zu Pneumonie, Meningitis oder Sepsis. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts sterben in Deutschland mindestens 4000-8000 Menschen pro Jahr an invasiven Pneumokokken-Infektionen (Ley 2000). Unter invasiven Infektionen versteht man das Durchbrechen der Mucosa-Schranke durch den Krankheitserreger, bei nicht-invasiven Infektionen bleibt die Mucosa-Schranke intakt (z. B. Bronchitis, Otitis media, Sinusitis). Mittel der Wahl zur Therapie einer Pneumokokken-Infektion ist Penicillin, allerdings existieren in Südeuropa bereits zahlreiche Penicillin-resistente Serotypen.

Um neue Behandlungskonzepte oder Impfstoffe zu entwickeln, ist es wichtig, die Virulenzfaktoren und deren Pathomechanismen zu kennen und zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Pneumokokken-Virulenzfaktor Pneumolysin (Ply) untersucht. Ply gehört zur Familie der Cholesterol-abhängigen Toxine (CDC=cholesterol-dependent cytolysins). Die CDC haben alle eine ähnliche Aminosäuresequenz mit einer 11 Aminosäuren langen, fast homologen Kette (Undecapeptid). Die meisten der CDC weisen im Undecapeptid die Aminosäure Cystein auf, die mit ihren Thiolgruppen Disulfidbrücken bilden kann und so zu einer Aktivierung der Toxine führt. Dieses Cystein ist nicht essentiell für den durch die Porenbildung ausgelösten cytolytischen Effekt. Mit Pyolysin und Intermedilysin (Tab. 1) wurden zwischenzeitlich CDC-Vertreter entdeckt, die kein Cystein im Undecapeptid haben. Aus diesen Gründen wurde die früher gebräuchliche Gruppenbezeichnung Thiol-aktivierte-Cytolysine in CDC geändert (Alouf 2000; Nagamune *et al.* 2000; Shepard *et al.* 2000; Palmer 2001). Gemeinsam ist allen Toxinen dieser Gruppe die Bildung von Poren in cholesterolhaltigen Membranen

(Rossjohn *et al.* 1998; Kelly & Jedrzejak 2000). Diese Porenbildung wurde allerdings für die meisten Toxine aus der CDC-Familie aus ihren cytolytischen Effekten indirekt hergeleitet (häufig aus der beobachteten Lyse von Erythrocyten) oder aufgrund von beobachteten Ringstrukturen, die in elektronenmikroskopischen Bildern von mit CDC inkubierten Zellmembranen gesehen wurden (Billington *et al.* 2000). Zur Familie der CDC gehören zahlreiche Toxine von grampositiven Bakterien, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind.

Tabelle 1: Auflistung der bekannten CDC (entnommen aus Billington *et al.* 2000)

Organismus	Toxin	Abkürzung
<i>Arcanobakterium pyogenes</i>	Pyolysin	PLO
<i>Bacillus cereus</i>	Cereolysin	CLY
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Thuringiolysin O	
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Laterosporolysin	
<i>Clostridium bifermentans</i>	Bifermentolysin	
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinolysin	
<i>Clostridium chauvoei</i>	Chauveolysin	
<i>Clostridium histolyticum</i>	Histolyticolysin	
<i>Clostridium novyi</i> typ A	Oedematolysin	
<i>Clostridium perfringens</i>	Perfringolysin O	PFO
<i>Clostridium septicum</i>	Septicolysin O	
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanolysin	
<i>Listeria ivanovi</i>	Ivanolysin O	ILO
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolysin O	LLO
<i>Listeria seeligeri</i>	Seeligerilysin O	LSO
<i>Paenibacillus alvei</i>	Alveolysin	ALY
<i>Streptococcus canis</i>	Streptolysin O	SLO
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Streptolysin O	SLO
<i>Streptococcus intermedius</i>	Intermedilysin	ILY
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolysin	Ply
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptolysin O	SLO
<i>Streptococcus suis</i>	Suilysin	Sly

Als Strukturmodell für die CDC dient Perfringolysin O, dessen kristallographische Strukturanalyse kürzlich gelungen ist (Abb. 1). Es besitzt 4 Domänen, wobei die Domäne 3 zwei transmembrane Helices (TMH1+2) besitzt (Billington *et al.* 2000). Diese dienen der Verankerung des Moleküls in der Zellmembran. Das Undecapeptid befindet sich am Ende der 4. Domäne und spielt eine Rolle bei der Cholesterolbindung und der Membraninsertion. Die Domänen 1 und 3 sind für die

Oligomerisation verantwortlich, wobei die Domäne 3 den transmembranären Abschnitt bildet (Billington *et al.* 2000).

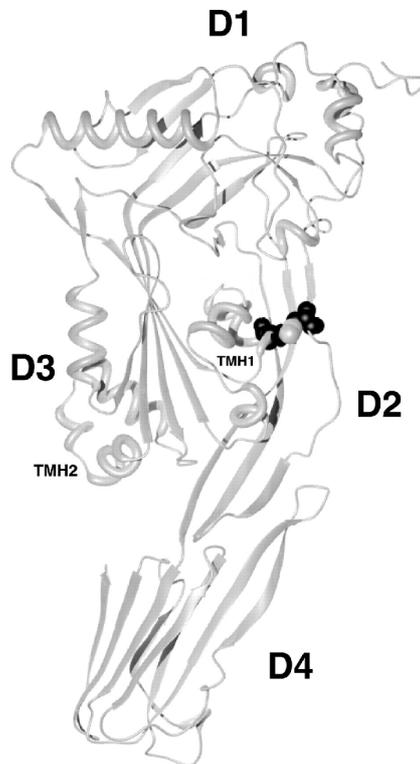


Abbildung 1: Strukturmodell von Perfringolysin O als Modell für die CDC. **D 1-4** kennzeichnet die vier Domänen und **TMH1+2** die zwei transmembranären Helices (Hotze *et al.* 2001).

Pneumolysin setzt sich aus 471 Aminosäuren zusammen und hat eine relative Molmasse von 59 kDa. Es wird angenommen, dass Cholesterin nicht nur ein Bindungspartner für Ply ist, sondern zusätzlich als allosterischer Aktivator des Toxins dient (Palmer *et al.* 1998; Abdel Ghani *et al.* 1999). Die Bindung von Ply an Cholesterin führt zu einer Konformationsänderung des Ply. Es kommt durch eine Umwandlung von β -Faltblatt Strukturen zu einer Zunahme der Lipophilie des Ply-Moleküls (Kelly & Jedrzejewski 2000).

Viele der CDC besitzen ein Signalpeptid, das der Freisetzung von CDC aus dem intakten Bakterium dient (Walker *et al.* 1987). Eine Besonderheit von Ply ist das Fehlen dieses Sekretions-Peptids. Daher ist der Mechanismus der Freisetzung von Ply aus dem intakten Bakterium unbekannt. Es wurde vermutet, dass Ply lediglich

durch eine Zerstörung des Bakteriums freigesetzt wird. Dies wurde dem Virulenzfaktor Autolysin (LytA) und exogenen Einflüssen wie Antibiotikatherapie zugeschrieben. Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Freisetzung von Ply unabhängig von der Zerstörung der Pneumokokken erfolgt (Balachandran *et al.* 2001).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die mit sehr hohen Ply-Konzentrationen durchgeführt wurden, konnten in der Zellmembran porenähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Diese Strukturen mit einem Innendurchmesser von bis zu 30 nm wurden als Ansammlung von 50 und mehr Ply-Molekülen interpretiert (Bonev *et al.* 2000; Palmer 2001).

Ply ist essentiell für eine Infektion durch Pneumokokken (Wellmer *et al.* 2002). Es ist bekannt, dass hohe Ply-Konzentrationen zur Zelllyse führen. Besonders die Zerstörung von Epithelzellen ermöglicht den Bakterien die Penetration in den Wirtsorganismus. Weitere Zelllyse unterstützt die Ernährung und Ausbreitung der Bakterien in ihrem Wirt. Allerdings sind in den letzten Jahren mehrere Ply-Effekte entdeckt worden, die durch sublytische Ply-Konzentrationen ausgelöst werden. Am Beispiel der Meningitis werden drei schädigende Vorgänge der Pneumokokken dargestellt. Es kommt zu (1) einer systemischen Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Leukozyten in den Subarachnoidalraum mit der Folge von Vaskulitis und Hirnödem, (2) einer lokalen Aktivierung der Mikroglia und (3) einer direkten zellschädigenden Wirkung durch die Bakterientoxine (Nau & Bruck 2002). Bei allen drei Prozessen spielt Ply eine wichtige Rolle. Diese Wirkungen können pharmakologisch noch nicht beeinflusst werden. So erklären sich auch die Beobachtungen, dass Antibiotika nur einen geringen Effekt auf die Entzündungsreaktion haben (Nau & Bruck 2002). Nach Lyse der Pneumokokken infolge der Antibiotika kommt es zu einer massiven Freisetzung von Ply, das auch dann noch eine zellschädigende Wirkung ausüben kann, wenn die Pneumokokken abgetötet sind.

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode die Porenbildung durch Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* erstmals direkt beobachtet und elektrophysiologisch charakterisiert werden (Repp *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte nun die porenbildende Wirkung von gereinigtem Pneumolysin (Ply) elektrophysiologisch charakterisiert werden.

Abgesehen von der Lyse der Zellen werden noch weitere Ply-Wirkungen beschrieben. Ply bindet an den F_c-Teil von IgG und aktiviert dadurch das Komplement-System über den klassischen Weg. Die vermehrte und ungezielte Aktivierung der Komplementkaskade führt zu einer verminderten Konzentration an bindungsfähigen Komplement-Molekülen im Serum (Alcantara *et al.* 2001). Komplement dient der Opsonierung von Bakterien, die dadurch besser von Granulozyten phagozytiert werden. Die verminderte Konzentration von Komplement bedingt eine geringere Opsonierung und ein Umgehen der körperlichen Abwehr. Auch eine Aktivierung der p38 MAPK-Signalkaskade durch Ply und eine Auslösung der Apoptose in Zielzellen wurde beschrieben (Stringaris *et al.* 2002). Ply hemmt die Proliferation und die Antikörperbildung der Lymphocyten. Außerdem hemmt es die antibakteriellen Reaktionen von Makrophagen (Billington *et al.* 2000).

1.1 Aufgabenstellung

Meine Aufgabe war zunächst, die porenbildende Wirkung von gereinigtem Pneumolysin eingehend elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells) zu charakterisieren. Anschließend sollte geprüft werden, ob sich die porenbildende Potenz von Ply durch Variation des pH-Wertes der Extrazellulärlösung ändert. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse wurde dann die Ca²⁺-Leitfähigkeit der Ply-Poren und die dadurch auftretenden Veränderungen an den Zielzellen näher untersucht. Eine weitere Aufgabe war die Untersuchung der Cholesterolabhängigkeit der Ply-Porenbildung bei sublytischen Ply-Konzentrationen. Außerdem sollte die Ply-Wirkung an BV2-Zellen untersucht werden. BV2-Zellen sind Mikrogliazellen und daher ein Vertreter für die bei einer Pneumokokken-Meningitis betroffenen Zellen. Die abschließende Aufgabe war die Suche nach Substanzen, die Ply-Poren blockieren können. Bisher sind für Toxine aus der CDC-Familie noch keine Porenblocker bekannt. In die Suche wurden vor allem Substanzen einbezogen, von denen eine Beeinflussung von Ionenkanälen bekannt ist, sowie Substanzen, die als Pharmaka klinisch eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Zellkultur

Es wurden mehrere Zelllinien verwendet: 1. HEK293-Zellen, die Abkürzung steht für Human Embryonic Kidney Zellen. Sie sind für elektrophysiologische Experimente zur Untersuchung der Porenbildung gut geeignet, da sie nur eine geringe Aktivität endogener Ionenkanäle aufweisen. Das Nährmedium für HEK293-Zellen bestand aus einer 1:1 Mischung aus Dulbecco modified eagle's medium (DMEM) mit Ham's F12, dem 10 % FKS (fetales Kälberserum) und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurden. 2. Zur Messung des Einflusses der Porenbildung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurden HEK293-Zellen eingesetzt, die mit dem Gen des humanen Ca^{2+} -abhängigen, spannungsunabhängigen K^+ -Kanals mittlerer Leitfähigkeit Nr. 4 (hSK4, auch hIK1 oder Gardos-Kanal genannt) stabil transfiziert worden waren (Repp *et al.* 2002). Der K^+ -Strom, der durch die Aktivierung der hSK4-Kanäle entsteht, kann als Indikator für eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration benutzt werden. Auf dem Transfektionsvektor für den hSK4-Kanal befindet sich zusätzlich ein Gen für eine Geneticin-Resistenz. Dieses Resistenzgen führt zu einer Unempfindlichkeit der transfizierten Zellen gegenüber Geneticin. Zur Elimination nicht mutierter, d. h. nicht mehr Geneticin-resistenter Zellen wurde dem normalen HEK293-Nährmedium 400 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin zugegeben. 3. Bei NIH3T3-Zellen handelt es sich um Mäusefibroblasten. NIH3T3-Zellen haben einen endogenen Ca^{2+} -abhängigen, spannungs-unabhängigen K^+ -Kanal, der die gleichen Eigenschaften wie der hSK4-Kanal hat. Als Nährmedium diente DMEM mit 5% neonatalem Kälberserum und 2 mM Glutamin. 4. Um die Wirkung von Pneumolysin (Ply) an Zellen zu untersuchen, die bei einer Pneumokokken-Infektion des ZNS betroffen sind, wurden BV2-Zellen eingesetzt. BV2-Zellen sind Mikrogliazellen, die aus neugeborenen Mäusen gewonnen wurden. Die mit den Makrophagen verwandten Mikrogliazellen haben die Fähigkeit zur Phagozytose und dienen der Infektionsabwehr im ZNS. BV2-Zellen wurden in DMEM, dem 10% neonatales Kälberserum und 2 mM Glutamin zugefügt wurden, kultiviert.

Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Partialdruck von 6% im Inkubator (CO₂-Inkubator 6220, Fa Heraeus, Hanau) in Petrischalen mit einem Durchmesser von 94 mm (Greiner GmbH, Nürtingen) kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Die Passage erfolgte nach einem Standardprotokoll, das ausführlich in der Dissertation von Dr. A. Koschinski beschrieben wurde (Koschinski 2001).

2.2 Patch-Clamp-Experimente

2.2.1 Vorbereiten der Zellen

Die Zellen wurden 48 h vor den elektrophysiologischen Experimenten in Petrischalen (Durchmesser 35mm) ausgesät. Dazu wurden 2 ml Nährlösung vorgelegt und 1-2 Tropfen einer Zellsuspension ($\sim 2 \times 10^5$ Zellen pro Schale) dazu pipettiert. Am Messtag enthielten diese als Messkammer benutzten 35 mm-Petrischalen sowohl einzeln liegende Zellen als auch kleine Zellgruppen. Wegen unterschiedlicher Adhärenz am Schalenboden wurden NIH3T3-Zellen am Messstand anders vorbereitet als HEK293- und BV2-Zellen. Die HEK293- und BV2-Zellen wurden kurz vor der Messung aus dem Inkubator genommen, die Nährlösung wurde abgegossen und die Zellen vorsichtig mit Extrazellulärlösung gespült. Dann wurden 2 ml Extrazellulärlösung auf die Zellen gegeben (Tab. 1) und nach 5-10 Minuten „Ruhezeit“ wurde mit der Messung begonnen. NIH3T3-Zellen haften stärker am Schalenboden als die beiden anderen Zelllinien und sind flacher. Die flachen Zellen sind für elektrophysiologische Messungen schwerer zugänglich. Daher wurden die Zellen zunächst mit Extrazellulärlösung gespült. Dann wurde 2 ml PBS (Phosphate buffered solution) mit Trypsin (0,5 g/l) auf die Zellen gegeben, um Adhäsionsproteine zu spalten. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde das Abrunden der Zellen abgewartet, das PBS abgegossen und die Zellen mit Extrazellulärlösung gespült. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei den HEK293-Zellen beschrieben. Zur Messung wurden runde, einzeln liegende Zellen mit einer gleichmäßigen Zellbegrenzung und ohne sichtbare Kontakte zu anderen Zellen ausgewählt.

2.2.2 Der Patch-Clamp-Messtand und die Patch-Clamp-Messung

Die für die elektrophysiologischen Experimente benutzten Mikropipetten wurden jeweils unmittelbar am Messtag aus Glaskapillaren mit einem Horizontalpuller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instruments Co, USA) hergestellt und feuerpoliert (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen).

Die Experimente wurden an einem Patch-Clamp-Messtand durchgeführt, der gegenüber äußeren elektrischen Einflüssen von einem Faraday-Käfig umgeben war. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau. Die Zellen in den 35 mm-Schalen befanden sich im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Solms), dessen thermoregulierte Messkammerhalterung Messungen bei verschiedenen Temperaturen ermöglichte (Temperatur Control System, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). Die Patchpipette wurde mit einem elektromechanischen Mikromanipulator an die Zelle geführt. Um Über- bzw. Unterdruck in der Mikropipette zu erzeugen, wurde diese mit einer 50 ml Spritze über ein Mess- und Kontrollsystem verbunden.

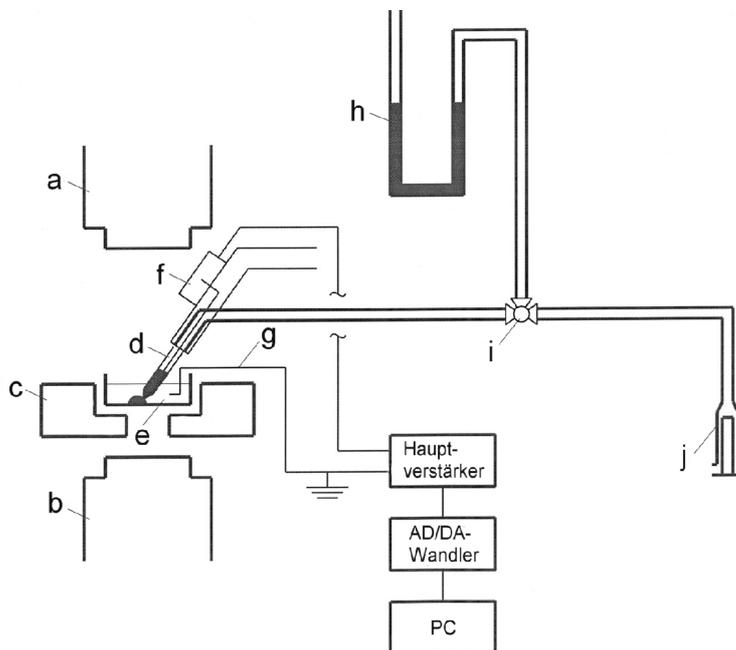


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Patch-Clamp-Messtandes. a: Kondensator, b: Objektiv; c: Halterung für die Petrischale und Pethier-Elemente; d: Patchpipette mit Intrazellulärlösung und Ableitelektrode; e: Petrischale als Messkammer mit Zellen und Extrazellulärlösung; f: Vorverstärker; g: Badelektrode; h: Druckmessung mit Wassersäule zur Kontrolle und Steuerung von Über- bzw. Unterdruck in der Patchpipette; i: Drei-Wege-Hahn; j: Spritze zur Erzeugung von Unter- bzw. Überdruck an der Patchpipette.

Die Membranströme wurden direkt an der Messkammer von einem Vorverstärker aufgenommen und in Spannungssignale umgewandelt. Damit die Membranpotentiale der Zellen nicht zusammenbrechen, hat der Vorverstärker einen sehr hohen Eingangswiderstand. Der Patch-Clamp-Verstärker (EPC-8, List Electronics GmbH, Darmstadt) dient zum einen der Aufnahme der Messsignale und zum anderen der Regelung der Membranpotentiale bzw. des Membranstroms. Zur Verarbeitung wurden die Signale über einen Analog/Digital-Wandler digitalisiert an einen PC geleitet. Die Digitalisierungsfrequenz lag bei 333 Hz, die Filterfrequenz lag bei 100 Hz. Die Experimente wurden mit dem Programm Pulse + PulseFit (v8.50, HEKA Electronic, Lambrecht) gesteuert und ausgewertet.

Zur Messung wurde die Patchpipette mit leichtem Überdruck, um das Anheften von kleinen Partikeln an der Pipettenspitze zu vermeiden, in die Extrazellulärlösung getaucht. Der elektrische Widerstand der Pipette wurde ständig durch einen Testpuls von 10 mV und Messen des dabei fließenden Stroms kontrolliert. War die Pipette frei in der Lösung, registrierte man einen Widerstand von 7-12 M Ω . Durch den Überdruck an der Pipettenspitze wurde die Zellmembran bei Annäherung leicht eingedellt, wobei der gemessene Widerstand um mehrere 100 k Ω zunahm. Durch Wegnahme des Überdrucks näherte sich die Zellmembran an die Mikropipette und es entstand eine enge Verbindung zwischen der Zellmembran und der feuerpolierten Patchpipette. Dabei stieg der Widerstand auf 2-20 G Ω an (Hamill *et al.* 1981). Nun wurde bei leichtem Unterdruck ein Spannungsimpuls von -950 mV für 100 μ s gegeben und so die Membran durchbrochen. Die Patchpipette mit der Ableitelektrode war dadurch leitend mit dem Zytoplasma der Zelle verbunden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich diese sog. Whole-Cell-Konfiguration verwendet. Alle Experimente wurden bei einer Badtemperatur von 21°C durchgeführt.

2.2.3 Applikation und Badperfusion

Das Toxin Pneumolysin (Ply) und die untersuchten Substanzen wurden mit einer Kolbenhubpipette (Eppendorf, Hamburg) in die Nähe der gemessenen Zellen direkt in die Badlösung appliziert. In einigen Experimenten wurde die Extrazellulärlösung mittels einer Badperforationsanlage ausgetauscht (Abb. 3).

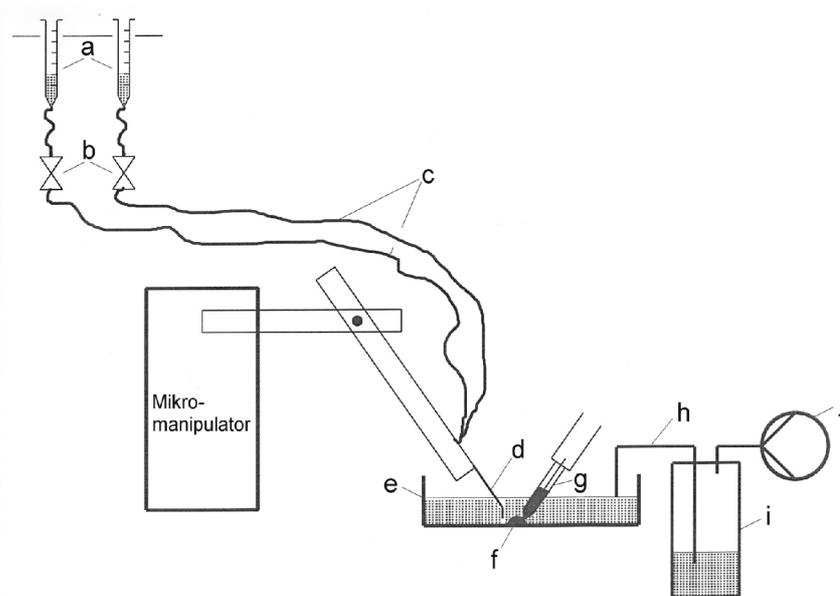


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Badperfusion. a: Vorratsgefäße für Extrazellulärlösungen; b: Schlauchklemmen; c: Schlauchleitung; d: Ausströmdüse; e: Messkammer; f: gemessene Zelle; g: Patchpipette; h: Absaugschlauch auf dem Niveau von 2 ml Badlösung; i: Auffanggefäß mit Flüssigkeitsfalle; j: Pumpe.

