

**Elektrophysiologische Charakterisierung
der durch α -Hämolysin von *Escherichia coli* induzierten
Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen**

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

vorgelegt von
Nadia Kičová
aus Königgrätz, CZ

Gießen 2007

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

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

2. Gutachter: Fr. Prof. Dr. Füssle

Tag der Disputation: 8.10.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Escherichia coli</i>	1
1.2	α -Hämolysin	3
1.3	Aufgabenstellung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Zellkultur	7
2.2	Vorbereitung der Zellen	8
2.3	Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes	8
2.4	Herstellung der Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")	10
2.5	Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik	10
2.6	Ionenlösungen	11
2.7	Korrektur der Liquid-Junction-Potentiale	12
2.8	Lagerung und Aufbereitung des Toxins	13
2.9	Substanzliste	14
2.10	Statistische Auswertung und Darstellung	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen	16
3.2	Charakterisierung der durch α -Hämolysin induzierten Poren	17
3.2.1	Porenbildung durch α -Hämolysin	17
3.2.2	Elementare Porenströme der α -Hämolysin-Poren	20
3.2.3	Ionenselektivität der α -Hämolysin Poren	23
3.2.4	Permeabilität der α -Hämolysin-Poren für Calcium	27
3.3	Modulation der Porenbildung durch physiologische Faktoren	29
3.3.1	Einfluss divalenter Kationen	29
3.3.2	Temperaturabhängigkeit	31
3.3.3	Einfluss des pH-Wertes	33

4	Diskussion	37
5	Zusammenfassung	45
6	Summary	46
7	Literaturverzeichnis	47
8	Danksagung	54
9	Lebenslauf	55

1 Einleitung

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) ist ein gramnegatives, sporenloses, peritrich begeißeltes und bewegliches Stäbchenbakterium. Es wurde 1884 von Theodor Escherich als erstes spezifisches Darmbakterium beschrieben. *E.coli* gehört zusammen mit *E.blattae*, *E.fergusonii*, *E.hermanii* und *E.vulneris* zur Familie der Enterobacteriaceae (Hof 2000).

Der natürliche Lebensraum von *E.coli* ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Der Erreger wird über kontaminiertes Trinkwasser, Lebensmittel oder an Gegenständen haftend übertragen. *E.coli* gehört zu den klassischen Fäkalindikatoren. Sein Nachweis in Trinkwasser oder Lebensmitteln zeugt von einer Verunreinigung mit menschlichen oder tierischen Exkrementen. Über die Kontaminierung verursacht der Erreger im menschlichen Körper zwei Arten von Infektionen. Man unterscheidet die intestinale von der extraintestinalen Infektion. Unter intestinaler Infektion versteht man eine Schädigung durch den Erreger innerhalb des Darms. Intestinale Infektionen mit *E.coli* sind durch massive Diarrhöen gekennzeichnet. Die extraintestinale Infektion entsteht durch eine „Verschleppung“ der Erreger aus dem Darm und kann sich im Auftreten eines Harnwegsinfektes, einer Cholezystitis, Appendizitis, Peritonitis, Zystopyelonephritis, Prostatitis, Epididymitis, Bronchitis, in Brochiektasien, Abszessen, postoperativen Wundinfekten oder Sepsen zeigen. Die Bakterien gelangen z.B. durch eine Schmierinfektion aus dem Darm zum Ostium urethrae. Von dort aus bewegen sie sich mit Hilfe ihrer Geißel bis in die Harnblase. Einige Stämme besitzen so genannte P-Fimbrien, auch PAP (Pylonephritis-assoziierte Pili) genannt, die sich spezifisch an das Epithel der harnableitenden Wege anhaften. Sobald ein enger Kontakt zustande gekommen ist, schädigen Bakterientoxine, z.B. Hämolysine, die Zellwand der Blase. Dadurch wird eine Invasion der Bakterien vorbereitet. Das Resultat dieser Invasion ist eine Entzündung des Epithels, die sogar in einer Urosepsis enden kann. Besonders begünstigend für die extraintestinale Infektion mit *E.coli* ist eine bestehende Anomalie der harnableitenden Wege (vesikouretraler Reflux oder medizinische Manipulationen wie z.B. Katheterisierung). Diese Umstände fördern die Aszension

ins Nierenbecken (Hahn 2004). *E.coli* ist für 15% aller nosokomialen Sepsen verantwortlich. Besonders gefährlich ist für Früh- und Neugeborene sowie alte Menschen neben der durch *E.coli* verursachten Meningitis auch die gramnegative Sepsis mit Endotoxinschock (Kayser 2005). Immunsupprimierte, Säuglinge oder Menschen mit einer entsprechenden Disposition gehören zu den Personengruppen, für die eine Infektion mit *E.coli* am stärksten gefährdend ist.