Hierzu wurde ein Zulauf mit Extrazellulärlösung und eine Absaugung an die Messkammer angeschlossen. Eine 5 ml Spritze als Vorratsgefäß war über Polyethylenschläuche mit der Ausströmdüse, einer Injektionskanüle (0,5 mm Innendurchmesser) verbunden. Die Ausströmdüse wurde mit einem mechanischen Mikro-manipulator (Leitz, Wetzlar) in die Nähe der gemessenen Zelle gebracht. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde mit Schlauchklemmen und über die Höhe der Vorratsgefäße gesteuert. Messungen mit einer Farbstofflösung zeigten, dass innerhalb von wenigen Sekunden die Zellen in der Nähe der Ausströmdüse vollständig von der Farbstofflösung umgeben waren. In einigen Experimenten wurde das Toxin Ply kontinuierlich über die Badperforationsanlage appliziert. Als Vorratsgefäß für die Ply-haltige Extrazellulärlösung diente eine 0,5 ml Insulin-Spritze, die über einen Polyethylenschlauch mit der Ausströmdüse verbunden war. Das Volumen im Bad wurde durch eine Absaugung konstant bei 2 ml gehalten. Als Vakuumpumpe diente eine Aquariumpumpe mit einer Flüssigkeitsfalle. Die Austauschgeschwindigkeit lag je nach Experiment bei 0,5 bis 1,0 ml/min.

2.2.4 Verwendete Lösungen

Die in den Experimenten verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen sind in Tabelle 2 und 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Extrazellulärlösungen

A: physiologische Extrazellulärlösungen:

Name	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂	Glucose	HEPES	PIPES
E ₁	140	3	2	2	-	15	10	-
E _{1Ba}	140	3	2	-	2	15	10	-
E _{pH6,5}	140	3	2	2	-	15	-	10

Alle, in Bezug auf Na⁺ und K⁺ physiologischen Extrazellulärlösungen wurden mit einer NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,35 bzw. 6,5 eingestellt. Dies erhöhte die Na⁺-Konzentration auf 144 mM. Es wurden folgende Puffer eingesetzt: HEPES mit einem pH-Bereich von 6,8-8,2 (pK 7,5) und PIPES mit einem pH-Bereich von 6,1-7,5 (pK 6,8).

E₁: Standard Extrazellulärlösung, E_{pH6,5}: Extrazellulärlösung mit pH=6,5, E_{1Ba}: Extrazellulärlösung mit Ba²⁺ anstelle von Ca²⁺.

B: nichtphysiologische Extrazellulärlösungen:

Nam e	MgCl ₂	CaCl ₂	Cholin-Cl	TEA-Cl	Arginin-Cl	Glucose	HEPES	pH-Wert- Einstellung
E _{Chol}	2	2	143	-	-	15	10	3 mM KOH
E _{TEA}	-	-	-	150	-	15	10	1 mM KOH
E _{Arg}	-	-	-	-	150	15	10	1 mM HCl

Alle nichtphysiologischen Extrazellulärlösungen wurden auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. E_{chol}: Extrazellulärlösung mit Cholinchlorid, E_{TEA}: Extrazellulärlösung mit Tetraethylammonium-Chlorid, E_{Arg}: Extrazellulärlösung mit Arginin-Chlorid.

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

Tabelle 3: Intrazellulärlösungen

Nam e	KGlu	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	Glucose	HEPES	KCl	Arg-Glu
Ibl ₁₀₀	140	20	2	29,62 µM	0,1	15	10	-	-
Ibl ₀	140	20	2	0	0,1	15	10	-	-
I _{KCl}	-	-	-	-	-	-	10	150	-
I _{Arg}	-	-	-	-	-	-	10	-	150

Alle Intrazellulärlösungen (Ibl_x) wurden mit einer KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. Dies erhöhte die K⁺-Konzentration auf 144 mM. Ibl_x: physiologische Intrazellulärlösungen mit BAPTA, low buffered. Die freie Ca²⁺-Konzentration beträgt 100 nM bei Ibl₁₀₀ und nominell 0 bei Ibl₀ (Koschinski 2001). I_{KCl}: nichtphysiologische Intrazellulärlösung mit KCl; I_{Arg}: nichtphysiologische Intrazellulärlösung mit Arginin-Chlorid.

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

2.2.5 Korrektur der Liquid-Junction-Potentiale

Bei Verwendung unterschiedlicher Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen bildet sich durch deren unterschiedlichen Beweglichkeiten an der Spitze der Patchpipette, im Sinne eines Donnan-Potentials, ein so genanntes Liquid-Junction-Potential aus (Barry & Lynch 1991; Neher 1992). Es musste daher ein Korrekturwert von -10 mV zu den Membranpotentialen dazugerechnet werden, wenn die Intrazellulärlösungen Ibl₁₀₀ und Ibl₀ verwendet wurden.

2.2.6 Osmolalitäten

Zellen reagieren auf Osmolalitätsunterschiede zwischen intra- und extrazellulären Lösungen durch Schwellung bzw. Schrumpfung. Ein Osmolalitätsunterschied muss deshalb ausgeglichen werden. Die Osmolalität aller verwendeten Lösungen wurde mit einem Kryo-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) gemessen und die Extrazellulärlösungen mit Sorbitol auf die höhere Osmolalität der Intrazellulärlösungen (305-318 mosmol/kg) eingestellt. Sorbitol wurde in der entsprechenden Extrazellulärlösung angesetzt.

2.3 Substanzen

2.3.1 Pneumolysin

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, hochgereinigte Ply wurde uns von Professor Dr. T. Chakraborty und seinem Mitarbeiter Dr. A. Darji (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Ply-Konzentrationen der von uns benutzten Chargen betragen 485 µg/ml (Charge I) und 450 µg/ml (Charge II).

Proteine neigen dazu, sich durch elektrostatische Anziehung an den Wänden von Probengefäßen anzulagern. Dies würde besonders bei den verwendeten Ply-Konzentrationen im ng/ml Bereich zum deutlichen Substanzverlust aus der Lösung an die Gefäßwände führen. Um dies zu verhindern, wurde den Toxinlösungen fettsäurefreies Rinderalbumin (FAF-BSA = fatty acid free bovine serum albumin, Firma Sigma) zugesetzt, wodurch unspezifische Bindungsstellen an den Wänden der Probengefäße und Messkammern abgesättigt werden. Das FAF-BSA wurde den Lösungen in 5 g/l zugegeben. Bei einem applizierten Volumen von 50 µl in 2 ml Badvolumen betrug die Endkonzentration von FAF-BSA dann 125 mg/l. In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass FAF-BSA selbst keine Wirkung auf die Membranströme der untersuchten Zellen hat.

2.3.2 Thapsigargin

Im Rahmen der Experimente zur Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde die mögliche Beteiligung der Ca^{2+} -Speicher des sarko/endoplasmatischen Retikulums geprüft. Dazu wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher mit Hilfe von Thapsigargin (Sigma, Taufkirchen) „entleert“. Es handelt sich dabei um einen potenten, membranpermeablen Blocker der mikrosomalen Ca^{2+} -ATPase. Durch Hemmung dieses Enzyms wird die ATP-abhängige Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher verhindert. Ca^{2+} tritt physiologischerweise und signalgesteuert aus den intrazellulären Speichern aus. Da das Ca^{2+} unter Thapsigargin nicht mehr aufgenommen werden kann, kommt es indirekt zur Entleerung dieser Ca^{2+} -Speicher (Takemura *et al.* 1990). Thapsigargin wurde eine Stunde vor dem jeweiligen Experiment in einer Endkonzentration von 100 µM dem Zellkulturmedium bei 37°C zugegeben.

2.3.3 Cholesterol-Oxidase und Methyl-Beta-Cyclodextrin

Um den Einfluss von Cholesterol in der Zellmembran auf die Ply-Porenbildung zu untersuchen, wurde die Cholesterolkonzentration in der Membran verringert. Hierzu wurden zum einen das Enzym Cholesterol-Oxidase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) und zum anderen das Methyl-Beta-Cyclodextrin (M β CD) (Sigma) verwendet. Die Cholesterol-Oxidase oxidiert in der Membran befindliches Cholesterol, ohne dabei die Fluidität der Membran stark zu beeinflussen (Gimpl *et al.* 1997). Das M β CD extrahiert Cholesterol reversibel aus der Zellmembran und bildet mit dem Cholesterol Micellen. Es entsteht ein Gleichgewicht zwischen dem Cholesterol in der Zellmembran und in den Micellen (Gimpl *et al.* 1997).

2.3.4 Substanzen zur möglichen Blockade der Ply-Porenströme

Eine Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war, Substanzen zu suchen, die Ply-Poren hemmen. In Tabelle 4 sind die getesteten Substanzen alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 4: Substanzen zur möglichen Beeinflussung von Ply-Poren

Substanz (Name, Firma)	Mw (g/mol)	Wirkstoffgruppe/Wirkungsmechanismus
Acetylsalicylsäure (ASS, Sigma)	180,0	nichtsteroidales Antiphlogistikum
Aluminium (AlCl ₃ , Sigma)	133,3	Element der III. Hauptgruppe
Amantadin (Sigma)	187,7	NMDA-Rezeptorenblocker
Amitryptillin (Saroten [®] , Bayer)	277,4	Tricyclisches Antidepressivum, blockiert Rezeptoren des Typs 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₃ , α_1 , α_2 , H ₁ , mACh, Na ⁺ -Kanäle sowie Transporter für Noradrenalin und Serotonin
Biperiden (Akineton [®] , Knoll)	311,5	m-ACh-Rezeptor-Antagonist
Certoparin (MonoEmbolex [®] , Novartis)		Thromboseprophylaktikum
Charybdotoxin (ChTX, Latoxan)	4296	blockiert Ca ²⁺ -abhängige und spannungsabhängige sowie spannungsunabhängige K ⁺ -Kanäle
Cis-Atracurium (Nimbex [®] , GlaxoSmithKline)	1244	nicht-depolarisierendes Muskelrelaxanz
Clotrimazol (Sigma)	345,0	Antimykotikum, blockiert K ⁺ -Kanäle
Cromoglicinsäure (Sigma)	512,3	Cl-Kanal-Blocker

Substanz (Name, Firma)	Mw (g/mol)	Wirkstoffgruppe/Wirkungsmechanismus
Dantrolen (Dantrolen [®] , Procter & Gamble Pharma))	314,3	myotropes Muskelrelaxans, blockiert intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung
Diazepam (Valium [®] , Roche)	284,7	Benzodiazepin
DIDS (4,4'-Diisothiocyanato-Stilbene-2,2'-Disulfon Säure, Sigma)	499,0	hemmt spannungsabhängige Cl ⁻ -Kanäle
Digoxin (Novodigal [®] , Lilly)	780,9	Hemmung der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
Dimetinden (Fenistil [®] , Novartis)	292,4	Antihistaminikum
EDTA (Merck)	372,3	Chelatbildner
Ergotamin (DET MS [®] , Renschler)	583,7	Mutterkornalkaloid
Erythromycin (Sigma)	733,9	Makrolid-Antibiotikum, blockiert verschiedene K ⁺ -Kanaltypen
Fluoxetin (Fluctin [®] , Lilly)	345,8	Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI =selective serotonin reuptake inhibitor)
Furosemid (ratiopharm)	330,8	Schleifendiuretikum, hemmt kompetitiv den Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Cotransporter
Gadolinium (GdCl ₃ , Sigma)	371,7	ein Element der Lanthanoide. Es hemmt K ⁺ -Kanäle
Iberiotoxin (IbTX, Latoxan)	4230	blockiert Ca ²⁺ -abhängige und spannungsabhängige sowie spannungsunabhängige K ⁺ -Kanäle
Ketamin (Ketamin Inresa [®])	274,2	NMDA-Rezeptoren-Blocker
Lanthan (LaCl ₃ , Sigma)	371,4	Element der Lanthanoide
Lithium (LiCl, Sigma)	42,4	Element der I. Hauptgruppe
Lorazepam (Tavor [®] , Wyeth)	321,0	Benzodiazepin
Mangan (MnCl ₂ , Sigma)	125,8	Element der VII. Nebengruppe
Margatoxin (MgTX, Latoxan)	4179	blockiert Ca ²⁺ -abhängige und spannungsabhängige sowie spannungsunabhängige K ⁺ -Kanäle
Mirtazapin (Remergil [®] , Organon)	265,4	Tetrazyklisches Antidepressivum
Phenobarbital (Luminal [®] , Desitin)	232,3	Barbiturat
Phenytoin (Sigma)	274,3	Antiepileptikum, blockiert spannungsabhängige Na ⁺ - und Ca ²⁺ - Kanäle
Pirfenidon (Tocris)	182,2	Hemmt u.a. die Bildung von TNF _α
Procainamid (Novocain [®] , Hoechst AG)	273,0	Lokalanästhetikum vom Esther-Typ, blockiert spannungsabhängige Na ⁺ -Kanäle
Strychnin (Sigma)	370,9	blockiert postsynaptische Glycin _A -Rezeptoren im Rückenmark
Succinylcholin (Sigma)	361,3	depolarisierendes Muskelrelaxanz
Tamoxifen (Sigma)	563,6	Antiöstrogen

Substanz (Name, Firma)	Mw (g/mol)	Wirkstoffgruppe/Wirkungsmechanismus
Terbutalin (Bricanyl [®] , AstraZeneca)	225,3	β_2 -Sympathomimetikum
Tubocurarin (Sigma)	682,9	nicht-depolarisierendes Muskelrelaxanz
Ytterbium (YbCl ₃ , Sigma)	387,5	Element der Lanthanoide
Zink (ZnCl ₂ , Sigma)	136,3	Element der II. Nebengruppe

2.3.5 Feinchemikalien

Die nicht gesondert aufgeführten Feinchemikalien wurden von der Firma Sigma GmbH, Taufkirchen bzw. Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.4 Statistische Auswertung und Darstellung

Die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism, Version 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Angabe von Mittelwerten erfolgte \pm SEM.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Porenbildung durch Listeriolysin O eingesetzt (Repp *et al.* 2002). Daher lag es nahe, diesen Zelltyp auch für die geplante Untersuchung der Porenbildung durch Pneumolysin (Ply) zu verwenden. HEK293-Zellen haben in der Whole-Cell-Konfiguration im Current-Clamp-Modus ein Ruhemembranpotential von -28 ± 1 mV (n=52). Eine typische Strom-Spannungs-Kurve im Voltage-Clamp-Modus gemessen zeigt Abb. 4. Ab einem Membranpotential von positiver als -30 mV kommt es zu einer Aktivierung eines spannungsabhängigen, Ca^{2+} -unabhängigen K^+ -Stroms. Dieser K^+ -Auswärtsstrom erreicht seine maximale Amplitude erst nach ca. 100 ms, es handelt sich hier um einen verzögert aktivierenden K^+ -Auswärtsstrom (sog. „delayed outward rectifier“).

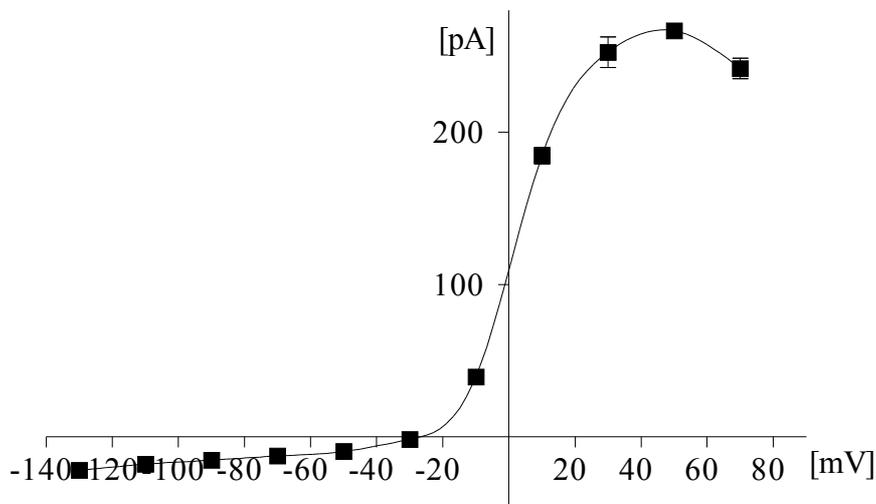


Abbildung 4: Typische Strom-Spannungs-Beziehung einer HEK293-Zelle. Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde das Membranpotential in 20 mV Schritten von -130 bis +50 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 400 ms anlagen, wurde für jeweils 100 ms auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Die auf der y-Achse dargestellten Membranströme wurden am Ende der 400 ms dauernden Spannungspulse gemessen. Mittelwerte aus 3 Messreihen an einer Zelle. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_{100} eingesetzt.

In der Literatur wird für HEK293-Zellen außerdem ein transients Ca^{2+} -Strom beschrieben, der bei Membranpotentialen ab -40 mV durch Depolarisation aktiviert wird (Berjukow *et al.* 1996). Unter unseren Messbedingungen konnte dieser Ca^{2+} -Strom jedoch nicht registriert werden.

3.2 Charakterisierung der durch Pneumolysin gebildeten Poren

3.2.1 Porenbildung durch Pneumolysin in der Plasmamembran von HEK293-Zellen

Um eine Aktivierung der endogenen, im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle der HEK293-Zellen zu vermeiden, wurden die Messungen zur Porenbildung durch Ply bei einem Membranhaltepotential von -50 mV durchgeführt.

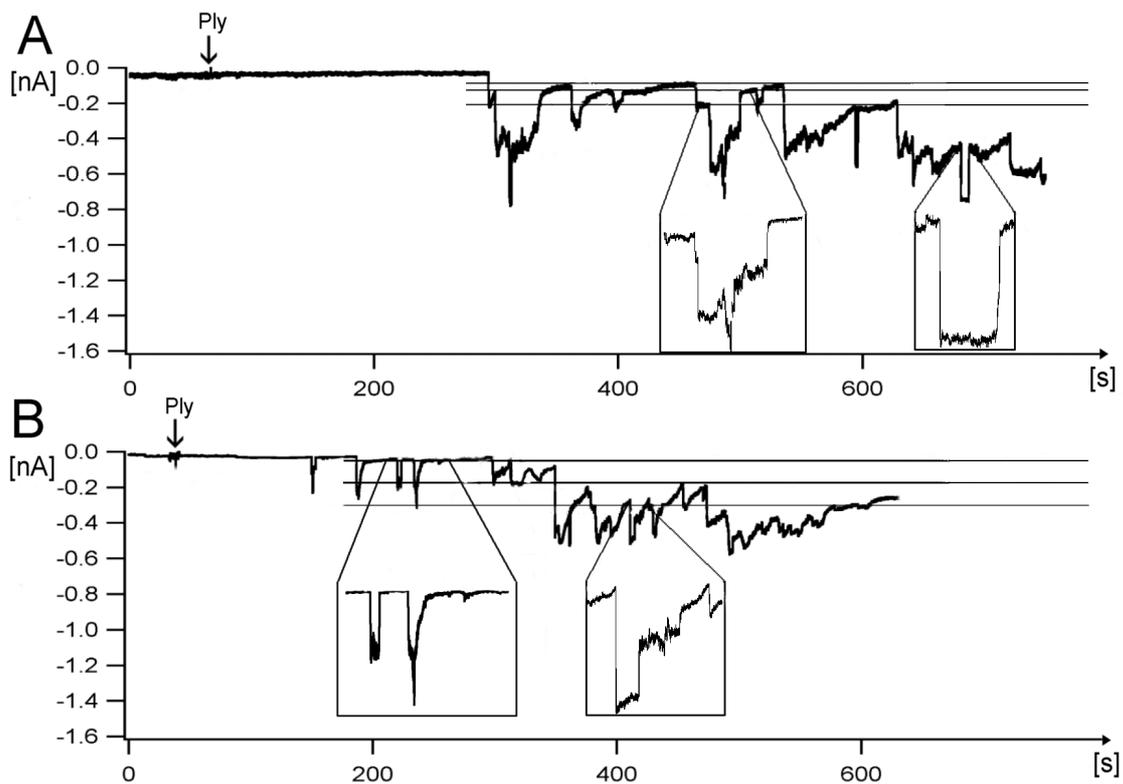


Abbildung 5: A, B Zeitlicher Verlauf der Membranströme von zwei HEK293-Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Applikation von 1 ng/ml Ply. Die eingezeichneten Linien markieren verschiedene Stromniveaus die durch Öffnung bzw. Schließung von Ply-Poren erreicht werden. In den Kästen hervorgehoben und vergrößert dargestellt sind unterschiedliche Kinetiken von Ply-Porenschlüssen. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_{100} eingesetzt.

Abbildung 5 zeigt zwei Membranstromregistrierungen an HEK293-Zellen nach Applikation von 1 ng/ml Ply. Die Zelle in der Abb. 5 A zeigt einen unspezifischen Membranstrom von etwa -40 pA. Dieser bleibt nach Ply-Applikation für ca. 220 s konstant und nimmt dann schlagartig (≤ 10 ms bei einer Filterfrequenz von 100 Hz) um etwa -170 pA zu. Diese schnelle Stromzunahme wird durch die Öffnung einer Ply-Pore hervorgerufen. Im weiteren Verlauf kann man zahlreiche solcher Porenöffnungen sehen. Besonders typische Porenströme wurden in den Kästen (Abb. 5) vergrößert dargestellt. Man beachte, dass nach mehreren Porenöffnungen und -schließungen der Membranstrom fast wieder die Amplitude des unspezifischen Membranstroms vor der Ply-Applikation erreicht. Abbildung 5 B zeigt ein weiteres Beispiel des Verlaufs der Porenbildung durch Ply. Etwa 120 s nach der Applikation von 1 ng/ml Ply öffnet sich die erste Pore. Diese schließt innerhalb weniger Sekunden vollständig. Nach der Schließung der 2. Porenöffnung bildet sich ein neues Stromniveau mit einer im Vergleich zum unspezifischen Membranstrom vor der Porenöffnung größeren Amplitude. Im weiteren Verlauf sieht man das Öffnen und Schließen zahlreicher Poren, wobei in den Kästen einige typische Porenöffnungen und -schließungen vergrößert dargestellt sind.

Besonders aus den Kästen der Abb. 5 sieht man, dass verschiedene Stromverläufe beim Ply-Porenschluss existieren. Zum einen gibt es einen Porenschluss, bei dem der Porenstrom innerhalb von 10 ms wieder abnimmt, zum anderen kann der Porenstrom auch langsamer wieder abnehmen. Es kommen aber auch gemischte Porenschlüsse vor, in denen der Porenstrom zu einem Zeitpunkt schnell und dann im weiteren Zeitverlauf langsam abnimmt, bis der Ausgangsstrom erreicht ist. Von 90 Ply-Poren mit einer Porenstromamplitude von etwa 200 pA und einer Offenzeit von mindestens 5 s schließen 44% schnell und 28% langsam. Die verbleibenden 28% der Poren haben einen gemischten Porenschluss. Ply-Poren können auch für längere Zeit geöffnet bleiben. Es bildet sich dann ein zum unspezifischen Membranstrom erhöhtes Stromniveau (Abb. 5).

In einigen Experimenten gelang es, das Öffnen und Schließen von Ply-Poren über einen Zeitraum von bis zu 110 Minuten nach der Applikation von Ply zu messen (Abb. 6). Nach Applikation von Ply in einer Badkonzentration von 1 ng/ml bildete sich nach etwa 200 s die erste Pore. Die Häufigkeit der Porenöffnungen und

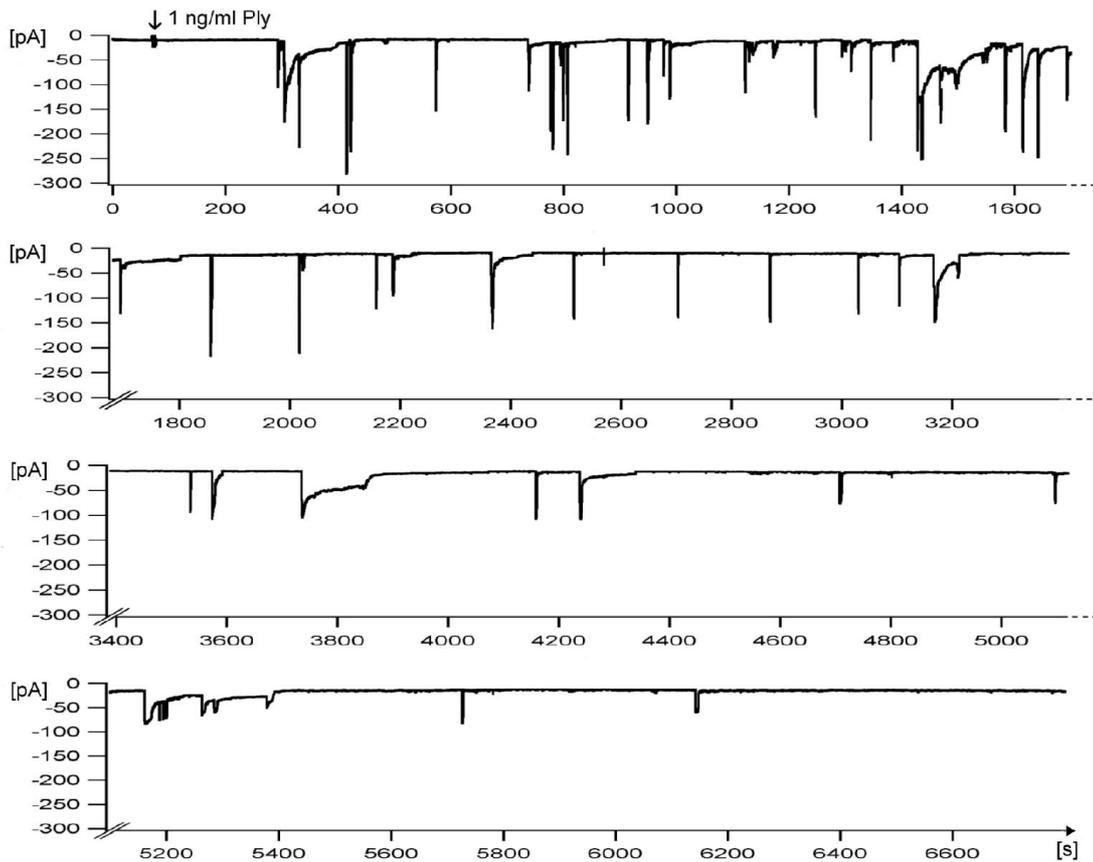


Abbildung 6: Registrierung der Porenöffnungen und -schließungen durch Ply an einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der Pfeil kennzeichnet die Applikation von Ply in einer Konzentration von 1 ng/ml. Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

-schließungen nahm in den ersten 30 Minuten zu, um dann wieder abzunehmen, bis nach 90 Minuten nur noch sehr vereinzelt Porenöffnungen und -schließungen beobachtet werden konnten. Auch nach der Öffnung und Schließung von mehreren großen Poren wurde immer wieder die Amplitude des unspezifischen Membranstroms erreicht. Diese Langzeitexperimente zeigen deutlich, dass HEK293-Zellen bei einer Konzentration von 1 ng/ml Ply trotz Porenöffnungen und -schließungen über mehrere Stunden intakt bleiben können. Das Membranpotential lag vor der Ply-Applikation bei -18 mV und am Ende des Experiments bei -16 mV.

3.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung durch Pneumolysin

Die Abb. 7 zeigt die Porenbildung durch Ply bei Toxinkonzentrationen von 1, 10 und 100 ng/ml. In Abb. 7 A sieht man, dass etwa 25 s nach Applikation von 100 ng/ml Ply die erste Porenöffnung zu registrieren ist und dann innerhalb von Sekunden weitere Porenbildungen folgen. Nach etwa einer Minute beträgt der Membranstrom bereits -1,5 nA. Mikroskopisch war eine große Zahl von Cytoplasmaausstülpungen, sog. blebs, auf der Zelloberfläche zu beobachten. Die porenbildende Wirkung von 10 ng/ml Ply ist in Abb. 7 B zu sehen. Etwa 40 s nach der Applikation bildet sich die erste Pore, die schnell wieder schließt. Weitere Porenöffnungen und -schließungen folgen kurz hintereinander. Die Zelle hat nach etwa 180 s einen Membranstrom von mehr als -1,5 nA und zeigte mikroskopisch ebenfalls viele blebs an der Zelloberfläche. Abbildung 7 C zeigt, dass sich ca. 130 s nach Applikation von 1 ng/ml Ply die erste Pore bildet und innerhalb weniger Sekunden wieder schließt. Weitere Porenöffnungen und -schließungen folgen. Der unspezifische Membranstrom wird immer wieder zwischen den voneinander gut abzugrenzenden Porenöffnungen und -schließungen erreicht. Mikroskopisch konnten keine blebs an der Zelloberfläche beobachtet werden. Nicht gezeigt sind die Experimente mit 0,1 ng/ml Ply. Hierbei kam es nur zu sehr wenigen Porenbildungen, die in einem relativ großen Abstand voneinander stattfanden.

Zur quantitativen Bestimmung der Ply-Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen wurde die durch die Ply-Poren fließende Ladung bestimmt. Hierzu wurde die Fläche unter der Strom-Zeit-Kurve (und damit die geflossene Netto-Ladung) über 2 Minuten nach der ersten Porenöffnung bestimmt und die Fläche unterhalb des jeweiligen unspezifischen Membranstroms abgezogen (Tab. 4). Die Abbildung 8 zeigt die entsprechende Konzentrations-Wirkungskurve. Die Anpassung der Hill-Gleichung an die Messdaten mit Hilfe des Least-Squares-Verfahrens ergab eine halbmaximale effektive Konzentration von $EC_{50} = 9,2 \pm 1,0$ ng/ml bei einem Hill-Koeffizienten von $1,17 \pm 0,02$. Bei nach oben frei auslaufender Kurve ergibt sich ein Wert für die maximal fließende Ladung von 82 nC/min und ist damit sehr nahe der theoretisch maximal fließenden Ladung von 90 nC/min unter den gegebenen Messbedingungen. Diese errechnet sich aus einer senkrechten Stromzunahme auf den maximal registrierten Membranstrom von -1,5 nA.

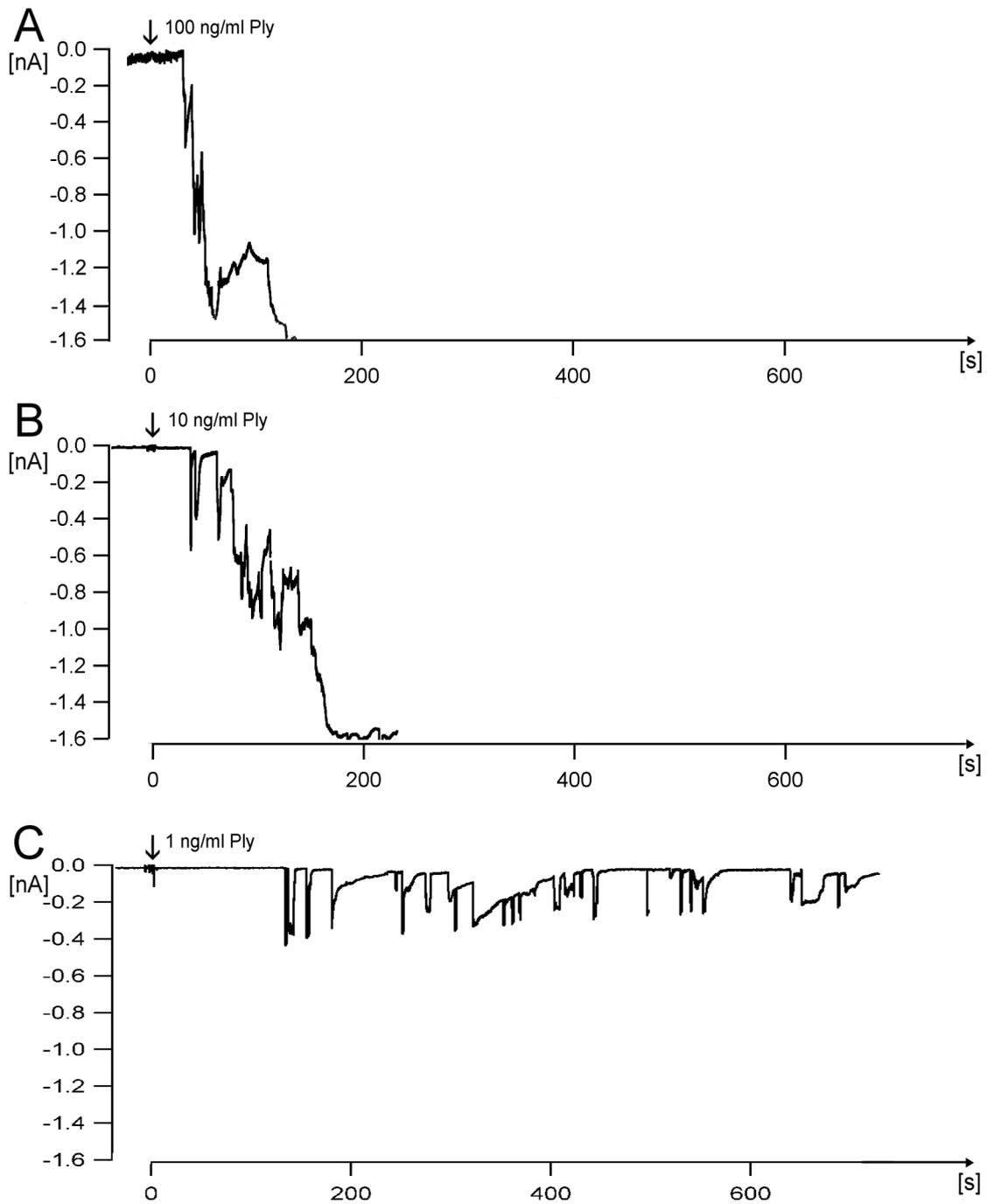


Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit der Porenbildung durch Ply. Membranströme von drei HEK293-Zellen bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der Pfeil kennzeichnet jeweils die Applikation von Ply in einer Konzentration von 100 ng/ml (A), 10 ng/ml (B) und 1 ng/ml (C). 0 entspricht dem Zeitpunkt der Toxinapplikation. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_{100} eingesetzt.

Tabelle 4: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Pneumolysin

Ply - Konzentration	Zeit von der Applikation bis zur 1. Porenöffnung in s	Durch Ply-Poren strömende Ladung in nC/min
100 ng/ml	22 ± 3 (n=4)	80,5 ± 7,2 (n=3)
10 ng/ml	32 ± 10 (n=4)	44,8 ± 5,3 (n=3)
1 ng/ml	139 ± 23 (n=9)	6,0 ± 2,6 (n=3)
0,1 ng/ml	63 ± 7 (n=3)	0,2 ± 0,1 (n=3)

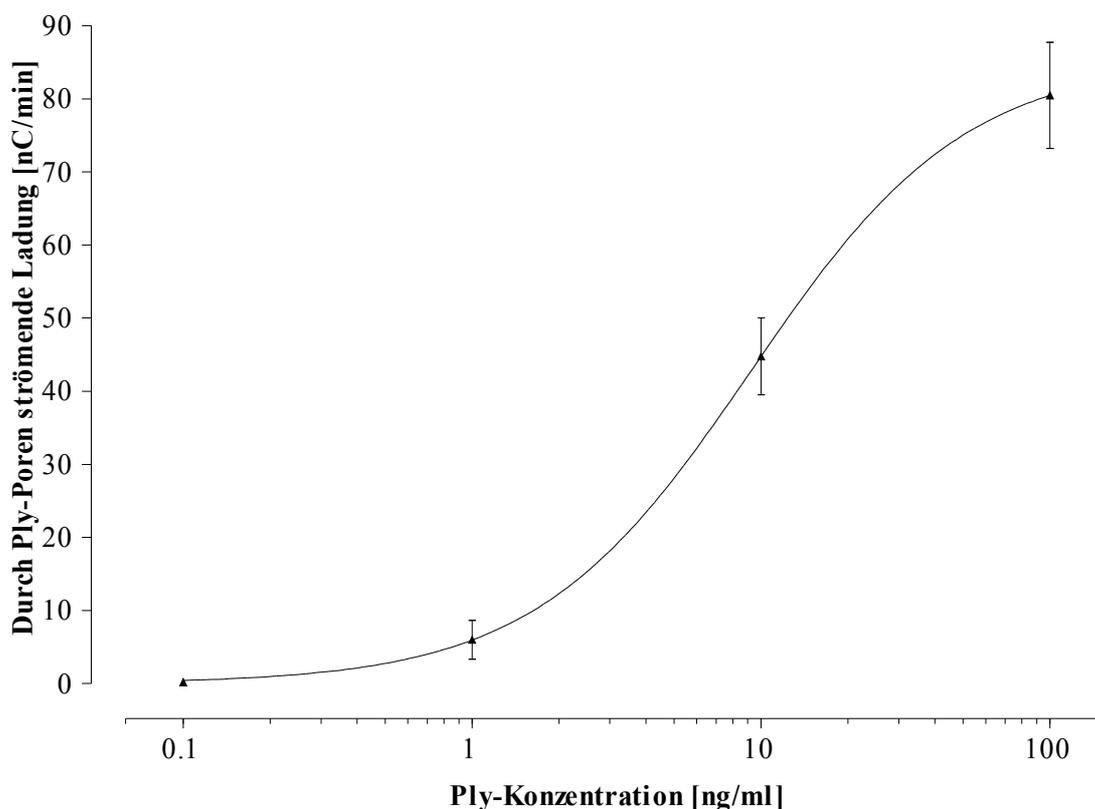


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Ply an HEK293-Zellen bei pH 7,35. Auf der Ordinate ist die durch die Ply-Poren geflossene Ladung und auf der Abszisse die Ply-Konzentration aufgetragen. Die jeweiligen Werte stammen aus Tab. 4. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$L = \frac{L_{\max}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n}$$

nach dem Least-Squares-Verfahren an die Daten angepasst. Dabei ist L die geflossene Ladung in nC/min, L_{\max} die maximal geflossene Ladung (85,4 nC/min), $EC_{50} = 9,2$ ng/ml die halbmaximale effektive Ply-Konzentration, c die eingesetzten Ply-Konzentrationen und der Hill-Koeffizient $n = 1,2$.

3.2.3 Elementare Ströme der Pneumolysin-Poren

Zur Bestimmung der Amplituden der elementaren Ströme durch die Ply-Poren wurden nur Porenöffnungen herangezogen, da die Porenschlüsse sowohl in einer langsamen als auch in einer schnellen Form bzw. einer Mischform erfolgen und es auch nicht immer zu einem vollständigen Porenschluss kam (siehe 3.2.1). Die Differenz aus dem Membranstrom nach Porenöffnung und dem Membranstrom vor dem Öffnen dieser Pore definiert den Porenstrom. Die Messungen erfolgten bei einem Membranpotential von -50 mV. Für die Auswertung wurden nur Porenströme berücksichtigt, bei denen der Gesamtmembranstrom weniger als -1 nA betrug. Bei einem größeren Membranstrom sind die einzelnen Porenstromamplituden nicht mehr eindeutig zu identifizieren und auszuwerten. Für eine Ply-Konzentration von 1 ng/ml konnten 228 Porenöffnungen ausgewertet werden. Abbildung 9 A zeigt das zugehörige Amplitudenhistogramm, das bereits vermuten lässt, dass es verschiedene Amplitudenmaxima der Porenströme gibt. Für die biometrische Auswertung wurde eine Summe von Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Funktionen (RRSW) (Weibull 1951; Brockmeier 1991) an die Daten für die kumulative Häufigkeit angepasst. Alternative Anpassungen wurden mit Hilfe des F-Test verglichen. Das Bestimmtheitsmaß für die ausgewählte Anpassung betrug 99,8%. Der erste Mittelwert der Verteilung liegt bei 34 ± 11 pA (n=98), der zweite bei 65 ± 18 pA (n=71) und der dritte bei 168 ± 60 pA (n=51). Der Mittelwert mit 34 pA entspricht dem Elementarstrom der kleinsten Pore, die weiteren Mittelwerte entsprechen dem 2- und 5-fachen des Elementarstroms der kleinsten Pore.

Für eine Ply-Konzentration von 10 ng/ml konnten 263 Porenöffnungen ausgewertet werden. Abbildung 9 B zeigt, dass im Vergleich zur Ply-Konzentration von 1 ng/ml häufiger Poren mit höheren Stromamplituden auftreten. Es wurde eine Summe von RRSW-Funktionen an die Daten für die kumulative Häufigkeit angepasst. Alternative Anpassungen wurden mit Hilfe des F-Test verglichen. Für die ausgewählte Anpassung wurden die ersten beiden Mittelwerte der Verteilung mit 34 pA und 65 pA auf die entsprechenden Mittelwerte festgelegt (fixiert), die bei einer Ply-Konzentration von 1 ng/ml ermittelt wurden. Zusätzlich errechnet sich ein dritter Mittelwert von 134 ± 30 pA (n=78) und ein vierter von 277 ± 86 pA (n=63). Die beiden letztgenannten Mittelwerte entsprechen dem 4- und 8-fachen des

Elementarstroms der kleinsten Pore. Das Bestimmtheitsmaß für diese ausgewählte Anpassung betrug 99,9 %.

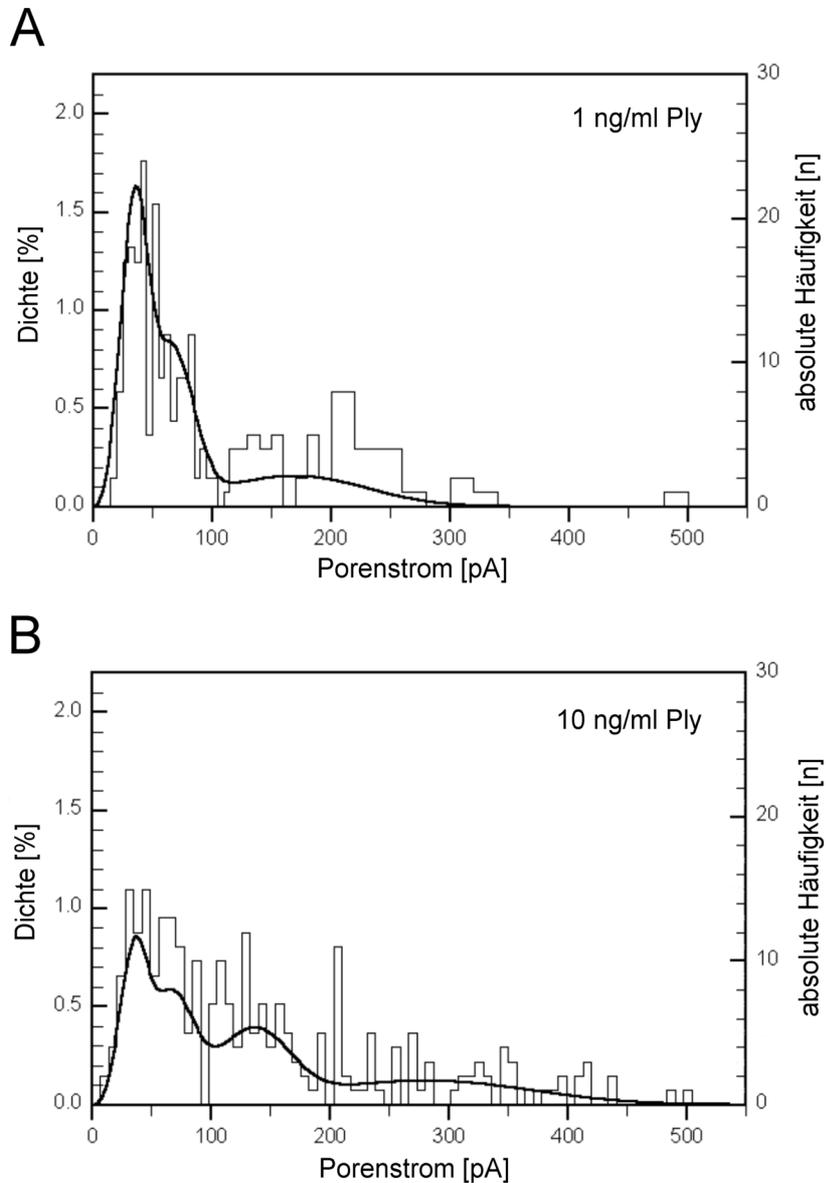


Abbildung 9: Amplitudenhistogramme der durch Ply bei einer Konzentration von 1 ng/ml (A) und 10 ng/ml (B) gemessenen Porenstromamplituden bei einem Membranpotential von -50 mV. Die rechten Ordinaten geben die absoluten Häufigkeiten an, wobei die Klassenbreite des Porenstroms 5 pA ist. Die linken Ordinaten geben die relative Dichte [%] der RRSW-Funktionen wieder. Die durchgezogenen Linien geben die Summation der einzelnen errechneten RRSW-Funktionen wieder. Für die Auswertung wurden 228 Poren bei einer Ply-Konzentration von 1 ng/ml und 263 Poren bei 10 ng/ml herangezogen. Bei 1 ng/ml Ply wurden 4 Poren mit einer Porenstromamplitude größer als 300 pA nicht bei der Berechnung berücksichtigt.

3.2.4 pH-Abhängigkeit der Kinetik der Pneumolysin-Poren

Für Listeriolysin wurde eine Zunahme der Aktivität im sauren pH-Bereich beobachtet (Glomski *et al.* 2002). Daher wurde nun untersucht, ob sich die Aktivität von Ply bei einem pH-Wert von 6,5 im Vergleich zu 7,35 verändert. Hierzu wurde die Extrazellulärlösung auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt ($E_{pH6,5}$) und eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung analog zu den Experimenten im Kapitel 3.2.2 ermittelt. Die Membranstromregistrierungen bei 100, 10, 1 und 0,1 ng/ml Ply unterscheiden sich im Vergleich zu den Membranstrom-registrierungen bei pH 7,35 nicht. Zur quantitativen Auswertung wurde auch hier die durch die Ply-Poren fließende Ladung bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2). Tabelle 5 fasst die Ergebnisse zusammen und stellt sie den Ergebnissen aus Tabelle 4 gegenüber.

Tabelle 5: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Ply bei unterschiedlichen pH-Werten

Ply-Konzentration	Durch Ply-Poren strömende Ladung in nC/min	
	pH 7,35	pH 6,5
100 ng/ml	80,5 ± 7,2 (n=3)	72,0 ± 13,9 (n=3)
10 ng/ml	44,8 ± 5,3 (n=3)	52,4 ± 2,3 (n=3)
1 ng/ml	6,0 ± 2,6 (n=3)	8,6 ± 2,5 (n=3)
0,1 ng/ml	0,2 ± 0,1 (n=3)	0,5 ± 0,1 (n=3)

Durch Anpassung der Hill-Gleichung an die Messwerte ergab sich ein EC_{50} -Wert von $4,90 \pm 1,0$ ng/ml bei einem Hill-Koeffizienten von $1,27 \pm 0,01$. In Abbildung 10 sind die ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven bei den pH-Werten von 6,5 und 7,35 gemeinsam dargestellt. Die Stromkurven nach der Ply-Applikation, die Konzentrations-Wirkungskurven, die halbmaximalen effektiven Konzentrationen und die Hill-Koeffizienten unterscheiden sich bei den pH-Werten von 6,5 und 7,35 nicht signifikant.