Einige Stämme von *E. coli* sind für den Menschen darmpathogen, da sie Mechanismen besitzen, die dem Körper Schaden zufügen können. Man kennt als Verursacher vier Subtypen, die unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren und individuelle Folgeerscheinungen besitzen. So unterscheidet man *EPEC* (*Enteropathogenes E.coli*), *ETEC* (*Enterotoxinbildendes E.coli*), *EIEC* (*Enteroinvasives E.coli*) und *EHEC* (*Enterohämorrhagisches oder Verotoxinproduzierendes E.coli*). *EPEC* wird wegen der seltenen Säuglingsdiarrhöe, die lebensbedrohlich werden kann, gefürchtet. *ETEC* verursacht ein choleraähnliches Krankheitsbild und ist im hohen Maße verantwortlich für die Reisediarrhöe. *EIEC* bewirkt eine ruhrähnliche Infektion, welche die Darmmukosa zerstören kann. *EHEC* verursacht eine hämorrhagische Kolitis und daneben das hämolytisch-urämische Syndrom.

Zur Therapie der extraintestinalen Infektion steht nur die gezielte Antibiotikatherapie nach Austestung der Erregerempfindlichkeit zur Verfügung. Es werden Co-trimoxazol, Amoxicillin und Fluorchinolone eingesetzt. Bei der intestinalen Infektion ist eine antibiotische Therapie nicht zwingend notwendig, da hier die Bekämpfung der Diarrhöe, besonders des Elektrolyt- und Wasserverlusts im Vordergrund steht (Herold 2006). Die Prophylaxe besteht in der konsequenten Wahrung von Hygieneschutzmaßnahmen, z.B. das Abkochen von Speisen, Wasser und das Händewaschen nach Kontakt.

1.2 α -Hämolyisin

Zytolysine sind Virulenzfaktoren vieler pathogener Bakterien. Sie zerstören tierische oder menschliche Zellen, indem sie die Zellmembran schädigen. Man unterscheidet porenbildende und enzymatisch aktive Zytolysine. Die bakteriellen porenbildenden Zytolysine repräsentieren eine heterogene Gruppe von Exotoxinen. Sie kommen sowohl bei gramnegativen als auch bei grampositiven Bakterien vor. Porenbildende Zytolysine grampositiver Bakterien liegen bereits in ihrer aktiven Form vor, während Zytolysine gramnegativer Bakterien aus ihrem inaktiven Zustand mittels proteolytischer Prozesse in eine aktive Form umgewandelt werden müssen. α -Hämolyisin (α -Hly) ist ein solches porenbildendes Zytolysin und ein bedeutender Pathogenitätsfaktor von *E.coli*. Es wird von *E.coli*-Stämmen produziert, die den Urogenitaltrakt befallen (Welch et al. 1981). Diese gehören der Familie der uropathogenen *E.coli* (*UPEC*) an.

Als Toxin gehört α -Hly zu der Gruppe der RTX-Toxine (repeats-in-toxin). Die RTX-Toxine repräsentieren unter den gramnegativen Bakterien die größte Gruppe porenbildender Zytolysine. Weitere Vertreter der RTX-Gruppe sind z.B. Toxine von *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Actinobacillus*, *Pasteurella haemolytica* und *Bordetella pertussis*. α -Hly ist der Prototyp eines RTX-Toxins. In Abbildung 1 ist das α -Hly-Protein schematisch mit seinen funktionellen Domänen dargestellt.