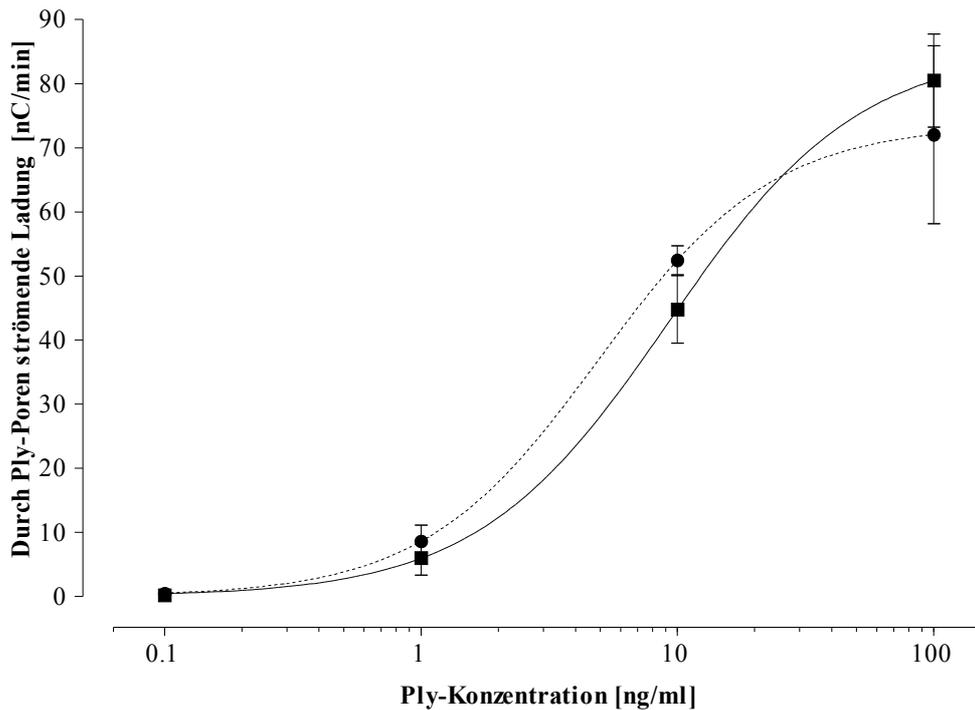


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Ply an HEK293-Zellen bei einem pH-Wert von 7,35 (■) und 6,5 (●). Auf der Ordinate ist die über die Ply-Poren geflossene Ladung und auf der Abszisse die Ply-Konzentration aufgetragen. Die jeweiligen Werte stammen aus Tab. 5. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$L = \frac{L_{\max}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n}$$

nach dem Least-Squares-Verfahren an die Daten angepasst. Dabei ist L die geflossene Ladung in nC/min, L_{\max} die maximal geflossene Ladung (85,4 nC/min bei pH 7,35 und 73,6 nC/min bei pH 6,5), EC_{50} =9,2 ng/ml bei pH 7,35 und 4,9 ng/ml bei pH 6,4, c die eingesetzten Ply-Konzentrationen und der Hill-Koeffizient $n=1,2$ bei pH 7,35 und $n=1,3$ bei pH 6,5.

3.2.5 Selektivität der Pneumolysin-Poren

Um die Ionenselektivität der Ply-Poren zu bestimmen, wurden an HEK293-Zellen vor und nach Ply-Applikation Strom-Spannungskurven (I/U-Kurven) gemessen. Abbildung 11 zeigt die I/U-Kurven nach dem Öffnen der ersten drei gebildeten Poren. Die an die Messpunkte angepassten Regressionsgeraden haben einen linearen Verlauf, d.h. es liegt ein ohmsches Strom-Spannungsverhalten vor. Das Umkehrpotential der Porenströme lag bei -3 ± 1 mV ($n=12$) bei Benutzung der Lösungen $E_1/|b|_{100}$.

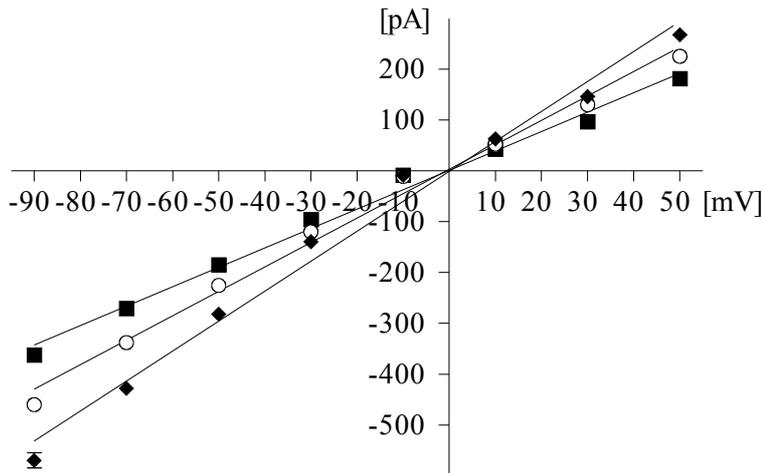


Abbildung 11: Strom-Spannungskurven einer HEK293-Zelle während dem Offenzustand von Ply-Poren (1 ng/ml Ply). Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde das Membranpotential in 20 mV Schritten von -90 bis +50 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 50 ms anlagen, wurde nicht auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Die entsprechenden Membranströme wurden am Ende der 50 ms dauernden Spannungspulse gemessen. Dargestellt sind die Strom-Spannungskurven im Offenzustand der 1. gebildeten Pore (◆), der 2. (○) und der 3. gebildeten Pore (■). Die Messpunkte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 direkt hintereinander gemessenen I/U-Kurven. Die Linien sind jeweils Regressionsgeraden. Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

Dieses Umkehrpotential zeigt, dass die Ply-Poren zumindest für monovalente Kationen (Na^+ , K^+) und Anionen (Cl^- , Glutamat) unselektiv sind. Die unterschiedlichen Steigungen der Regressionsgeraden beruhen auf den unterschiedlichen Porenstromamplituden.

Um die Ionenselektivität der Ply-Poren weiter zu untersuchen, wurden unterschiedliche Extra- und Intrazellulärlösungen an HEK293-Zellen verwendet. Hierzu wurden als erstes die monovalenten Kationen in der Extrazellulärlösung durch das Kation Cholin (E_{Chol}) ersetzt. Abbildung 12 zeigt eine entsprechende I/U-Kurve einer offenen Ply-Pore. Es zeigt sich eine lineare Strom-Spannungsbeziehung mit einem Umkehrpotential von +1 mV. In drei Experimenten lag das Umkehrpotential bei -2 ± 2 mV ($n=3$). Auch die Stromamplituden der Ply-Poren zeigen keinen Unterschied zur physiologischen Lösungskombination. Daraus folgt, dass das Kation Cholin ungehindert durch Ply-Poren fließen kann.

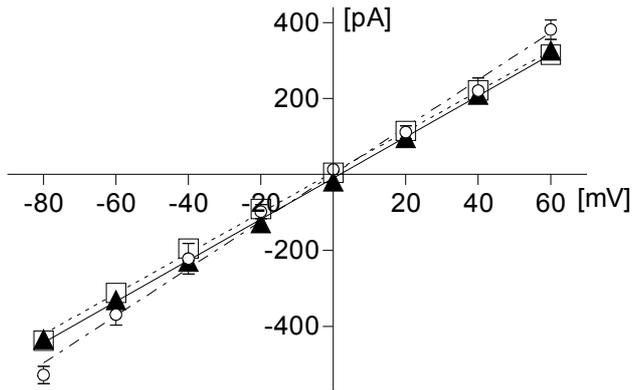


Abbildung 12: Strom-Spannungskurven von HEK293-Zellen im Offenzustand von Ply-Poren bei den Intra- und Extrazellulärlösungen $I_{bl_{100}}/E_{chol}$ (\circ), I_{KCl}/E_{TEA} (\square) und I_{Arg}/E_{Arg} (\blacktriangle). Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde das Membranpotential in 20 mV Schritten von -80 bis +60 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 50 ms anlagen, wurde nicht auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Die Membranströme wurden am Ende der 50 ms dauernden Spannungspulse gemessen. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 hintereinander gemessenen I/U-Kurven. Die Linien sind Regressionsgeraden an die jeweiligen Messdaten.

In den folgenden Experimenten wurden die zuvor eingesetzten Kationen der Extrazellulärlösung durch Tetraethylammonium (E_{TEA}) ersetzt. TEA ist ein klassischer Blocker für verschiedene K^+ -Kanaltypen (Mathie *et al.* 1998). Als Intrazellulärlösung wurde KCl (I_{KCl}) eingesetzt. Abbildung 12 zeigt eine entsprechende I/U-Kurve während dem Offenzustand einer Ply-Pore. Man sieht eine lineare I/U-Kurve mit einem Umkehrpotential von -1 mV. Das Umkehrpotential unterscheidet sich mit 2 ± 2 mV ($n=8$) an drei HEK293-Zellen nicht signifikant von null. Die Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen zeigt keinen Unterschied zu physiologischen Lösungskombinationen. Dies zeigt, dass Ply-Poren für TEA permeabel sind.

In den nächsten Experimenten wurde die Leitfähigkeit der Ply-Poren für Arginin untersucht. Extrazellulär wurden alle zuvor eingesetzten Kationen gegen Arginin (E_{Arg}), intrazellulär alle zuvor eingesetzten Ionen durch Arginin-Glutamat (I_{Arg}) ersetzt. Abbildung 12 zeigt eine lineare I/U-Kurve bei dieser Lösungskombination während dem Offenzustand einer Ply-Pore. Im Mittel konnte ein Umkehrpotential von -2 ± 3 mV ($n=3$) gemessen werden. Die Stromamplituden der Porenöffnungen unterscheiden sich nicht zu denen bei physiologischer Lösungskombination.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus den Experimenten mit verschiedenen Lösungskombinationen, dass die Ply-Poren zumindest für die Kationen Na^+ , K^+ , Cholin, TEA und Arginin sowie für die Anionen Cl^- und Glutamat gleich permeabel sind.

3.2.6 Ca^{2+} -Leitfähigkeit der Pneumolysin-Poren und Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger, spannungsunabhängiger K^+ -Kanäle durch Pneumolysin

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch LLO gebildete Poren permeabel für Ca^{2+} sind und dies zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt.

Um einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration elektrophysiologisch zu zeigen, wurden HEK293-Zellen eingesetzt, die mit einem Ca^{2+} -abhängigen, spannungsunabhängigen K^+ -Kanal (hSK4-Kanal) transfiziert waren. Die Aktivierung dieser K^+ -Kanäle kann quasi als Indikator der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dienen. Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über einen Wert von 10 nM an, so wird der hSK4-Kanal aktiviert und es kommt zu einem messbaren K^+ -Strom. Bei den HEK293hSK4-Zellen wurde eine nominell Ca^{2+} -freie Intrazellulärlösung (Ibl_0) eingesetzt, die nur eine geringe Ca^{2+} -Pufferkapazität aufwies.

Die Abbildung 13 A zeigt eine Originalregistrierung eines Experiments mit einer HEK293hSK4-Zelle über einen Zeitraum von 35 Minuten nach Applikation von 1 ng/ml Ply. Man sieht, dass sich etwa 7 Minuten nach der Applikation von Ply die Pore 1 mit einer Stromamplitude von etwa -90 pA öffnet. Wenige Sekunden danach kommt es durch den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch die offene Pore zu einer transienten Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen hSK4-Kanälen (Abb. 13, Pore 1). Während die K^+ -Stromamplitude bereits etwas abnimmt, kommt es durch eine weitere Ply-Pore mit sehr kleiner Stromamplitude (wegen der geringen Auflösung in Abb. 13 A nicht zu sehen) zur erneuten hSK4-Aktivierung. Danach nimmt der K^+ -Strom wieder vollständig ab. Die darauf folgende Pore 2 (Abb. 13, Pore 2) hat in etwa die gleiche Stromamplitude wie Pore 1, die dadurch aktivierte K^+ -Stromamplitude ist jedoch um das 10fache kleiner. Der im Vergleich

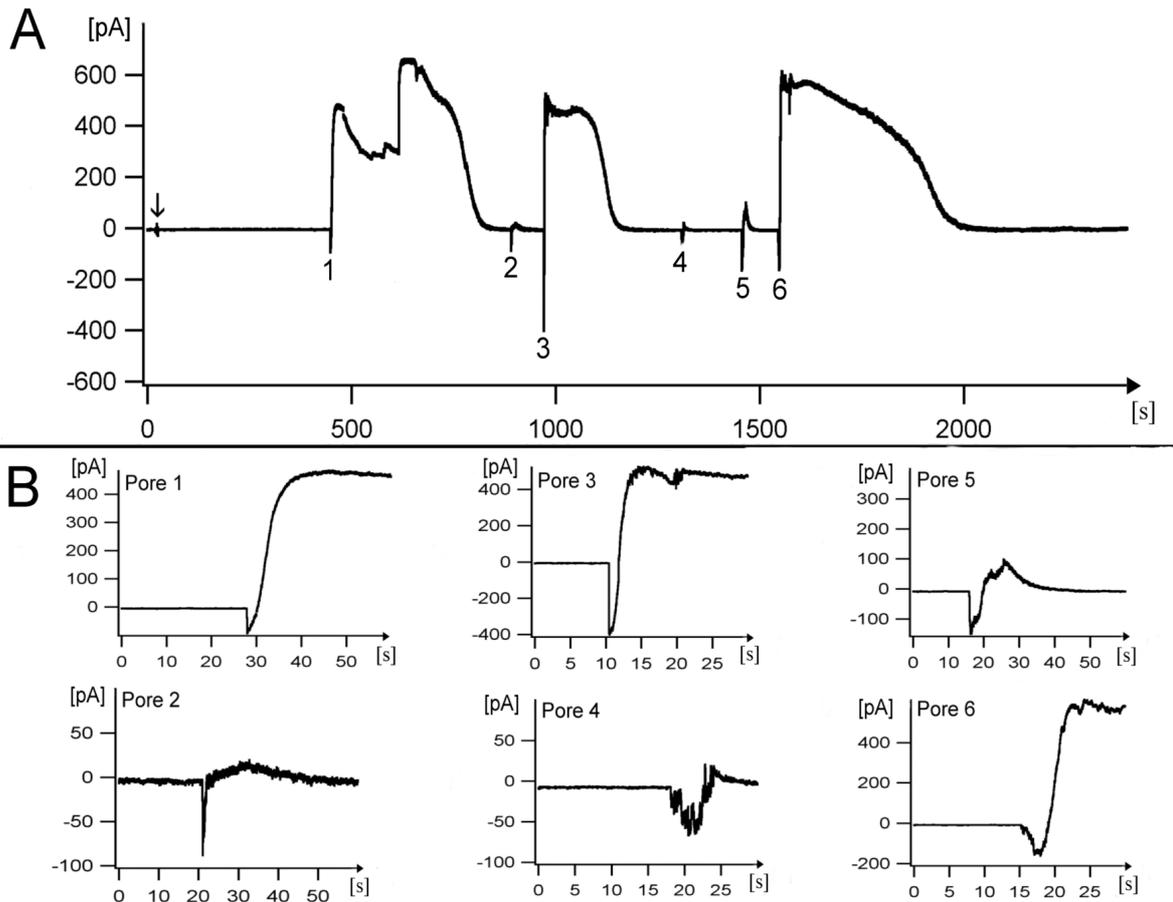


Abbildung 13: A zeigt die Membranstrommessung an einer HEK293hSK4-Zelle bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der Pfeil kennzeichnet die Applikation von 1 ng/ml Ply. Die in A gezeigten Porenöffnungen (1-6) sind in B in einer höheren zeitlichen Auflösung dargestellt. Als Extrazellulärlösung wurde E_i , als Intrazellulärlösung Ibl_0 eingesetzt.

zur Pore 1 etwa 4fach größeren Pore 3 folgt eine der Pore 1 entsprechende K^+ -Stromaktivierung. Es folgen zwei Porenöffnungen, nach denen es nur zu einer geringen K^+ -Stromaktivierung kommt. Nach Öffnung der Pore 6 folgt eine ebenfalls transiente K^+ -Kanalaktivierung mit hoher Stromamplitude. Auffallend ist, dass die Amplituden der aktivierten K^+ -Ströme nicht von der Amplitude des Ply-Porenstroms abhängen. Eine Vermutung dazu ist, dass die hSK4-Kanäle in der Zellmembran in Clustern zusammen liegen und es durch die offenen Poren nur zu einer lokalen intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung im Bereich der Poren kommt. Es kommt nur dann zu einer hohen K^+ -Stromamplitude, wenn sich die Pore in der Nähe eines solchen K^+ -Kanal-Clusters öffnet. Abbildung 14 zeigt eine I/U-Kurve während der hSK4-

Kanalaktivierung. Das Membranpotential verschiebt sich von etwa -30 mV auf etwa -90 mV. Nach der hSK4-Kanalaktivierung hyperpolarisiert das Membranpotential auf -93 ± 5 mV (n=3). Das Gleichgewichtspotential für K^+ beträgt bei der verwendeten Lösungskombination -98 mV. Die transiente Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle durch die Ply-Poren bei HEK293hSK4-Zellen ist ein Hinweis für eine transiente Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von mehr als 10 nM.

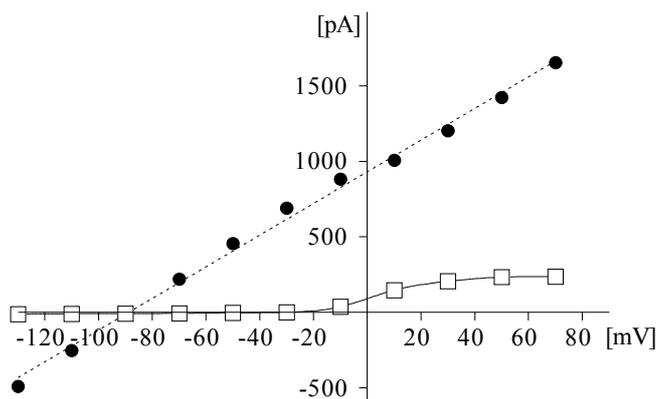


Abbildung 14: Strom-Spannungskurve einer HEK293hSK4-Zelle vor (□) und nach (●) Aktivierung der hSK4-Kanäle abzüglich des Membranstroms vor Aktivierung. Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde das Membranpotential in 20 mV Schritten von -130 bis +50 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 400 ms anlagen, wurde für jeweils 100 ms auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Die auf der y-Achse dargestellten Membranströme wurden am Ende der 400 ms dauernden Spannungspulse gemessen. Die berechnete Regressionsgerade ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär I_{bl_0} -Lösung eingesetzt.

Als Kontrollexperiment wurden drei mit einem Leervektor transfizierte HEK293-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie HEK293hSK4-Zellen gemessen. Nach Applikation von 1 ng/ml Ply kam es zu keiner Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Stroms, obwohl viele Porenöffnungen (>200 pA) registriert werden konnten.

Nun sollte geklärt werden, ob der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch den alleinigen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum über die Ply-Poren verursacht wurde. Dazu wurden Messungen mit HEK293hSK4-Zellen in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung durchgeführt, die statt Ca^{2+} Ba^{2+} enthielt (E_{1Ba}). Nach der Porenbildung durch Ply kam es zu keiner K^+ -Stromaktivierung, d. h. die

intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration erfolgte in den zuvor dargestellten Experimenten durch den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch die Ply-Poren.

Eukaryote Zellen besitzen endogene Ca^{2+} -Speicher, die bei einem geringen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, z.B. durch den Einstrom von Ca^{2+} über Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran, Ca^{2+} freisetzen und als Verstärker von „ Ca^{2+} -Signalen“ dienen. Außerdem nehmen sie Ca^{2+} auf und halten so die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig (Berridge 2002; Galione & Churchill 2002). In den nächsten Experimenten sollte die mögliche Beteiligung endogener Ca^{2+} -Speicher bei der Ply-abhängigen Aktivierung der hSK4-Kanäle untersucht werden. Die HEK293hSK4-Zellen wurden daher für eine Stunde vor den geplanten Messungen mit 0,1 mM Thapsigargin im Zellkulturmedium bei 37°C im Inkubator inkubiert. Thapsigargin blockiert Ca^{2+} -ATPasen des sarco/ endoplasmatischen Retikulums (SERCAs, sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} pumps), wodurch das Wiederauffüllen dieser Ca^{2+} -Speicher nach einer Entleerung verhindert wird (Gomez-Viquez *et al.* 2003). Bei drei von vier Experimenten kam es nach der Porenbildung durch 1 ng/ml Ply zu keiner Aktivierung der hSK4-Kanäle. Bei einem Experiment kam es bei einer Pore zu einer minimalen K^+ -Kanalaktivierung. Neben der K^+ -Kanalaktivierung durch den direkten Einstrom von Ca^{2+} durch die Ply-Poren kann eine zusätzliche Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} aus dem sarco/endoplasmatischen Retikulum nicht ausgeschlossen werden.

Die Experimente wurden mit 10 ng/ml Ply wiederholt. Hier kam es bei zwei von drei Experimenten zu einer der Messung aus Abb. 13 entsprechenden K^+ -Kanalaktivierung nach Ply-Porenbildung. Durch die vermehrte Bildung von Poren mit größerer Stromamplitude bei der höheren Ply-Konzentration ist offenbar der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg größer und es kommt häufiger zu einer Aktivierung der K^+ -Kanäle.

3.2.7 Verlauf der Porenbildung nach Austausch der Pneumolysin-haltigen Extrazellulärlösung gegen Pneumolysin-freie Extrazellulärlösung

Ply-Moleküle müssen zunächst an die Zellmembran binden, um dann in der Membran Poren bilden zu können. In den folgenden Experimenten wurde der Membranstrom von HEK293-Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV gemessen. Nach Applikation von 1 ng/ml Ply in die Badlösung und Beginn der Porenbildung wurde die jeweils gemessene Zelle mittels Badperfusion mit einer Ply-freien Extrazellulärlösung superfundiert. In 3 Experimenten trat im Messzeitraum von 5 min keine Veränderung in der Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen durch die Superfusion auf. Die weiterhin beobachteten Porenöffnungen könnten zum einen durch bereits an der Membran gebundene Ply-Moleküle hervorgerufen werden. Zum anderen kann dies aber auch durch Öffnen und Schließen der bereits gebildeten Poren hervorgerufen sein. In vier weiteren Experimenten wurde 60 s nach Applikation von 1 ng/ml Ply, d.h. vor Beginn der Porenbildung (die im Mittel 139 ± 23 s nach der Applikation eintrat, siehe Tab. 4), die Ply-haltige Extrazellulärlösung gegen Ply-freie ausgetauscht. In allen vier Experimenten konnte nach Beginn der Superfusion das Einsetzen der Porenbildung beobachtet werden. Die Häufigkeit der Porenöffnungen und -schließungen entsprach den in den Abb. 5 A+B, 6 und 7 C gezeigten Registrierungen.

Aus diesen Experimenten kann man schließen, dass die Ply-Moleküle innerhalb der ersten Minute nach Applikation an die Zellmembran binden, ohne sofort Poren zu bilden. Die Porenbildung erfolgt dann durch diese offensichtlich mit sehr hoher Affinität an die Membran gebundenen Ply-Moleküle.

3.2.8 Cholesterolabhängigkeit der Pneumolysin-Wirkung

Zur Ermittlung der Cholesterolabhängigkeit der Ply-Wirkung wurde in den älteren veröffentlichten Experimenten das Ausbleiben von als Poren gedeuteten Strukturen in der Elektronenmikroskopie von mit Ply (1 mg/ml) inkubierten Zellmembranen herangezogen, wobei die Zellen mit einer bis zu 10^4 fach höheren Ply-Konzentration inkubiert wurden, im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Ply-Konzentrationen (Bonev *et al.* 2000). Oder es wurde eine cholesterolabhängige Konformationsänderung in wässriger Lösung beobachtet, die für die Porenbildung

als essentiell gilt (Kelly & Jedrzejewski 2000). In den folgenden Experimenten sollte nun mit Hilfe der viel empfindlicheren Patch-Clamp-Methode elektrophysiologisch die porenbildende Wirkung von sublytischen Ply-Konzentrationen in Abhängigkeit von Cholesterin in der Zellmembran direkt untersucht werden. Zur Reduktion der Cholesterinkonzentration in der Zellmembran wurde sowohl Cholesterin-Oxidase als auch Methyl-Beta-Cyclodextrin verwendet.

3.2.8.1 Cholesterin-Oxidase

Cholesterin-Oxidase ist ein Enzym, das das Cholesterin in der Zellmembran oxidiert und somit in seiner Struktur verändert. Zunächst wurden die HEK293-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Cholesterin-Oxidase (10 µg/ml) bei 37°C im Inkubator inkubiert. Es zeigte sich, dass sich bei zunehmender Inkubationszeit (von 5 bis 120 Minuten) immer mehr HEK293-Zellen vom Petrischalenboden lösten. Bei denjenigen Zellen, die nach der Inkubation noch am Boden adhären waren und gemessen werden konnten, kam es zur gewohnten Porenbildung durch Ply (1 ng/ml). Offenbar bewirkte die Oxidation von Cholesterin in der Zellmembran ein Ablösen der Zellen vom Boden, wodurch sie mit der Patch-Clamp-Methode nicht gemessen werden konnten. Bei den noch adhären Zellen war ausreichend Cholesterin in der Zellmembran für die Ply-Bindung und damit für die Ply-Porenbildung vorhanden. Daher wurde die experimentelle Vorgehensweise geändert. Zunächst wurde eine Whole-Cell-Konfiguration erstellt, wobei das Badvolumen nur 1 ml betrug. Dann wurde 1 ml E₁-Lösung mit 20 µg Cholesterin-Oxidase (Endkonzentration 10 µg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von jeweils 10, 20, 30 und 40 Minuten wurde Ply (1 ng/ml) zugegeben und die Porenbildung beobachtet. Bei insgesamt 13 der 20 Experimente zeigte sich keine Veränderung der Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen, bei 7 Experimenten kam es zu einer Verringerung der Porenöffnungen und -schließungen. Diese Effekte waren nicht von der Inkubationszeit abhängig. Außerdem konnte eine Schädigung der Zellen durch Cholesterin-Oxidase beobachtet werden. Zusammenfassend konnten keine eindeutigen Veränderungen der Ply-Porenbildung nach Oxidation des Cholesterins in der Zellmembran durch die Cholesterin-Oxidase gezeigt werden.

3.2.8.2 Methyl-Beta-Cyclodextrin

In einem weiteren experimentellen Ansatz zur möglichen Bedeutung von Cholesterol für die Ply-Porenbildung wurde Methyl-Beta-Cyclodextrin (M β CD) eingesetzt. Es extrahiert selektiv Cholesterol aus Zellmembranen und bildet dann mit dem Cholesterol Micellen in der extrazellulären Lösung. Aufgrund der o. g. Ergebnisse bei den Versuchen mit Cholesterol-Oxidase wurde bei den HEK293-Zellen zuerst eine Whole-Cell-Ableitungskonfiguration erstellt, und erst dann M β CD (10 mM) in die Badlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde 1 ng/ml Ply appliziert. Durch den Applikationsvorgang wurden Nachbarzellen weggespült, da der Verlust von Cholesterol in der Zellmembran zu einer geringeren Haftung der Zellen am Schalenboden führt. Bei 4 Experimenten an mit M β CD behandelten Zellen wurde keine Porenbildung nach der Applikation von Ply beobachtet. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich Ply auch an freies Cholesterol bindet (Kelly & Jedrzejewski 2000). Als Ursache für die fehlende Porenbildung war deshalb auch denkbar, dass Ply in den Cholesterol-haltigen M β CD-Micellen gebunden wurde, bevor es die Zellmembran erreichen konnte.

Um dieses mögliche „Abfangen“ von Ply zu verhindern, wurde nach der 60 minütigen Inkubation mit M β CD über eine Badperfusion die M β CD-haltige Extrazellulärlösung um die gemessene Zelle gegen M β CD-freie E₁-Lösung ausgetauscht. Somit stand das Cholesterol in den M β CD-Micellen nicht mehr als Bindungspartner für Ply zur Verfügung. Nach dem Perfundieren mit 2 ml E₁-Lösung wurde über die gleiche Zuleitung eine E₁-Lösung mit Ply appliziert (4 ng/ml Badkonzentration). In der Abb. 15 A sieht man eine typische Originalregistrierung von drei durchgeführten Experimenten. Ply kann nach Vorinkubation der Zellen mit M β CD keine Porenbildung bewirken. In Abb. 15 B sieht man die Registrierung eines Kontroll-experiments ohne Vorinkubation mit M β CD.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach Herauslösen von Cholesterol aus der Zellmembran mit M β CD die Applikation von Ply nicht zur Porenbildung führt, d.h. die Anwesenheit von Cholesterol in der Zellmembran ist essentiell für die Bildung von Ply-Poren.

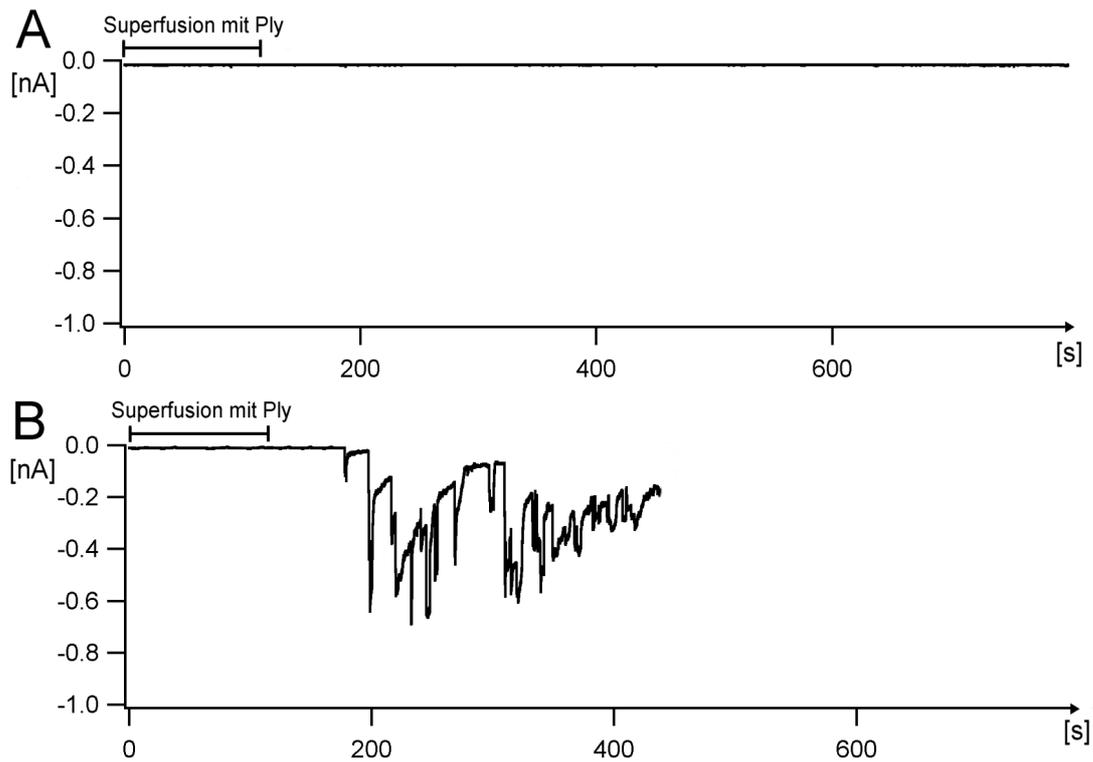


Abbildung 15: Abhängigkeit der Ply-Porenbildung von Cholesterol in der Zellmembran. Registrierung der Membranströme von zwei HEK293-Zellen bei einem Haltepotential von -50 mV. **A** Nach Erstellen einer Whole-Cell-Konfiguration wurde die Zelle in E_1 -Lösung, die M β CD (10 mM) enthielt, für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde mit einer M β CD-freien E_1 -Lösung für 2 min superfundiert. Ab Zeitpunkt 0 wurde die Zelle mit Ply-haltiger E_1 -Lösung für 120 s superfundiert (4ng/ml Badlösung). **B** Die Zelle wurde wie die Zelle in A behandelt, nur ohne M β CD. Bei beiden Experimenten wurde als Extrazellulärlösung E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_0 eingesetzt.

3.3 Pneumolysin-Wirkung an NIH3T3- und BV2-Zellen

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurden die Wirkung von Ply, die Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen, die Leitfähigkeit und die Selektivität der Poren an HEK293-Zellen dargestellt. Im Folgenden wird die Wirkung von Ply auf weitere Zelllinien untersucht.

3.3.1 NIH3T3-Zellen

Diese Fibroblastenzelllinie (NIH3T3-Zellen) besitzt einen endogenen, spannungsunabhängigen, Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal, der in seinen Eigenschaften mit dem bereits beschriebenen hSK4-Kanal übereinstimmt (Repp *et al.* 1998). Das Ruhemembranpotential der untersuchten NIH3T3-Zellen lag im Mittel bei -41 ± 5 mV (n=9). Zunächst wurde die Wirkung von 1 ng/ml Ply an NIH3T3-Zellen überprüft. Hier kam es, im Gegensatz zu HEK293-Zellen, zu keiner Porenbildung. Erst nach Erhöhung der Ply-Konzentration auf 10 ng/ml konnte eine Porenbildung gemessen werden (Abb. 16). Etwa 30 s nach Applikation von Ply öffnet sich eine Pore und unmittelbar darauf nimmt der Membranstrom auf ca. 500 pA zu. Bei diesem positiven Membranstrom handelt es sich um die Aktivierung des

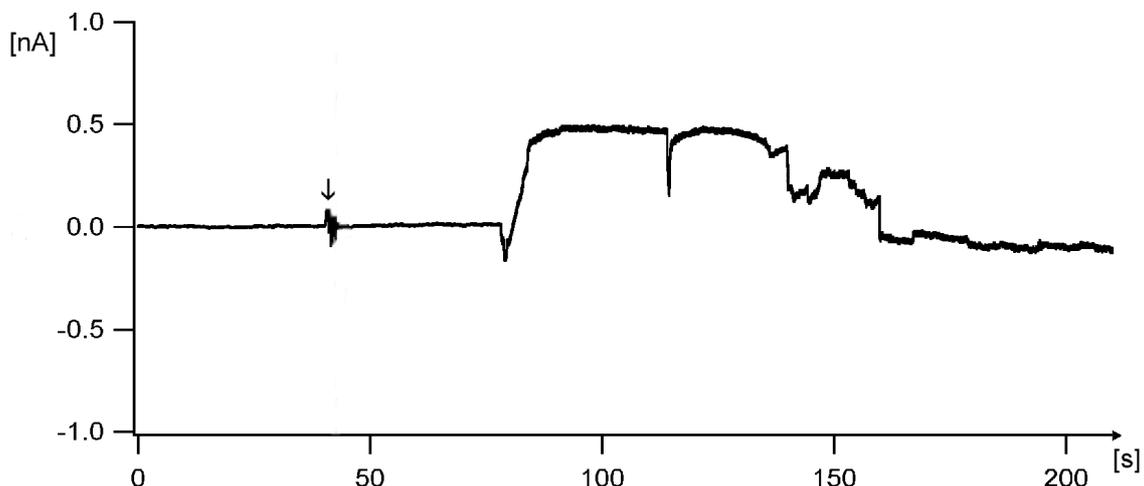


Abbildung 16: Porenbildung durch Ply an einer NIH3T3-Zelle. Registrierung des Membranstroms bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der Pfeil kennzeichnet die Applikation von 10 ng/ml Ply. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_0 eingesetzt.

Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanals, der durch den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ durch die Ply-Pore aktiviert wird. Das Membranpotential der Zelle hyperpolarisierte von -43 mV auf -91 mV. Der transiente K⁺-Strom wird von weiteren Porenöffnungen und -schließungen überlagert. In vier weiteren NIH3T3-Zellen führte bereits die erste Porenöffnung zu einer K⁺-Stromaktivierung. Dieser K⁺-Strom hatte eine Amplitude von 450 ± 98 pA (n=5) und führte zu einer Verschiebung des Membranpotentials von -41 auf -93 ± 2 mV (n=3). Bei NIH3T3-Zellen führt die Porenbildung durch Ply zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und dadurch zu einer Aktivierung Ca²⁺-abhängiger K⁺-Kanäle. Während bei HEK293-Zellen die Porenbildung schon bei einer Ply-Konzentration von 0,1 ng/ml beobachtet wurde (Tab. 4), tritt sie bei NIH3T3-Zellen erst bei einer Konzentration von mehr als 1 ng/ml auf, was auf eine geringere Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Ply hinweist.

3.3.2 BV2-Zellen

Die BV2-Zelllinie wurde aus Mikrogliazellen der Maus generiert. Mikrogliazellen gehören zu den Abwehrzellen im Gehirn und spielen u. a. eine entscheidende Rolle bei der Immunreaktion im Rahmen einer bakteriellen Meningitis und Enzephalitis. BV2-Zellen besitzen einen spannungsunabhängigen, Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal mit gleichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften wie er bereits für NIH3T3-Zellen beschrieben wurde (Schilling *et al.* 2002). Die BV2-Zellen haben im Ruhezustand ein Membranpotential von -46 ± 3 mV (n=6) und einen unspezifischen Membranstrom von -3 ± 2 mV. In der Abb. 17 sieht man, dass etwa 400 s nach der Applikation von 1 ng/ml Ply die erste Ply-Pore öffnet. Direkt nach Bildung der zweiten Pore kam es zu einer transienten Zunahme des Membranstroms. In der Folge sieht man, dass es durch die jeweiligen Porenbildungen zu einer wiederkehrenden transienten Aktivierung eines Ca²⁺-abhängigen K⁺-Stroms kommt. Dies lässt darauf schließen, dass es durch die Ply-Poren zu einem jeweils transienten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt. Die Amplitude des durch die Porenbildung aktivierten Ca²⁺-abhängigen K⁺-Stroms betrug 81 ± 11 pA (n=14), was mit einer transienten Hyperpolarisation des Membranpotentials von -46 mV auf -72 ± 4 mV (n=4) einhergeht. Die K⁺-Stromamplitude entspricht etwa 80% der maximal messbaren

Amplitude nach Aktivierung der Kanäle mit Lysophospholipiden (Schilling *et al.* 2002) und ist im Vergleich zu HEK293- und NIH3T3-Zellen deutlich niedriger.

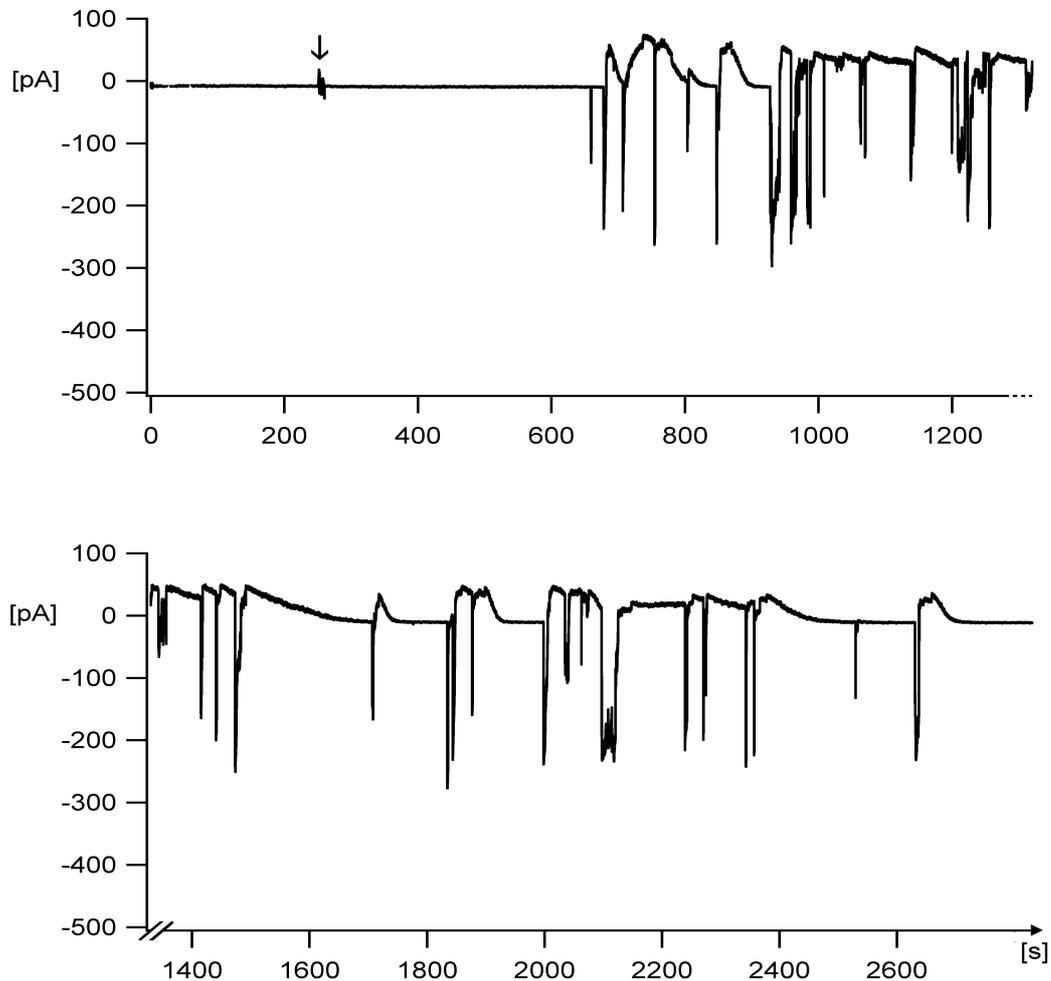


Abbildung 17: Porenbildung durch Ply in einer BV2-Zelle. Registrierung des Membranstroms bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der Pfeil kennzeichnet die Applikation von Ply (1 ng/ml). Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_0 -Lösung eingesetzt.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ply auch in der Zellmembran von Mikrogliazellen Poren bilden kann. Die Porenbildung ist bei einer sublytischen Konzentration von 1 ng/ml Ply transient und führt zu transienten Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, d.h. Ply beeinflusst unmittelbar die Ca^{2+} -Homöostase dieser Abwehrzellen des ZNS.

3.4 Experimente zur Blockade des Pneumolysin-Porenstroms

Nach der Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Ply-Poren und ihrem Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sollte nun nach Substanzen gesucht werden, die Ply-Poren blockieren können. Eine Blockade von Ply-Poren in der Membran betroffener Zellen würde den Einfluss von Ply auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und evtl. andere Signalwege stoppen und könnte so im Rahmen des Pathomechanismus einer Pneumokokken-Infektion von großer Bedeutung sein.

Zum Testen der Substanzen wurden die gut charakterisierten HEK293-Zellen bei einem Membranpotential von -50 mV gehalten und 1 ng/ml Ply appliziert. Die in der Extrazellulärlösung E_1 gelösten Testsubstanzen wurden in einem Volumen von 50 μl nach Beginn der Porenbildung in die Badlösung appliziert.

3.4.1 Substanzen ohne blockierenden Effekt auf die Pneumolysin-Poren

Bei der Suche nach Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf Ply-Porenströme haben könnten, wurden einerseits Substanzen getestet, von denen eine direkte blockierende Wirkung auf Ionenkanäle oder eine Blockade von Liganden gesteuerter Ionenkanäle bekannt war, und andererseits Vertreter von klinisch eingesetzten Wirkstoffgruppen. Die Mehrzahl der untersuchten Substanzen war ohne porenblockierenden Effekt (Tabelle 6). Die Molekulargewichte und ausgewählte Charakteristika der Substanzen sind im Abschnitt 2.4.6 beschrieben.

Tabelle 6: Substanzen ohne blockierenden Effekt auf Pneumolysin-Porenströme

Substanz	n	Badkonzentration [μM]	Wirkung auf die Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen
Acetylsalicylsäure	2	100	keine
Amantadin	3	100	keine
Amitryptillin	2	100	keine
Biperiden	2	4	keine
Certoparin	2	300 i.E.	keine
Charybdotoxin	2	0,3	keine
Cis-Atracurium	2	0,04	keine
Clotrimazol	2	100	keine

Substanz	n	Badkonzentration [μM]	Wirkung auf die Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen
Cromoglycinsäure	2	100	keine
Dantrolen	2	50	keine
Diazepam	2	100	Ply-Wirkung entspricht dem 10fachen der eingesetzten Ply-Konzentration
DIDS	3	100	Keine
Digoxin	2	0,64	Keine
Dimetinden	2	100	Keine
EDTA	2	100	Keine
Ergotamin	2	42,5	Keine
Erythromycin	2	100	Keine
Fluoxetin	2	100	Ply-Wirkung entspricht dem 10fachen der eingesetzten Ply-Konzentration
Furosemid	2	100	Keine
Iberiotoxin	2	0,3	Keine
Ketamin	2	100	Keine
S-Ketamin	2	228	Keine
Lithium	2	100	Keine
Lorazepam	2	75	Keine
Mangan (II)	2	100	Keine
Margatoxin	2	0,3	Keine
Mirtazapin	2	10	Keine
Phenobarbital	2	100	Große Poren und starke Stromschwankungen
Phenytoin	5	100	Keine
Pirfenidon	2	1000	Ply-Wirkung entspricht dem 10fachen der eingesetzten Ply-Konzentration
Procainamid	3	100	Keine
Strychnin	2	100	Keine
Succinylcholin	2	100	Keine
Tamoxifen	2	25	Keine
Terbutalin	3	55,5	Keine
Tubocurarin	6	100	Keine

Nach Applikation der Substanzen Diazepam, Pirfenidon und Fluoxetin werden Porenöffnungen und -schließungen hervorgerufen, die etwa einer 10fach höheren Ply-Konzentration entsprechen. Auffallend ist hier der Unterschied zwischen Diazepam und Lorazepam, welche beide zu den Benzodiazepinen gehören. Dies könnte an den Substanzen selbst oder an den für die lipophilen Substanzen benötigten Lösungsvermittlern liegen. Diese Effekte wurden jedoch nicht weiter

untersucht.

3.4.2 Substanzen mit blockierendem Effekt auf die Pneumolysin-Poren

Es gelang tatsächlich, einige wenige Substanzen zu finden, die Ply-Porenströme blockieren können. Zu diesen Substanzen gehören Vertreter der dreiwertigen Lanthanoide: Lanthan (La^{3+}), Gadolinium (Gd^{3+}) und Ytterbium (Yb^{3+}). Weitere Metall-Ionen wie das dreiwertige Aluminium (Al^{3+}) und das zweiwertige Zink (Zn^{2+}) haben ebenfalls eine blockierende Wirkung auf Ply-Porenströme.