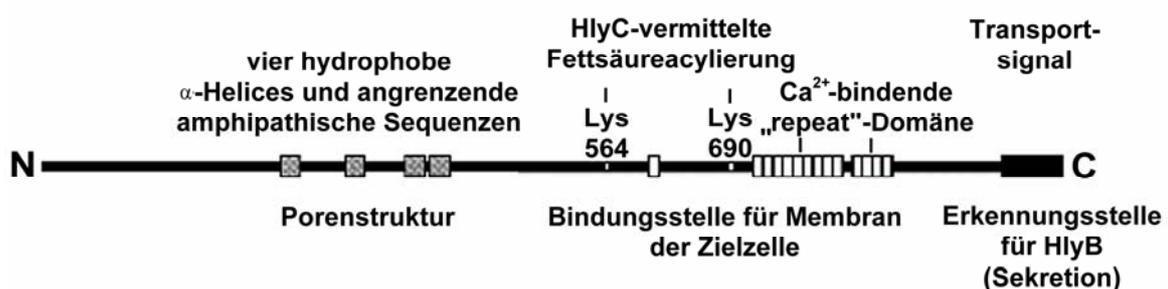


Abbildung 1: Schematische Darstellung von α -Hly und seiner funktionellen Domänen (veränderte Abbildung nach Ludwig & Goebel, 1987).

RTX-Toxine unterscheiden sich von anderen Toxinen durch einige besondere Merkmale. Ihr bedeutendstes Merkmal ist eine charakteristische „repeat“ Domäne, die aus einer Toxin-spezifischen Wiederholung von Glycin- und Aspartat-reichen Sequenzen gebildet wird (Abb. 1). Diese sich wiederholenden Sequenzen geben den RTX-Toxinen auch ihre Bezeichnung (repeats-in-toxin).

α -Hly hat eine relative Molmasse von 110 kDa und besteht aus 1024 Aminosäuren (Menestrina et al. 2003). Seine Bildung und Sekretion wird von den vier Strukturgenen *HlyC*, *HlyA*, *HlyB* und *HlyD* gesteuert (Felmlee et al. 1985), die auch in dieser Reihenfolge in einem Operon vorliegen. Das Gen *HlyA* ist das Strukturgen des Toxins und kodiert das inaktive Protoxin (proHlyA). *HlyC* kodiert das zytosplasmatische Protein HlyC, das für die Umwandlung des inaktiven proHlyA in das hämolytisch aktive Toxin notwendig ist. Bei diesem für die porenbildende Aktivität des α -Hlys essentiellen Schritt wird das proHlyA post-translational durch die Acylierung zweier interner Lysinreste (Lys-564, Lys-690) aktiviert (Issartel et al. 1991; Stanley et al. 1994). *HlyB* und *HlyD* kodieren für zwei Membranproteine, die für die Sekretion des Hämolsins benötigt werden (Goebel et al. 1982; Wagner et al. 1983). Zusammen mit einem weiteren Membranprotein, TolC, bilden sie einen spezifischen Transportapparat, der eine Signalsequenz aus 50-60 Aminosäuren am C-terminalen Ende des α -Hly-Moleküls erkennt und das Molekül durch die Membran in den Extrazellulärraum sezerniert (Wagner et al. 1983; Wandersman et al. 1990). Nach der Ausschleusung aus der Bakterienzelle benötigt das Toxin zur Aktivierung noch Calcium, das an die „repeat“-Domäne des C-terminalen Endes gebunden wird (Ludwig et al. 1988; Boehm et al. 1990). Das so aktivierte α -Hly kann dann an die Membran von Zielzellen binden und transmembranäre Poren bilden, wobei diese Poren von 4 hydrophoben Domänen in der N-terminalen Hälfte des ansonsten hydrophilen Moleküls gebildet zu werden scheinen (Ludwig et al. 1991).

Durch die Bildung dieser transmembranären Poren in Lipidmembranen verursacht α -Hly vielfältige Reaktionen an den betroffenen Zellen. In lytischen Konzentrationen kommt es durch die große Anzahl gebildeter Poren zu einem osmotisch bedingten Wassereinstrom in die Zellen, was schließlich zur Lyse der