Appliziert man nach Beginn der Porenbildung durch Ply La^{3+} , so verursacht es eine konzentrationsabhängige Hemmung des Porenstroms (Abb. 18). In Abb. 18A sieht man eine typische Registrierung aus insgesamt 6 Versuchen mit einer La^{3+} -Konzentration von 100 μM . Etwa 120 s nach der Ply-Applikation (1 ng/ml) setzte die Porenbildung ein. Nach weiteren 25 s wurde 100 μM La^{3+} appliziert und dadurch der Porenstrom vollständig blockiert. Es war in den beobachteten 20 Minuten (nicht komplett gezeigt) keine weitere Porenöffnung zu sehen. Das Membranpotential verringerte sich durch die La^{3+} -Applikation von -28 mV auf -9 ± 4 mV ($n=6$). Mikroskopisch sah man keine Veränderung der HEK293-Zellen nach der Applikation von La^{3+} . In Abb. 18 B sieht man eine Originalregistrierung von insgesamt vier Experimenten mit 10 μM La^{3+} . Etwa 100 s nach Ply-Applikation (1 ng/ml) setzte die Porenbildung ein. Nach weiteren 150 s wurde 10 μM La^{3+} appliziert und es kam zu einer vollständigen Blockade der Porenströme. Nach weiteren 200 s wurden wieder einzelne, kleine Porenöffnungen beobachtet. Abbildung 18 C zeigt eine Originalregistrierung von insgesamt 3 Versuchen bei einer La^{3+} -Konzentration von 1 μM . Etwa 90 s nach Applikation von Ply (1 ng/ml) begann die Porenbildung. Die Applikation von 1 μM La^{3+} nach ca. 280 s führte zu keiner signifikanten Veränderung der Öffnungen und Schließungen der Ply-Poren im Vergleich zu Kontrollregistrierungen.

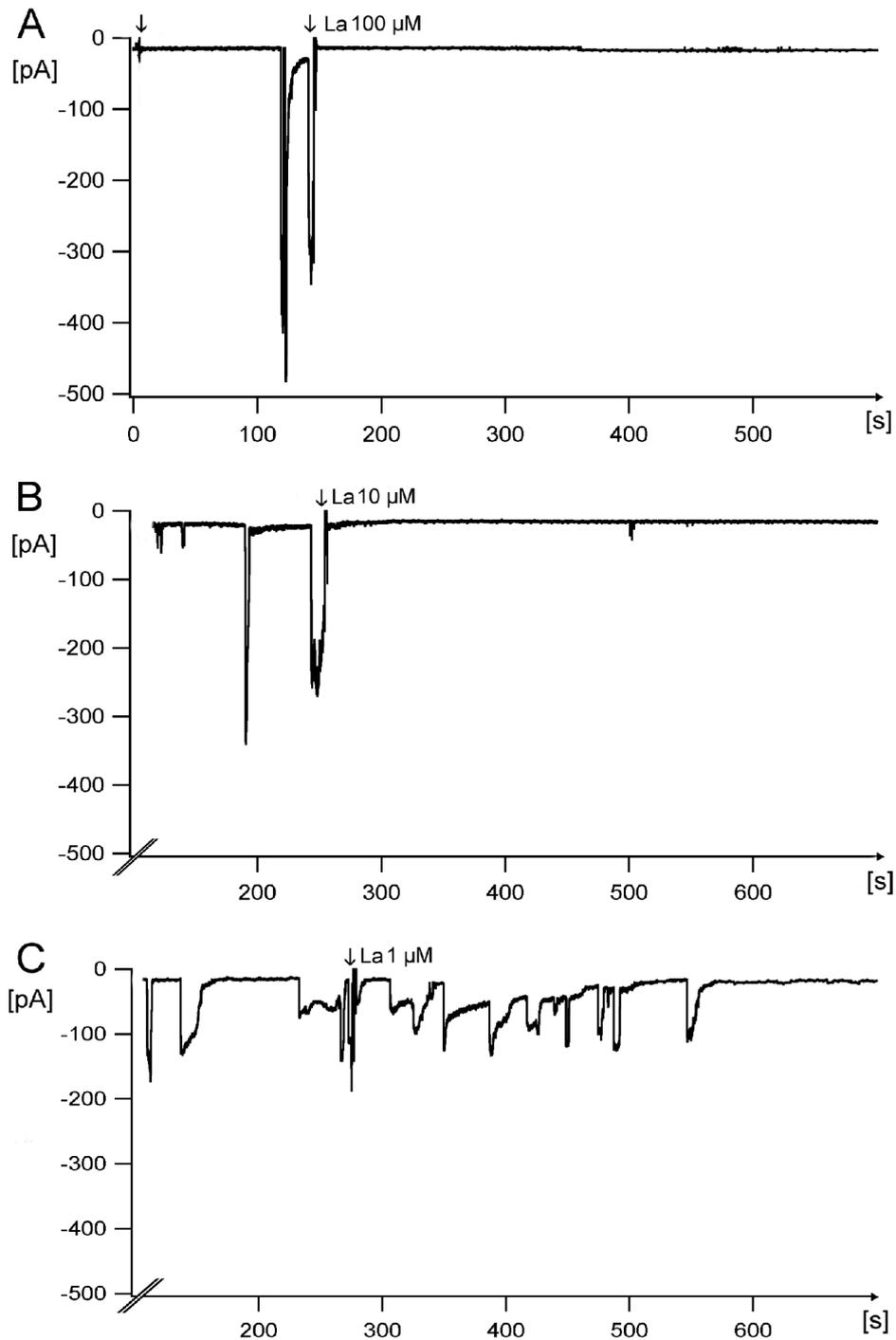


Abbildung 18: Blockade des Ply-Porenstroms durch La³⁺ in den Konzentrationen 100 μM (A), 10 μM (B) und 1 μM (C). Registrierung der Membranströme von drei HEK293-Zellen bei einem Haltepotential von -50 mV. Der erste Pfeil kennzeichnet die Applikation von Ply (1 ng/ml). Die Ply-Applikation ist wegen der längeren Zeitdauer bis zur Porenbildung in B und C nicht dargestellt. Nach Beginn der Porenbildung wurde La³⁺ in der entsprechenden Konzentration appliziert (2. Pfeil). Extrazellulär wurde E₁-Lösung, intrazellulär Ibl₁₀₀-Lösung eingesetzt.

Auch die Lanthanoide Gd^{3+} und Yb^{3+} führen zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Ply-Porenstroms. Abbildung 19 A zeigt die vollständige Blockade des Ply-Porenstroms durch $100 \mu M Gd^{3+}$. Es konnten für weitere 20 Minuten keine neuen Porenöffnungen (nicht komplett dargestellt) beobachtet werden. Das Membranpotential stieg nach der Gd^{3+} -Applikation von $-28 mV$ auf $6 \pm 4 mV$ ($n=6$). Abbildung 19 B zeigt die vollständige Blockade des Porenstroms durch $100 \mu M Yb^{3+}$. Auch hier konnten in den weiteren beobachteten 20 Minuten keine Porenöffnungen gesehen werden. Das Membranpotential betrug nach Yb^{3+} Applikation $-11 \pm 1 mV$ ($n=4$). Die Konzentrationsabhängigkeit der Gd^{3+} - und Yb^{3+} -Wirkung stimmt mit den bei La^{3+} erhaltenen Ergebnissen überein (Abb. 22).

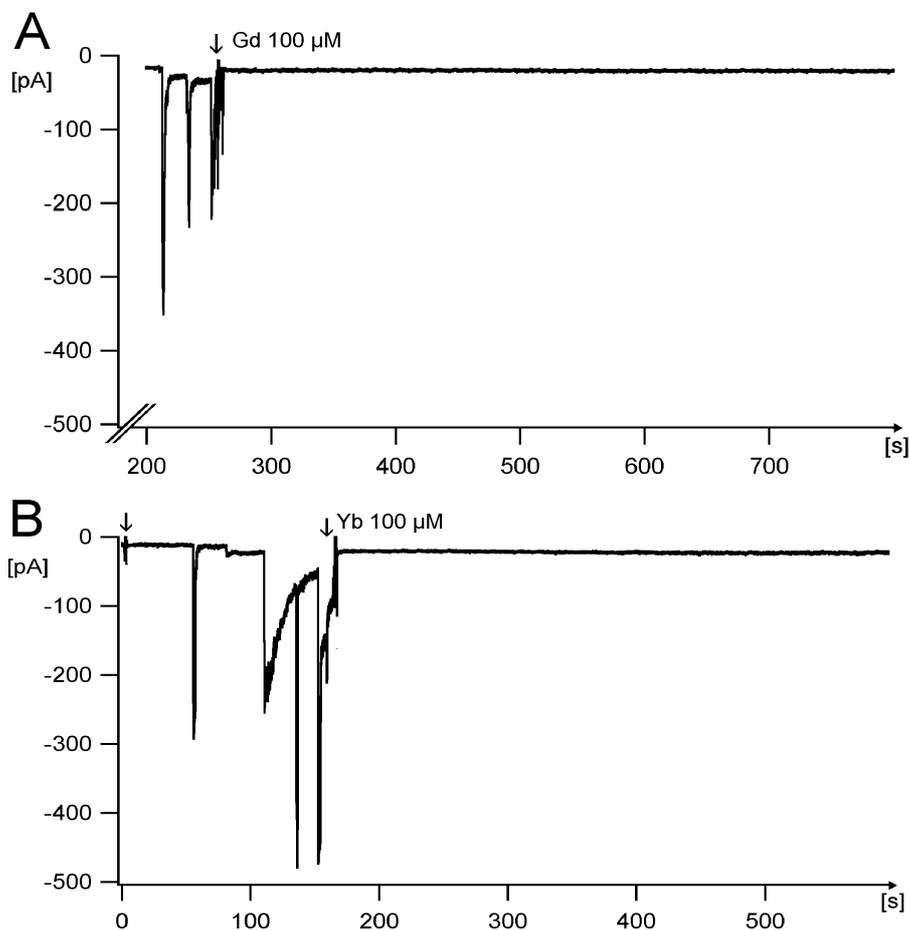


Abbildung 19: Blockade der Ply-Porenströme durch Gd^{3+} und Yb^{3+} . Registrierung des Membranstroms an HEK293-Zellen bei einem Membranhaltepotential von $-50 mV$. Ply ($1 ng/ml$) wurde zum Zeitpunkt 0 (in A nicht dargestellt) appliziert. Die Pfeile (Gd bzw. Yb) kennzeichnen die Applikation von jeweils $100 \mu M Gd^{3+}$ (A) bzw. Yb^{3+} (B). Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

Die untersuchten Lanthanoide sind alle dreiwertig. Im Folgenden wurde deshalb mit Al^{3+} ein dreiwertiges Metall-Ion untersucht, welches nicht zur Gruppe der Lanthanoide gehört (Abb. 20). Etwa 200 s nach Applikation von 1 ng/ml Ply setzte die Porenbildung ein. Nach etwa 300 s führte die Applikation von 100 μM Al^{3+} zu einer Blockade der Porenströme und der Membranstrom blieb für etwa 6,5 Minuten konstant, bis sich erneut zwei Poren öffneten. Die Zelle veränderte sich mikroskopisch nicht. Diese Beobachtung konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der blockierenden Wirkung von Al^{3+} ist in Abb. 22 dargestellt.

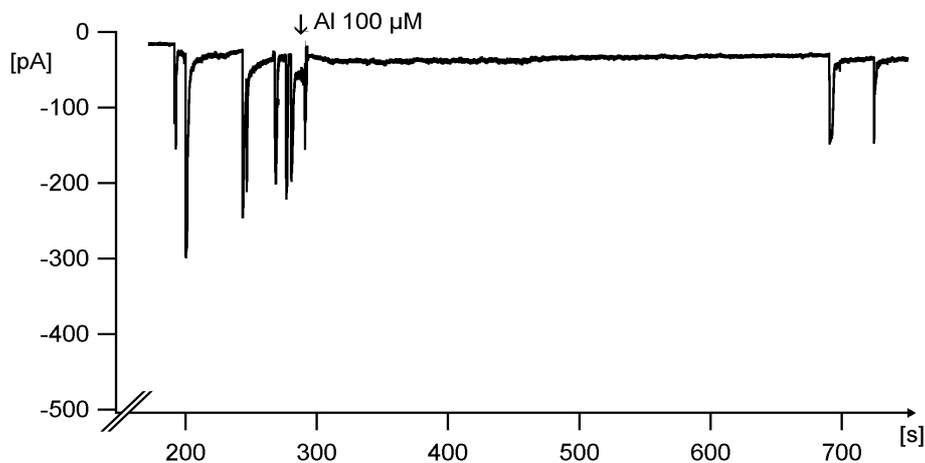


Abbildung 20: Blockade des Ply-Porenstroms durch Al^{3+} . Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Ply (1 ng/ml) wurde zum Zeitpunkt 0 appliziert (nicht dargestellt). Der Pfeil kennzeichnet die Applikation von 100 μM Al^{3+} . Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung Ibl_{100} eingesetzt.

Um die konzentrationsabhängige Wirkung der Metall-Ionen quantitativ zu bestimmen, wurde Ply in sehr hoher Konzentration eingesetzt (100 ng/ml). In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass die Membranströme bei dieser Ply-Konzentration durch schnell hintereinander öffnende Poren in sehr kurzer Zeit sehr hohe Amplituden erreichten. Appliziert man jetzt die Porenblocker, kann man die blockierende Wirkung quantitativ bestimmen (Abb. 21). Ein spontaner Porenschluss, wie er bei den niedrigen Ply-Konzentrationen auftreten und mit einer Blockade der offenen Poren durch die Metalle verwechselt werden kann, war hier ausgeschlossen.

Die Abb. 21 A zeigt die komplette Registrierung, in Abb. 21 B wurde der Bereich der La^{3+} -Applikation zeitlich gestreckt dargestellt. Zur Berechnung der prozentualen Hemmung wurden folgende Parameter bestimmt: (a) Strom-amplitude vor der Applikation der Metall-Ionen (abzüglich des unspezifischen Membranstroms) und (b) die Differenz zwischen der Stromamplitude vor der Applikation des Metall-Ions und des Membranstroms nach der Applikation.

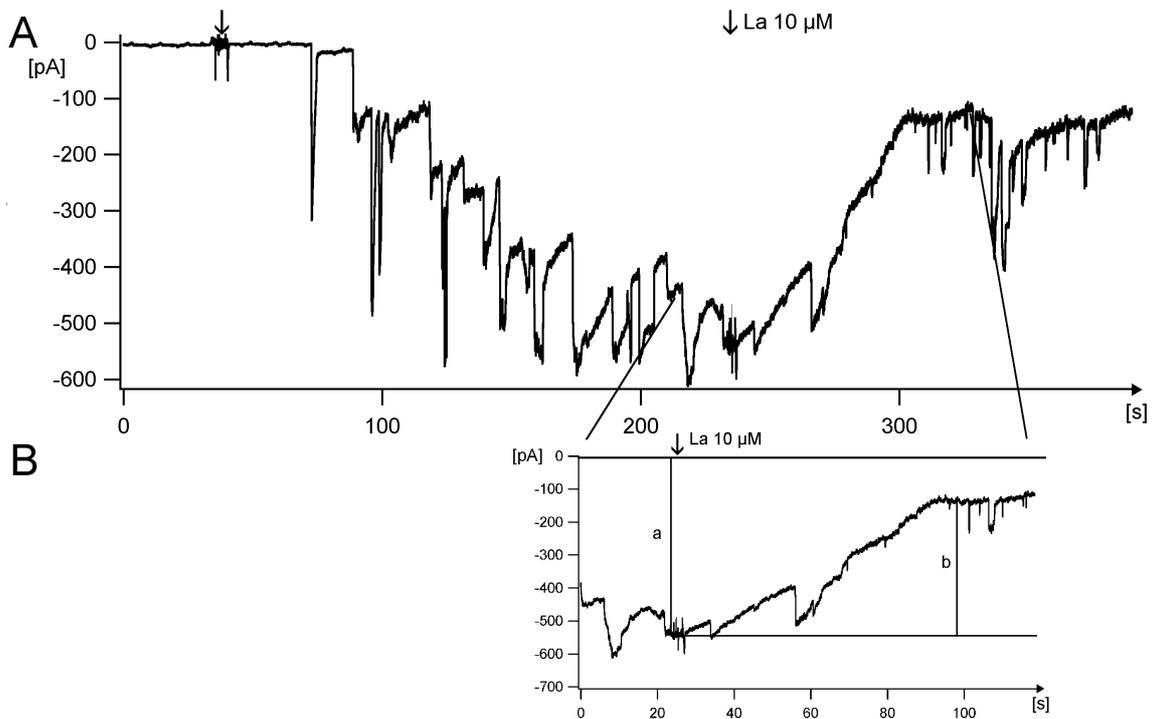


Abbildung 21: Ermittlung der prozentualen Hemmung der Ply-Poren durch die Metall-Ionen. Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltpotential von -50 mV. Der erste Pfeil (A) kennzeichnet die Applikation von Ply (100 ng/ml), der zweite Pfeil die Applikation von La^{3+} (10 μM), nachdem der Strom auf eine Amplitude von -535 pA gestiegen war. In B ist der Zeitraum um die La^{3+} Applikation zeitlich gestreckt dargestellt. Eingezeichnet sind Messparameter a: Stromamplitude vor der La^{3+} -Applikation, b: Differenz zwischen dem Membranstrom vor und dem Membranstrom nach La^{3+} -Applikation. Aus diesen Messparametern errechnete sich die Blockade [%] = $(b/a) \times 100$. Im Beispiel ist $a = -535$ pA, $b = -403$ pA und die Blockade durch 10 μM La^{3+} ist 75%.

Tabelle 7: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten der Hemmung des Pneumolysin-Porenstroms durch Metall-Ionen

	La^{3+}	Gd^{3+}	Yb^{3+}	Al^{3+}
IC ₅₀ [μM]	$3,6 \pm 1,1$	$6,1 \pm 1,0$	$3,2 \pm 1,1$	$30,3 \pm 1,1$
Hill-Koeffizient	$1,35 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,08$	$1,42 \pm 0,06$

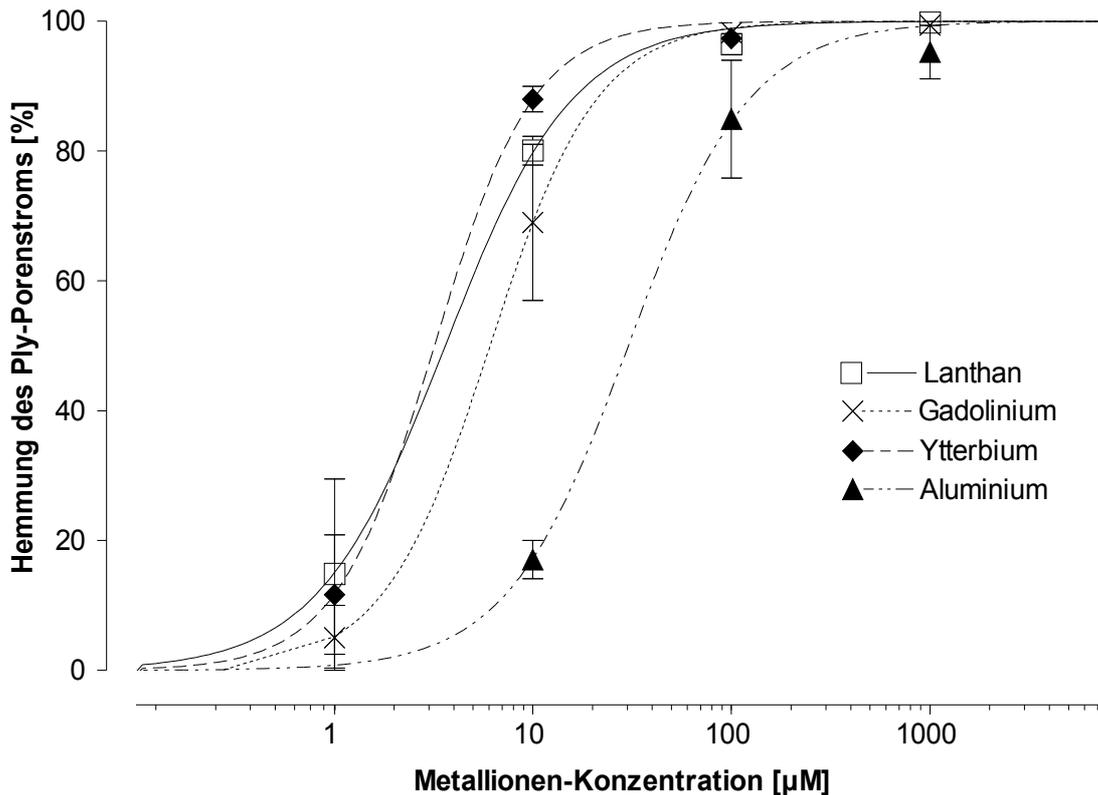


Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungskurven der Blockade des Ply-Porenstroms durch verschiedene Metall-Ionen. Auf der Ordinate ist die Hemmung in % aufgetragen, auf der Abszisse die Konzentrationen von La^{3+} (\square), Gd^{3+} (\times), Yb^{3+} (\bullet) und Al^{3+} (\blacktriangle) in μM . Die Kurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$B = \frac{B_{\max}}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{c}\right)^n}$$

nach dem Least-Squares-Verfahren an die Daten angepasst. Dabei ist B die Blockade in %, IC_{50} die halbmaximale inhibitorische Metallionen-Konzentration, c die eingesetzte Metallionen-Konzentration und n der Hill-Koeffizient.

Die Konzentrations-Wirkungskurven für La^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+} und Al^{3+} sind in Abb. 22 gezeigt. Sie haben für Al^{3+} und für die Lanthanoide La^{3+} , Gd^{3+} und Yb^{3+} einen ähnlichen Verlauf, wobei die Konzentrations-Wirkungskurve für Al^{3+} aber um eine Zehnerpotenz zu höheren Konzentrationen verschoben ist. In Tab. 7 sind die ermittelten Werte für die halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} und den Hill-Koeffizienten aufgelistet.

Die Lanthanoide La^{3+} , Gd^{3+} und Yb^{3+} blockieren den Ply-Porenstrom mit annähernd gleicher Potenz, während Al^{3+} den Ply-Porenstrom mit einer etwa 10fach geringeren Potenz blockiert.

Da sich die Lanthanoide in ihrer Potenz hinsichtlich der Blockade von Ply-Poren nicht unterscheiden, wurden die folgenden Experimente nur mit La^{3+} durchgeführt. Zunächst wurde geprüft, ob die Blockade von Ply-Porenströmen durch La^{3+} reversibel ist. Dazu wurde mit La^{3+} -freier Extrazellulärlösung superfundiert (Abb. 23).

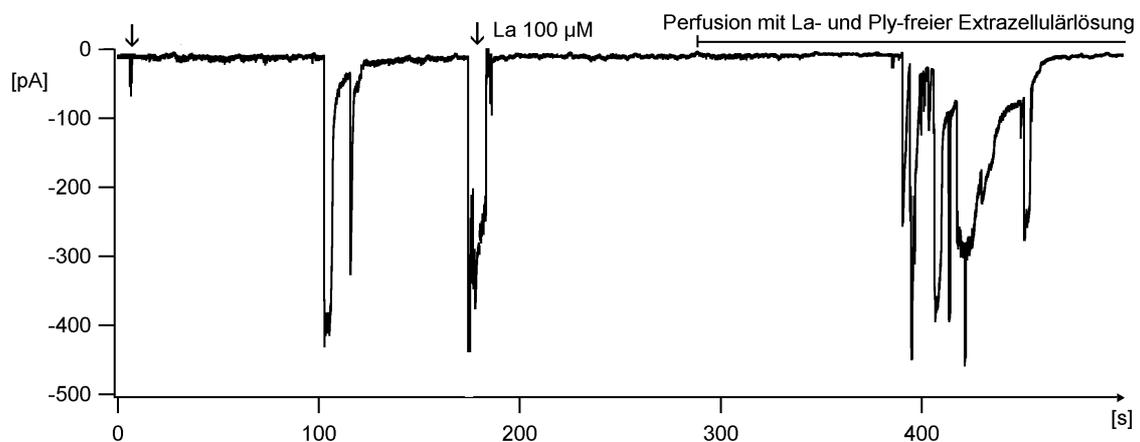


Abbildung 23: Aufhebung der La^{3+} -Blockade des Ply-Porenstroms durch Austausch der Badlösung mit La^{3+} - und Ply-freier Extrazellulärlösung. Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der erste Pfeil kennzeichnet die Applikation von Ply (1 ng/ml). Der zweite Pfeil kennzeichnet die Applikation von La^{3+} (100 μM). Ab etwa 280 s wurde die Messkammer mit La^{3+} -freier Extrazellulärlösung perfundiert. Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

Etwa 100 s nach der Applikation von Ply (1 ng/ml) setzt die Porenbildung ein und nach ca. 180 s wurden 100 μM La^{3+} appliziert. Der Porenstrom wurde vollständig blockiert und es wurden keine weiteren Porenöffnungen beobachtet. Nach etwa 280 s wurde mit der Badperfusionsanlage die Extrazellulärlösung um die gemessene Zelle gegen La^{3+} -freie E_1 -Lösung ausgetauscht. Ca. 90 s nach Beginn der Perfusion beobachtete man das Wiedereinsetzen von Porenöffnungen und -schließungen. Dies zeigt, dass durch Auswaschen der La^{3+} -Ionen die Porenblockade aufgehoben wird. Dies konnte in zwei weiteren Experimenten

bestätigt werden. Ob es sich bei den nach dem Auswaschen beobachteten Porenöffnungen um in der Membran bestehende Poren handelt, die deblockiert werden, oder ob es sich um neue Porenbildungen von an der Membran gebundenen Ply-Molekülen handelt, konnte nicht geklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Metallionen-Konzentration in der Badlösung zu verringern, ist die Bindung an Chelatbildner. Der Chelatbildner EDTA hat eine sehr hohe Affinität zu den Lanthanoiden. Bei pH 7 beträgt die Dissoziationskonstante für La^{3+} 15,1. Dabei bindet ein Molekül EDTA ein La^{3+} -Ion.

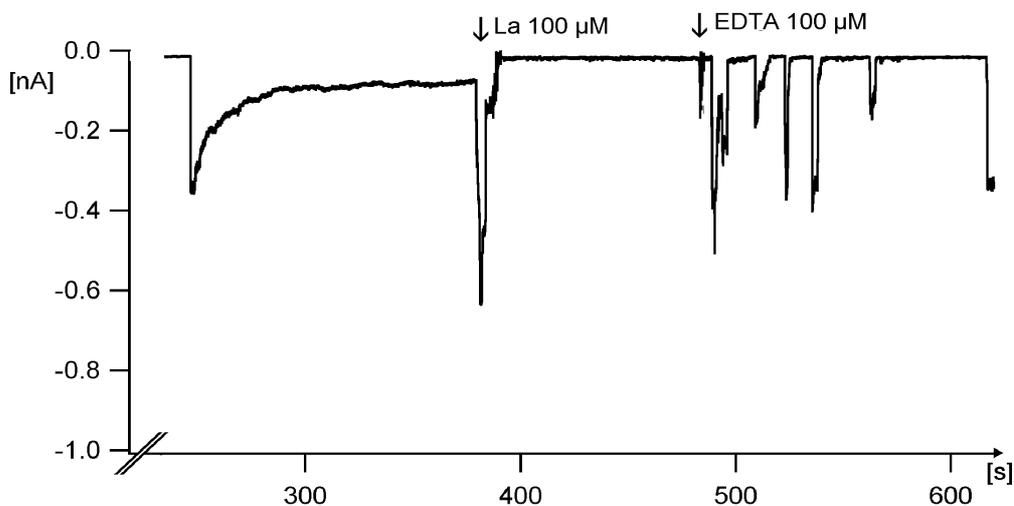


Abbildung 24: Aufhebung der La^{3+} -Blockade des Ply-Porenstroms durch EDTA. Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltpotential von -50 mV. Die Applikation von Ply (1 ng/ml) zum Zeitpunkt 0 ist nicht dargestellt. Der 1. Pfeil kennzeichnet die Applikation von 100 μM La^{3+} , der 2. Pfeil kennzeichnet die Applikation von 100 μM EDTA. Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

In Kontrollexperimenten wurde zunächst gezeigt, dass die Porenbildung durch Ply von EDTA nicht beeinflusst wird und kein schädigender Effekt auf HEK293-Zellen vorhanden ist. Danach wurde der Einfluss von EDTA auf die Ply-Porenstromblockade durch La^{3+} geprüft. Nach der Hemmung der Ply-Poren durch 100 μM La^{3+} wurde EDTA in einer Endkonzentration von 100 μM appliziert (Abb. 24). Etwa 210 s nach Applikation von 1 ng/ml Ply begann die Porenbildung. Nach weiteren 180 s wurde der Ply-Porenstrom durch 100 μM La^{3+} vollständig

blockiert. Nach weiteren 100 s wurde dann 100 μM EDTA appliziert. EDTA bindet La^{3+} und es kommt zu einer drastischen Konzentrationsabnahme an freiem La^{3+} in der Extrazellulärlösung. Dadurch kommt es zu einer Deblockade der bereits gebildeten Ply-Poren und es können erneut Porenöffnungen und -schließungen beobachtet werden. In wieweit während der Blockade der bereits gebildeten Poren durch La^{3+} noch weitere Poren durch Ply gebildet werden, konnte nicht geklärt werden.

Neben den beschriebenen Metall-Ionen hat auch Zn^{2+} einen blockierenden Einfluss auf Ply-Poren (Abb. 25). Etwa 100 s nach Applikation von Ply (1 ng/ml) beginnt die Porenbildung. Nach etwa 175 s wurde Zn^{2+} in einer Endkonzentration von 100 μM appliziert. Die Porenströme wurden unmittelbar blockiert. Nach ca. 40 s nahm der Strom erneut zu und es kam zu einem ausgeprägten Rauschverhalten des Membranstroms. Die HEK293-Zellen bildeten während der Messung blebs an der Zelloberfläche und schrumpften. In zwei weiteren Experimenten konnte ebenfalls eine Blockade von Ply-Poren beobachtet werden, es muss aber davon ausgegangen werden, dass 100 μM Zn^{2+} außerdem zu einer Schädigung der Zellen führt.

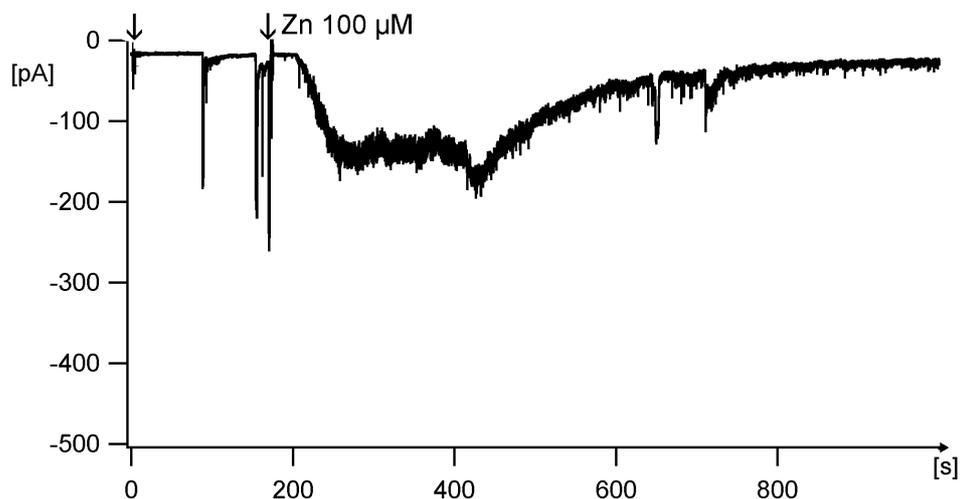


Abbildung 25: Beeinflussung des Ply-Porenstroms durch Zn^{2+} . Registrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle bei einem Membranhaltepotential von -50 mV. Der erste Pfeil kennzeichnet die Applikation von Ply (1 ng/ml), der zweite Pfeil die Applikation von Zn^{2+} (100 μM). Extrazellulär wurde E_1 -Lösung, intrazellulär Ibl_{100} -Lösung eingesetzt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Porenbildung durch den Pneumokokken-Virulenzfaktor Pneumolysin mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik nachgewiesen werden. Die elektrophysiologischen Messungen ermöglichten eine direkte Beobachtung der Porenöffnungen und -schließungen in Echtzeit und damit eine Charakterisierung der Ply-Poren hinsichtlich elektrophysiologischer und pharmakologischer Eigenschaften.

Bei der Analyse der Ply-Porenströme in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) zeigte sich, dass es eine Ply-„Grundpore“ mit einem elementaren Porenstrom von 34 pA bei einem Membranhaltipotential von -50 mV gibt. Der Ply-Porenstrom hat ein lineares Strom-Spannungs-Verhalten mit einem Umkehrpotential bei 0 mV. Aus diesen Werten errechnet sich für die Grundpore eine Elementarleitfähigkeit von 680 pS. In Experimenten an Lipid-Doppelmembranen konnten Leitfähigkeiten von weniger als 30 pS und bis über 1 nS bei Ply-Konzentrationen von 50 µg/ml registriert werden (Korchev *et al.* 1992, 1998). Diese sehr kleinen Poren haben unter den Bedingungen in dieser Arbeit eine Porenstromamplitude von -1,5 pA und können vom Grundrauschen nicht differenziert werden. In den durchgeführten Experimenten konnten sehr selten Poren ab 7 pA registriert werden, dies entspricht einer Leitfähigkeit von 140 pS. Die Häufigkeit, mit der die sehr kleinen Poren an den Lipid-Doppelmembranen auftraten, wurde in den Veröffentlichungen nicht erwähnt. Außerdem lassen sich die Experimente an Lipid-Doppelmembranen nur bedingt auf Zellmembranen übertragen. Neben der beschriebenen Grundpore mit 680 pS wurden bei der Applikation von 1 und 10 ng/ml Ply auch Poren gemessen, deren Porenstrom einem 2, 4, 5 oder 8 fachen des elementaren Porenstroms der Ply-Grundpore entspricht. Die Existenz einer Grundpore und weiterer Poren mit einem ganzzahligen Vielfachen der Leitfähigkeit wurde auch für Listeriolysin O gezeigt (Repp *et al.* 2002), das wie Ply zur Familie der Cholesterol-abhängigen Cytolysine gehört (Billington *et al.* 2000). Eine Erklärung für diesen Befund könnte sein, dass sich einzelne Ply-Grundporen zusammenlagern und es dann zu einer synchronen Öffnung dieser Gruppen von Ply-Grundporen kommt. Diese mögliche Erklärung wird unterstützt durch in der Literatur beschriebene Beobachtungen, dass solche

Leitfähigkeitssprünge aus dem synchronen Öffnen und Schließen von zusammengelagerten Gruppen von Ionenkanälen bzw. Poren resultieren können. Gezeigt wurde dies für Cl⁻-Kanäle (Krouse *et al.* 1986; Larsen *et al.* 1996), sowie für Poren, die durch Syringomycin E, einem Toxin von *Pseudomonas syringae*, gebildet werden (Kaulin *et al.* 1998) und für Ca²⁺-permeable, nicht selektive Poren durch Polycystin-2 (Gonzalez-Perret *et al.* 2001).

Die Porenbildung durch Ply ist transient, wenn sublytische Ply-Konzentrationen verwendet werden. Dies zeigte sich in Langzeitexperimenten, wobei sich nach der Applikation von Ply (1 ng/ml) zunächst schnell hintereinander Poren öffneten und schlossen. Die Häufigkeit dieser Ereignisse nahm mit fortschreitender Messdauer kontinuierlich ab, bis nach etwa 1,5 h keine Porenöffnungen mehr beobachtet werden konnten. Die Zellen zeigten danach weder morphologische Veränderungen noch eine Veränderung des Membranruhepotentials. Ob das transiente Vorhandensein der Ply-Poren einen von der betreffenden Zelle ausgehenden Eliminationsprozess widerspiegelt, oder ob Ply-Poren aus der Plasmamembran „herausdiffundieren“, ist bisher allerdings unklar.

Die Offenzeiten der Ply-Poren variieren zwischen 10 ms und mehreren hundert Sekunden. Beim Ply-Porenschluss wurden zwei unterschiedliche Kinetiken beobachtet. Etwa 44% der Ply-Poren schließen schlagartig, d.h. der Vorgang des Porenschlusses benötigt weniger als 10 ms. Etwa 28 % der Ply-Poren haben einen langsam verlaufenden Porenschluss. Zusätzlich beobachtete man bei etwa 28 % der Ply-Poren Elemente aus beiden beschriebenen Porenschluss-Kinetiken, d. h. eine Kombination aus zuerst langsamem und dann schnellem Porenschluss oder umgekehrt. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Kinetiken könnte sein, dass der schnelle Porenschluss einen Schluss der Ply-Pore selbst darstellt. Ply-Poren hätten dann, sehr ähnlich wie Ionenkanäle, einen geöffneten und einen geschlossenen Zustand, zwischen dem sie wechseln können. Den beobachteten langsamen Porenschluss könnte man als einen Abwehrversuch der betroffenen Zelle interpretieren, das „Leck“ in der Zellmembran, verursacht durch die Ply-Pore, zu „reparieren“. Die betroffene Zelle könnte über eine Endocytose des Membranabschnitts, in dem sich die Ply-Pore befindet, diese Ply-Pore beseitigen. Die Membranreparatur würde langsamer erfolgen als ein Porenschluss der Ply-

Pore selbst. Einen indirekten Hinweis für diesen von der Zelle ausgehenden Porenschluss gibt die Beobachtung, dass an Lipid-Doppelmembranen die Ply-Poren immer schnell schließen (Korchev *et al.* 1998). Da es sich bei Porenschluss und „Reparatur“ um voneinander unabhängige Prozesse handelt, könnte man so auch die beobachteten kombinierten Porenschlüsse erklären. Wenn z. B. bei einer offenen Ply-Pore die „Membranreparatur“ beginnt und sich die Pore dann selbst schließt, so würde das eine Kombination aus zuerst langsamem und dann schnellem Porenschluss hervorrufen. Inwieweit diese Hypothese stimmt, könnten zukünftige Experimente mit Hilfe von Substanzen, die zelluläre Endocytoseprozesse beeinflussen können, klären.

Zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Ply wurde die Zeitdauer von der Ply-Applikation bis zum Auftreten der ersten Pore und die über die Ply-Poren geflossene Ladung in den ersten 2 Minuten nach der ersten Porenöffnung bestimmt. Betrachtet man die Zeitdauer von der Ply-Applikation bis zum Auftreten der ersten Pore, so zeigt sich zwar eine Konzentrationsabhängigkeit, die gemessenen Werte haben aber eine große Streubreite. Dies kann man darauf zurückführen, dass die Applikation von Ply nicht immer gleichartig und in der gleichen Entfernung zur gemessenen Zelle erfolgen kann. Zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Ply wurde die geflossene Nettoladung in nC/min ermittelt. Es zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit mit einem EC_{50} -Wert von etwa 9 ng/ml Ply. Neben der beschriebenen Konzentrations-Wirkungsbeziehung konnte man beobachten, dass bei einer Ply-Konzentration von 10 ng/ml vermehrt größere Porenströme im Vergleich zu einer Ply-Konzentration von 1 ng/ml gemessen wurden. Dieses Ergebnis lässt sich mit der bereits vorgestellten Hypothese einer synchronen Aktivität von zusammengelagerten Ply-Grundporen erklären. Bei der höheren Ply-Konzentration können mehr Ply-Moleküle an die Zellmembran binden und sich daher die Anzahl zusammen gelagerter Ply-Grundporen erhöhen. Das synchrone Öffnen dieser größeren Grundporengruppen ergibt dann die größeren Porenströme bei höheren Ply-Konzentrationen.

Aufgrund des aus der Konzentrations-Wirkungsbeziehung berechneten Hill-Koeffizienten von 1,2 kann man vermuten, dass lediglich ein bis zwei Ply-Moleküle nötig sind, um eine Ply-Pore zu bilden. Es kommt bei sublytischen Ply-

Konzentrationen daher nicht zu den in der Literatur beschriebenen elektronenmikroskopisch gesehenen „Löchern“, die aus 30-50 Ply-Molekülen bestehen sollen und einen Innendurchmesser von bis zu 30 nm haben (Billington *et al.* 2000). Für diese elektronenmikroskopischen Experimente wurden Ply-Konzentrationen von bis zu 1 mg/ml eingesetzt, während in der vorliegenden Arbeit Porenströme bei Ply-Konzentrationen im ng/ml Bereich gemessen wurden. Es ist daher denkbar, dass die elektronenmikroskopisch dargestellten Ansammlungen von Ply-Molekülen nicht den elektrophysiologisch, d.h. funktionell nachgewiesenen Ply-Poren entsprechen.

Für Listeriolysin O wurde eine erhöhte cytolytische Aktivität bei niedrigeren pH-Werten beschrieben (Glomski *et al.* 2002). Um eine solche pH-Abhängigkeit für Ply zu untersuchen, wurde eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Ply bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 ermittelt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentrations-Wirkungskurve, in der Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen und in der Amplitude der Porenströme zu den Experimenten bei einem pH-Wert von 7,35. Zumindest für den untersuchten Bereich hat also der pH-Wert keinen Einfluss auf die Porenbildung durch Ply.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Selektivität der Ply-Poren für unterschiedliche Ionen untersucht. Dabei wurden die intra- und die extrazellulären Ionenlösungen so verändert, dass man anhand der Strom-Spannungs-Kurven und an den Amplituden der Porenströme auf die Leitfähigkeit für bestimmte Ionen schließen konnte. Es zeigte sich, dass die Ply-Poren leitfähig sind für die Kationen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cholin, TEA und Arginin sowie für die Anionen Cl^- und Glutamat. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man die Ply-Poren auch als unselektive Ionenkanäle beschreiben, die auch für größere Moleküle leitfähig sind.

Durch die Ply-Poren kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Dieser Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde an transfizierten HEK293-Zellen, die einen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal (hSK4) exprimieren, nachgewiesen. Direkt nach Öffnung einer Ply-Pore kam es zur Aktivierung von hSK4-Kanälen. Der entsprechende K^+ -Strom war transient und konnte nach erneuten Porenöffnungen jeweils wieder beobachtet werden, d.h. die offenen Ply-Poren führten zu einer sich

wiederholenden Aktivierung dieses K^+ -Stroms. Nach Austausch von Ca^{2+} gegen Ba^{2+} in der Extrazellulärlösung kam es zu keiner K^+ -Stromaktivierung nach Ply-Porenbildung. Das extrazelluläre Ca^{2+} strömt also durch die Ply-Poren nach intrazellulär und ist für die Aktivierung der hSK4-Kanäle verantwortlich. In weiteren Experimenten wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums durch Inkubation mit Thapsigargin entleert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich bei einer Ply-Konzentration von 1 ng/ml in 3 von 4 Zellen keine Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Stroms in HEK293hSK4-Zellen. Bei einer Zelle kam es nach lediglich einer Pore zu einem K^+ -Strom mit niedriger Amplitude. Erhöhte man die Ply-Konzentration auf 10 ng/ml, konnte man, trotz der entleerten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, eine Aktivierung des K^+ -Kanals beobachten. Diese Experimente weisen darauf hin, dass bei einer Ply-Konzentration von 10 ng/ml die gebildeten Ply-Poren allein einen so hohen Ca^{2+} -Einstrom bewirken, dass es zur Aktivierung der hSK4-Kanäle kommt. Bei niedrigeren Ply-Konzentrationen reicht allerdings das durch die Ply-Poren einströmende Ca^{2+} nicht aus, die hSK4-Kanäle zu aktivieren. Aufgrund dieser Experimente an den transfizierten HEK293-Zellen kann man davon ausgehen, dass unter physiologischen Bedingungen die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher des sarco/endoplasmatischen Retikulums den Ca^{2+} -Einstrom durch die Ply-Poren verstärken.

Nach Abschluss der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Messungen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Messstand für intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsmessungen eingerichtet. Dadurch war es möglich, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-Zellen und HEK293hSK4-Zellen nach Ply-Applikation zu beobachten. In diesen Experimenten zeigte sich deutlich ein wiederholter, transients Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unter Einwirkung von Ply (1 ng/ml). Diese Daten zur direkten Messung der Ca^{2+} -Konzentration korrelieren sehr gut mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle durch Ply. Ein Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle beeinflusst vielfältige inter- und intrazelluläre Signale (Berridge *et al.* 1998). Oszillierende Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sollen zu

Änderungen in der Genexpression führen (Dolmetsch *et al.* 1997, 1998). Ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg durch Ply wird in der Literatur für eine Apoptose bei Mikroglia- und Nervenzellen verantwortlich gemacht (Braun *et al.* 2002). Desweiteren wird beschrieben, dass der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ursächlich für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Auslösung einer verstärkten Entzündungsreaktion durch Ply ist (Cockeran *et al.* 2001). Dies könnte bedeuten, dass die transienten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstiege durch die Ply-Poren ein wichtiger Bestandteil des Pathomechanismus von Ply sind.

Man geht davon aus, dass Ply mit dem Carboxy-terminal gelegenen Undekapeptid an Cholesterol in der Zellmembran bindet, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und das Ply-Molekül lipophiler wird (Kelly & Jedrzejak 2000). Erst diese Konformationsänderung soll es ermöglichen, dass Ply-Moleküle in die Membran inserieren und dann zur Zellyse führen können. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals direkt gezeigt werden, dass Cholesterol in der Zellmembran essentiell für die Bildung von Ply-Poren ist. Wenn HEK293-Zellen mit Methyl-Beta-Cyclodextrin, das Cholesterol aus der Zellmembran herauslöst, vorbehandelt wurden, konnte keine Porenbildung durch Ply beobachtet werden.

Durch die „Auswasch“-Experimente wurde gezeigt, dass es zur Porenbildung durch Ply auch dann kommt, wenn man bereits eine Minute nach Ply-Applikation die Badlösung gegen Ply-freie Extrazellulärlösung austauscht. Dieser Befund zeigt, dass Ply-Moleküle innerhalb von einer Minute mit einer so hohen Affinität an der Membran binden, dass sie nicht mehr auswaschbar sind. Die Bildung funktioneller Poren setzt offensichtlich zeitlich verzögert nach der Bindung von Ply-Molekülen an der Zellmembran ein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ply auch in zwei weiteren Zelllinien transient Poren bildet. Bei den untersuchten Mäusefibroblasten (NIH3T3-Zellen) und auch bei den Mäuse-Mikroglia (BV2)-Zellen kam es durch die Ply-Poren zu einem transienten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg und damit zu einer Aktivierung endogener Ca^{2+} -abhängiger, spannungsunabhängiger K^{+} -Kanäle. Auffallend war eine etwa 10fach geringere Empfindlichkeit der NIH3T3-Zellen gegenüber Ply im Vergleich zu den HEK293-Zellen, d.h. es kam erst bei einer Ply-Konzentration von 10 ng/ml zu einer Porenbildung. Eine auffallend

geringe Empfindlichkeit für den cytolytischen Effekt von Ply wurde kürzlich auch für Lungenepithel-Zellen und Monozyten gefunden (Hirst *et al.* 2002). Die Ursache für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten verschiedener Zelltypen gegenüber Ply und anderen Mitgliedern der CDC-Familie ist nicht bekannt. Eine mögliche Ursache könnte die Verteilung von Cholesterol in der Zellmembran sein. Die Cholesterol-Konzentration ist zwar in der Plasmamembran aller Säugetierzellen sehr ähnlich, aber Cholesterol ist nicht homogen in der Membran verteilt, sondern bildet Areale höherer Cholesterol-Konzentration, so genannte lipid rafts (Brown 2002). Geht man davon aus, dass nach Bindung eines Ply-Moleküls an Cholesterol in der Zellmembran eine Konformationsänderung stattfindet und es erst danach zu einer Oligomerisierung, d.h. Anlagerung weiterer (cholesterolgebundener) Ply-Moleküle zu einer funktionellen Pore kommt, so könnte die unterschiedliche Cholesterol-Konzentration in den „lipid rafts“ verschiedener Zelltypen deren unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Ply erklären.

Mit der beobachteten Porenbildung an BV2-Zellen wurde die direkte Ply-Wirkung an einem Zelltyp gezeigt, der bei einer Pneumokokken-Meningitis unmittelbar betroffen ist. Mikrogliazellen sind spezialisierte Makrophagen, die der Phagozytose von Krankheitserregern im ZNS dienen und so eine wichtige Rolle bei der lokalen Infektabwehr spielen. Auffallend ist der bei BV2- im Vergleich zu HEK293-Zellen geringere Anstieg des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Stroms nach einer Porenbildung und die kürzere Zeit der K^+ -Stromaktivierung, was zu einer höheren Häufigkeit transienter K^+ -Stromaktivierungen führt.

Es gibt Hinweise, dass Ply auch von intakten Pneumokokken ausgeschleust werden kann (Balachandran *et al.* 2001). Welche Rolle diese Freisetzung im Rahmen einer Pneumokokken-Infektion spielt, ist bisher allerdings unklar. Die wichtigste Quelle für die Freisetzung von Ply stellen abgetötete und lysierte Pneumokokken dar. Für die antibiotische Therapie der Pneumokokken-Infektion bedeutet dies, dass die Antibiotika-Wirkung zwangsläufig zur Ply-Freisetzung führt. Eine Hemmung der Ply-Porenbildung wäre also ein sinnvoller Ansatz, pharmakologisch die Antibiotikatherapie zu ergänzen. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Substanzen gesucht, welche den Ply-Porenstrom blockieren können. Zuerst wurden Substanzen untersucht, die endogene

Ionenkanäle wie Na^+ oder K^+ -Kanäle blockieren können, andere, die die Rezeptoren von ligandengesteuerten Ionenkanälen kompetitiv blockieren, bzw. eine Blockade des zum Rezeptor zugehörigen Ionenkanals bewirken. Diese dabei untersuchten Substanzen zeigten keinen blockierenden Effekt auf den Ply-Porenstrom. Auch diejenigen untersuchten Substanzen, die klinisch am Menschen eingesetzt werden, jedoch keine Ionenkanal blockierenden Effekte besitzen zeigten keinen Einfluss auf den Ply-Porenstrom. Bei den untersuchten Substanzen Diazepam, Fluoxetin und Pirfenidon zeigte sich jedoch eine etwa um den Faktor 10 verstärkte Ply-Porenbildung. Ein verstärkender Effekt auf Ply-Poren und die daraus evtl. resultierende klinische Relevanz wurde jedoch nicht weiter untersucht, da in der vorliegenden Arbeit nur nach Porenblockern gesucht werden sollte.

In der Tat konnten in der vorliegenden Arbeit Substanzen gefunden werden, die Ply-Poren blockieren können. Bei diesen Substanzen handelt es sich um dreiwertige Metall-Ionen, wie Al^{3+} und die Lanthanoide La^{3+} , Gd^{3+} und Yb^{3+} . Durch Applikation der Lanthanoide (je 100 μM) bzw. von Al^{3+} (1 mM) konnte der Ply-Porenstrom vollständig blockiert werden. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen sind bei den Lanthanoiden und dem Al^{3+} sehr ähnlich. Für alle vier Substanzen lässt sich ein gleicher Hill-Koeffizient von etwa 1,5 berechnen. Al^{3+} mit einem IC_{50} -Wert von ca. 30 μM ist um eine Zehnerpotenz weniger potent als die drei Lanthanoide mit einer IC_{50} von 3-6 μM . Die Blockade des Ply-Porenstroms wurde für das Lanthanoid La^{3+} als Vertreter für die gefundenen Porenblocker intensiver untersucht. Verringerte man nach Blockade des Ply-Porenstroms die extrazelluläre Konzentration von La^{3+} wieder, konnte man innerhalb weniger Sekunden wieder Porenöffnungen und -schließungen beobachten. Die Verringerung der La^{3+} -Konzentration erfolgte dabei zum einen durch Austausch der Extrazellulärlösung und zum anderen durch Bindung an den Chelator EDTA. Die Porenblockade durch La^{3+} resultiert offensichtlich aus einer reversiblen Bindung der Kationen in oder an der Ply-Pore, wobei die Aufhebung der Porenblockade durch Entfernen des La^{3+} aus dieser Bindung dazu führt, dass die vorher blockierten, aber noch in der Membran befindlichen Ply-Poren wieder durchlässig werden. Außerdem werden die dann wieder gebildeten Poren offenbar

nicht sofort durch Metallionen blockiert.

An Lipid-Doppelmembranen konnte ein porenblockierender Effekt von Ca^{2+} in einem Konzentrationsbereich von 10-20 mM beobachtet werden (Korchev *et al.* 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Ply-Poren bei physiologischen Lösungsverhältnissen für Ca^{2+} permeabel sind und diese nicht blockieren. Ein porenblockierender Effekt für so hohe Ca^{2+} -Konzentrationen ist aufgrund der toxischen Wirkung klinisch nicht anzuwenden und wurde hier auch nicht untersucht.

Über die Toxikologie der Lanthanoide ist nur wenig bekannt. Welche Konzentrationen an freiem La^{3+} in vivo toleriert werden, ist in der Literatur nicht beschrieben. La^{3+} (1 mM) vermindert die mitogeninduzierte Proliferation von Lymphozyten drastisch, was die beobachteten entzündungshemmenden Effekte erklären könnte (Yamaga & Evans 1989). In millimolaren Konzentrationen kommt es zur Zerstörung von Endothelzellen durch La^{3+} und damit zu einer Zerstörung der Blut/Organ-Grenzen (Marciniak *et al.* 1988). In neueren Studien wird eine zytostatische Wirkung von La^{3+} -Komplexen auf unterschiedliche Tumorzelltypen beschrieben (Wang 2002). Gd^{3+} wird in der diagnostischen Radiologie als Magnetresonanz-Kontrastmittel verwendet, ist hierbei jedoch an einen Chelator gebunden (Behra-Miellet *et al.* 1996; Spinosa *et al.* 2002). Im Tierversuch an der Maus wurde gezeigt, dass freies Gd^{3+} toxisch ist, wenn über 14 Tage jeweils 200 μg i.v. appliziert werden, was einem maximalen Plasmaspiegel von 750 μM entspricht. Es kommt dann zum Anstieg der Leberenzyme und zu multifokalen Leberzelldegenerationen, die von Infiltraten neutrophiler Granulozyten begleitet sind (Wasserman *et al.* 1996). Diese Intoxikationszeichen werden allerdings nicht beobachtet, wenn die Tagesdosis auf ein Drittel reduziert wird ($\approx 250 \mu\text{M}$). Das dritte in der vorliegenden Arbeit als Ply-Porenblocker identifizierte Lanthanoid Yb^{3+} wurde bis heute nur wenig untersucht und es gibt keine Berichte über toxische Wirkungen am Menschen. Beschrieben ist allerdings ein Anstieg der Leberenzyme nach Applikation an der Ratte (Nakamura *et al.* 1997). Insgesamt scheinen die toxischen Effekte von Lanthanoiden erst in Konzentrationsbereichen von mehreren hundert μM aufzutreten.

Im europäischen Trinkwasser kommt Al^{3+} in einer Konzentration von etwa 0,1 mg/l vor, nachgewiesene Spitzenwerte liegen bei 26 mg/l, und wird daher täglich vom Menschen oral aufgenommen. Die Aufnahme über die Nahrung beträgt etwa 5-15 mg/Tag. Außerdem werden Aluminiumsalze (z.B. $\text{Al}(\text{OH})_3$) zum Neutralisieren des sauren Magensaftes klinisch eingesetzt. Allerdings wird nur etwa 1% der oral aufgenommenen Menge resorbiert. Lediglich bei langfristiger Einnahme hoher Dosen sind Störungen des Phosphathaushalts und Enzephalopathien beobachtet worden (Forth *et al.* 2001; Mutschler *et al.* 2001). Außerdem gibt es eine Studie, die eine längerfristige Einnahme von hochdosiertem Al^{3+} mit neurodegenerativen Veränderungen in Verbindung bringt (Soni *et al.* 2001). Ein möglicher Einsatz von Al^{3+} im Rahmen einer Pneumokokken-Erkrankung würde aber nur sehr kurzzeitig erfolgen; Daten über die Akuttoxizität von Al^{3+} liegen bisher allerdings nicht vor.

Aus diesen allgemeinen Überlegungen zur Toxizität heraus müssen nun zunächst weitere Versuche an Zellkulturen und dann im Tiermodell gemacht werden. Es stehen dazu zwei Tiermodelle zur Verfügung, und zwar das Maus-Pneumonie-Modell (Azoulay-Dupuis *et al.* 2004) und das Maus-Meningitis-Modell (Wellmer *et al.* 2002). Es muss herausgefunden werden, ob die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ply-Porenblocker den Verlauf einer Pneumokokken-Erkrankung positiv beeinflussen, ohne dabei selbst toxische Eigeneffekte zu entwickeln. Außerdem können die Porenblocker helfen, die pathophysiologische Bedeutung von Ply-Poren weiter zu untersuchen. Es wäre ein großer Erfolg, wenn man mit den gefundenen Ply-Porenblockern eine antibiotische Therapie der invasiven Pneumokokken-Infektionen unterstützen könnte und so den Krankheitsverlauf mildern und die Folgeschäden reduzieren könnte.

5 Literaturverzeichnis

Abdel Ghani EM, Weis S, Walev I, Kehoe M, Bhakdi S, Palmer M (1999) Streptolysin O: inhibition of the conformational change during membrane binding of the monomer prevents oligomerization and pore formation. *Biochemistry* 38:15204-15211

Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ (2001) Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 69:3569-3575

Alouf JE (2000) Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol* 145:1-26

Azoulay-Dupuis E, Bedos JP, Mohler J, Schmitt-Hoffmann A, Schleimer M, Shapiro S (2004) Efficacy of BAL5788, a prodrug of cephalosporin BAL9141, in a mouse model of acute pneumococcal pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1105-1111

Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183:3108-3116

Barry PH, Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121:101-117

Behra-Miellet J, Gressier B, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC (1996) Free gadolinium and gadodiamide, a gadolinium chelate used in magnetic resonance imaging: evaluation of their in vitro effects on human neutrophil viability. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18:437-442

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

Berridge MJ (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235-249

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648

Billington SJ, Jost BH, Songer JG (2000) Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 182:197-205

Bonev B, Gilbert R, Watts A (2000) Structural investigations of pneumolysin/lipid complexes. *Mol Membr Biol* 17:229-235

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109:19-27

Brockmeier D (1991) HOEGIP-PC: An interactive program package for the evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data. User Manual. *Internal Report, Hoechst AG*

Brown D (2002) Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol* 291:433-437

Cockran R, Theron AJ, Steel HC, Matloa NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R (2001) Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis* 183:604-611

Dolmetsch RE, Lewis RS, Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858

Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936

Forth WH, Rummel W, Förstermenn U, Starke K (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Urban & Fischer Verlag

Galione A, Churchill GC (2002) Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 32:343-354

Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36:10959-10974

Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* 156:1029-1038

Gomez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Garcia U, Guerrero-Hernandez A (2003) SERCA pump optimizes Ca²⁺ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys J* 85:370-380

Gonzalez-Perret S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 98:1182-1187

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

Hirst RA, Yesilkaya H, Clitheroe E, Rutman A, Duffy N, Mitchell TJ, O'Callaghan C, Andrew PW (2002) Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun* 70:1017-1022

Hotze EM, Wilson-Kubalek EM, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK (2001) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* 276:8261-8268

Kaulin YA, Schagina LV, Bezrukov SM, Malev VV, Feigin AM, Takemoto JY, Teeter JH, Brand JG (1998) Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophys J* 74:2918-2925

Kelly SJ, Jedrzejewski MJ (2000) Structure and molecular mechanism of a functional form of pneumolysin: a cholesterol-dependent cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Struct Biol* 132:72-81

Korchev YE, Bashford CL, Pasternak CA (1992) Differential sensitivity of pneumolysin-induced channels to gating by divalent cations. *J Membr Biol* 127:195-203

Korchev YE, Bashford CL, Pederzoli C, Pasternak CA, Morgan PJ, Andrew PW, Mitchell TJ (1998) A conserved tryptophan in pneumolysin is a determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers. *Biochem J* 329:571-577

Koschinski A (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Krouse ME, Schneider GT, Gage PW (1986) A large anion-selective channel has seven conductance levels. *Nature* 319:58-60

Larsen EH, Gabrieli SE, Stutts MJ, Fullton J, Price EM, Boucher RC (1996) Endogenous chloride channels of insect sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. *J Gen Physiol* 107:695-714

Ley SG (2000) Zur Impfung gegen Pneumokokken-Infektionen. *Epidemiologisches Bulletin* 97 - 98

Marciniak M, Baltrukiewicz Z, Chas J (1988) The effect of toxic doses of lanthanum and cerium on the placental barrier and the blood/organ barrier in mice after intravenous injection of these elements. *Acta Physiol Pol* 39:294-299

Mathie A, Woollorton JR, Watkins CS (1998) Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol* 30:13-24

Mutschler EG, Kroemer H, Schäfer-Korting M (2001) Mutschler Arzneimittelwirkung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

Nagamune H, Whiley RA, Goto T, Inai Y, Maeda T, Hardie JM, Kourai H (2000) Distribution of the intermedilysin gene among the anginosus group streptococci and correlation between intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* 38:220-226

Nakamura Y, Tsumura Y, Tonogai Y, Shibata T, Ito Y (1997) Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats. *Fundam Appl Toxicol* 37:106-116

Nau R, Bruck W (2002) Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25:38-45

Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-131

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

Palmer M, Vulicevic I, Saweljew P, Valeva A, Kehoe M, Bhakdi S (1998) Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry* 37:2378-2383

Repp H, Koschinski A, Decker K, Dreyer F (1998) Activation of a Ca^{2+} -dependent K^+ current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:509-517

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

Rosjohn J, Gilbert RJ, Crane D, Morgan PJ, Mitchell TJ, Rowe AJ, Andrew PW, Paton JC, Tweten RK, Parker MW (1998) The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284:449-461

Schilling T, Repp H, Richter H, Koschinski A, Heinemann U, Dreyer F, Eder C (2002) Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Neuroscience* 109:827-835

Shepard LA, Shatursky O, Johnson AE, Tweten RK (2000) The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry* 39:10284-10293

Soni MG, White SM, Flamm WG, Burdock GA (2001) Safety evaluation of dietary aluminum. *Regul Toxicol Pharmacol* 33:66-79

Spinosa DJ, Kaufmann JA, Hartwell GD (2002) Gadolinium chelates in angiography and interventional radiology: a useful alternative to iodinated contrast media for angiography. *Radiology* 223:319-325; discussion 326-317

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bahr M, Michel U, Nau R (2002) Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11:355-368

Takemura H, Thastrup O, Putney JW, Jr (1990) Calcium efflux across the plasma membrane of rat parotid acinar cells is unaffected by receptor activation or by the microsomal calcium ATPase inhibitor, thapsigargin. *Cell Calcium* 11:11-17

Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ (1987) Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 55:1184-1189

Wang ZM, Lin HK, Zhu SR, Liu TF, Chen YT (2002) Spectroscopy, cytotoxicity and DNA-binding of the lanthanum(III) complex of an L-valine derivative of 1,10-phenanthroline. *J Inorg Biochem* 89:97-106

Wasserman AJ, Monticello TM, Feldman RS, Gitlitz PH, Durham SK (1996) Utilization of electron probe microanalysis in gadolinium-treated mice. *Toxicol Pathol* 24:588-594

Weibull W (1951) A statistical distribution of wide applicability. *J Applied Mechanics* 73:293-297

Wellmer A, Zysk G, Gerber J, Kunst T, Von Mering M, Bunkowski S, Eiffert H, Nau R (2002) Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 70:6504-6508

Yamage M, Evans CH (1989) Suppression of mitogen- and antigen-induced lymphocyte proliferation by lanthanides. *Experientia* 45:1129-1131

6 Zusammenfassung

Pneumolysin (Ply) ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Streptococcus pneumoniae*, einem Gram-positivem Bakterium, welches lebensbedrohliche Infektionen wie Meningitis, Pneumonie und Sepsis auslöst. Ply gehört zur Familie der Cholesterol-abhängigen Toxine und führt in hohen Konzentrationen zur Lyse von Zielzellen. In dieser Arbeit wurde erstmals direkt die Porenbildung durch Ply in sublytischer Konzentration elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode untersucht. Hierbei wurden HEK293-, NIH3T3- und BV2-Zellen eingesetzt. Ply führt konzentrationsabhängig zu transienten Porenöffnungen und -schließungen. Die Porenbildung ist an die Anwesenheit von Cholesterol in der Zellmembran gebunden. Es existiert eine elementare Ply-Grundpore mit einer Leitfähigkeit von 680 pS. Größere Porenströme kommen wahrscheinlich durch gleichzeitiges Öffnen von mehreren in Gruppen liegenden Grundporen zustande. Die Ply-Poren weisen keine Selektivität für die Kationen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cholin, TEA und Arginin sowie für die Anionen Cl^- und Glutamat auf. Durch die Ply-Poren fließt Ca^{2+} in die Zellen und es kommt zu einer transienten Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ein unmittelbarer Effekt ist die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger, spannungsunabhängiger K^+ -Kanäle. Die durch Ply-Poren bedingte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung kann durch Ca^{2+} -Freisetzung aus endogenen Speichern verstärkt werden.

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, Substanzen zu finden, die den Ply-Porenstrom blockieren können. Durch die Metalle aus der Gruppe der Lanthanoide La^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+} (je 100 μM) sowie durch Al^{3+} (1 mM) wird der Ply-Porenstrom vollständig blockiert. Die Blockade ist konzentrationsabhängig und reversibel. Die als Ply-Porenblocker identifizierten Metalle weisen eine sehr ähnliche Konzentrations-Wirkungsbeziehung auf, wobei die 10fach geringere Potenz des Al^{3+} auffällt. Mit der Blockade von Ply-Poren könnten sich neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, die die Antibiotikatherapie von invasiven Pneumokokken-Infektionen ergänzen könnten.

7 Summary

Pneumolysin (Ply) is a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*, a Gram-positive bacterium that can cause life-threatening diseases, such as meningitis, pneumonia and sepsis. Ply belongs to the group of cholesterol-dependent cytolysins and induces lysis of target cells at high concentrations. The present work demonstrates for the first time the pore formation induced by Ply in sublytic concentrations directly by using the patch-clamp technique. Using HEK293-, NIH3T3- and BV2-cells it was demonstrated that Ply leads to transient pore-openings and closings in a concentration-dependent manner. Pore formation by Ply depends essentially on the presence of cholesterol within the plasma membrane. An elementary pore with a conductance of 680 pS was identified. Ply-induced pores most probably form clusters that exhibit synchronized opening and closing states. These Ply-formed pores are non-selective for cations such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺, cholin, TEA and arginin and anions such as Cl⁻ and glutamate. Ply-induced pore formation causes a transient increase of the intracellular Ca²⁺ concentration leading to a direct activation of Ca²⁺-dependent and voltage-independent K⁺-channels. Furthermore, the Ply-dependent Ca²⁺ influx can be amplified by intracellular Ca²⁺ stores.

The present work describes for the first time substances that can block the current through Ply-induced pores. The lanthanoides La³⁺ (100 μM), Gd³⁺ (100 μM) as well as Yb³⁺ (100 μM) and the metal ion Al³⁺ (1 mM) caused a complete blockade of the pore current. The blockade is concentration-dependent and reversible. The metal ions that were identified as blockers of Ply pores exhibit similar dose-response-curves, in which a tenfold lower potency of Al³⁺ becomes apparent. These new pore blockers could provide further therapeutic approaches to supplement the antibiotic therapy of pneumococcal diseases.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Betreuer Professor Florian Dreyer danken, dass er es mir ermöglicht hat in seinem Labor die Patch-Clamp-Technik zu erlernen und die hier vorliegende Arbeit zu absolvieren. Er war die gesamte Zeit über ein hilfsbereiter Ansprechpartner und hat seine Aufgabe als Doktorvater sehr ernst genommen. Insbesondere freute mich auch seine Anteilnahme an privaten Dingen. Mein nächster Dank gilt Dr. Holger Repp, der mich lehrte, wissenschaftliche und allgemeinpolitische Dinge zu hinterfragen und immer bereit war eine konstruktive Diskussion, auch beim Verfassen der Dissertation, zu führen. Für meine praktische Ausbildung und die praktische Betreuung möchte ich Dr. Andreas Koschinski und Jan Birringer danken. Sie hatten immer Ideen und Vorschläge und sie haben alles stehen und liegen gelassen, um ein Problem zu lösen. Für die intensive Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Amplitudenhistogramme danke ich Professor Dr. D. Brockmeier. Ein weiterer Dank gilt unserer MTA Christiane Zibuschka, die mir viel geholfen hat und die sich um meine Zelllinien kümmerte, wenn ich nicht da war. Für die freundschaftliche Stimmung und die gegenseitige Unterstützung danke ich meinen Doktorandenkollegen Susanne Butler, Christina Rospel, Anke Bennert und Jörg Bittenbring.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Kerstin die mich tatkräftig unterstützt und meine laborbedingte Abwesenheit von zu Hause immer toleriert hat.

9 Lebenslauf

Geboren: am 10. März 1977 in Frankfurt am Main

Familienstand: verheiratet

Bildungsweg:

Schulen:

- 08/1983 - 07/1993 Grundschule und Mittelstufe in Frankfurt
- 05/1994 - 01/1997 Fernstudium zum Abitur, von 06/1996 bis 01/1997 in Vollzeit, mit erfolgreicher Externenprüfung zur allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote: 2,2)

Berufsausbildung:

- 09/1993 - 06/1996 Ausbildung zum Biologielaboranten bei der Firma Hoechst AG im Stammwerk Frankfurt; Abschlussprüfung vor der IHK Frankfurt
- 01/1997 - 12/1997 Ausbildung zum Rettungssanitäter bei der Rettungswache Bergen-Enkheim e.V.
- 09/1999 - 10/2000 Berufsbegleitende Ausbildung zum Rettungsassistenten bei ProMedical, Prüfung durch die Zentrale Ausbildungsstätte des DRK Frankfurt e.V.

Studium:

- 10/1997 - 04/2000 Studium der Humanbiologie und Humanmedizin an der Phillips-Universität in Marburg mit Bestehen des Vordiploms (gut) und der Ärztlichen Vorprüfung (gut)
- 04/2000 - 04/2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen und Abschluss mit dem 3. Staatsexamen 04/2002 (sehr gut)
- Seit 04/2001 Dissertation bei Professor Dr. F. Dreyer im Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Berufliche Tätigkeit:

06/1997 - 05/1998	Aushilfstätigkeit in der Notaufnahme des St. Katharinen-Krankenhauses in Frankfurt/M
06/1997 - 12/1998	Feste Aushilfstätigkeit im Rettungsdienst Frankfurt/M, bei der Rettungswache Bergen - Enkheim e.V.
01/1999 - 03/2002	Angestellter Rettungssanitäter mit 50% Arbeitszeit beim Malteser Hilfsdienst gGmbH im Rettungsdienst der Stadt Frankfurt/M, seit 11/2000 Einsatz als Rettungsassistent
04/2002 - 09/2004	Aushilfe beim Malteser Hilfsdienst gGmbH als Rettungsassistent im Rettungsdienst Frankfurt/M
06/2004 – 09/2004	Arzt im Praktikum bei Professor Dr. M. Kaps in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Seit 10/2004	Assistenzarzt bei Professor Dr. M. Kaps in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.