Zelle führt. α -Hly kann Erythrozyten, polymorph-nukleare Leukozyten (PMN) und Monozyten lysieren (Cavalieri et al. 1984; Bhakdi et al. 1990). Es ist zytotoxisch für T-Lymphozyten (Jonas et al. 1993) und kann lokale Gewebsschädigungen verursachen, indem es Gewebszellen zerstört (Keane et al. 1987; Mobley et al. 1990). Diese zellschädigende bzw. -auflösende Aktivität des Toxins gegenüber Gewebszellen ermöglicht es den Bakterien auch in tiefere Gewebsschichten vorzudringen. Das Toxin begünstigt so auf direktem Wege weitere bakterielle Infektionen (Suttorp et al. 1990). Niedrige, sublytische Konzentrationen von α -Hly verursachen ein breites Spektrum an Sekundärreaktionen in den Zielzellen für welche die häufige α -Hly-induzierte, transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen, sog. Calciumoszillationen verantwortlich gemacht wird. Auf diese Weise können intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die z.B. Apoptose auslösen (Gordo et al. 2002), oder auch der Zelle helfen zu überleben, indem der NF- κ B-Signalweg aktiviert wird (Dolmetsch et al. 1998). α -Hly fördert die Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie die der Zytokine IL-6 und Chemokine IL-8. Es stimuliert die Sekretion von Interleukin-1 (IL-1) aus Monozyten und anderen Zellen (Bhakdi et al. 1990, 1991; Grimminger et al. 1991) und induziert die Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren in Leukozyten und Blutplättchen (Konig et al. 1986, 1990, 1993; Grimminger et al. 1990, 1991). Es wird vermutet, dass α -Hly verschiedene zelluläre Reaktionen mittels Phosphatidylinositol-Signaltransduktion hervorruft (Grimminger et al. 1991, 1997; Konig & Konig 1993).

1.3 Aufgabenstellung

Es ist festzustellen, dass α -Hly ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher Reaktionen an Zellen hervorrufen kann und schon eine Vielzahl an Untersuchungen zur Wirkung von α -Hly auf Zellen oder Organismen vorliegen. In diesem Zusammenhang ist es umso erstaunlicher, dass außer einigen Untersuchungen an künstlichen Lipid-Membranen die elektrophysiologischen Eigenschaften des α -Hlys an Membranen lebender Zellen bisher kaum untersucht worden sind.

Deswegen sollte im Vordergrund meiner Arbeit zunächst die Charakterisierung der Porenbildung durch α -Hly an HEK293-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik stehen. Dabei sollten α -Hly-induzierte Poren in Hinblick auf ihre biophysikalischen Eigenschaften wie Bildungskinetik, Porenstromamplitude, Ionenselektivität, Porenöffnung- und -schlusskinetik sowie Abhängigkeit der Porenbildung vom Membranpotential hin untersucht werden.

Von klinischer Bedeutung und damit von großem Interesse war die Frage, ob die porenbildende Aktivität von α -Hly durch physiologische Faktoren beeinflussbar ist. Unter diesem Aspekt sollte der Einfluss relevanter Parameter wie Temperatur, pH-Wert und divalenter Kationen auf die Toxinaktivität untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Es wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

HEK293-Zellen

HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney) sind für elektrophysiologische Experimente zur Untersuchung der Porenbildung besonders gut geeignet, da sie nur eine geringe Aktivität endogener Ionenkanäle aufweisen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer 1:1 Mischung aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und Ham's F12, der 10 % Kälberserum (FKS) sowie 2 mM L-Glutamin-Lösung zugesetzt wurden. Das Zellkulturmedium enthielt noch zusätzlich 64,8 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin.

Die Zellen wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einem Partialdruck von 6 % CO₂ in einem Zellinkubator (CO₂-Inkubator, Fa. Heraeus, Hanau) kultiviert. Alle 48 h wurde das Zellkulturmedium (10 ml) gewechselt, bis der Boden der Petrischalen (Ø 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphat-gepufferter Lösung (PBS= phosphate buffered saline [in mM]: 120 NaCl, 3,4 KCl, 10,1 NaH₂PO₄, 2,2 K₂HPO₄) gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 5 ml trypsinhaltiger PBS-Lösung (0,05 % w/v) behandelt, bis im Lichtmikroskop eine beginnende Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden beobachtet werden konnte. Die Zellen wurden dann mit einer 10 ml Glaspipette suspendiert, in Zellkulturmedium (10 ml) aufgenommen und in der gewünschten Menge auf neue Petrischalen überführt. Die Verdünnung betrug in Abhängigkeit von der Dichte des Zellrasens 1:5 bis 1:10.

HEKhsK4-Zellen

HEKhsK4-Zellen sind HEK293-Zellen, denen das Gen für einen calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal (hsK4=human small conductance „Kalium“ channel Nr. 4), mit einem Gen für Geneticinresistenz gekoppelt, stabil transfiziert worden war. Sie wurden zur Beurteilung der Calcium-

permeabilität von α -Hly-Poren eingesetzt, da sie schon auf geringfügige Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Aktivierung der hK4-Kanäle reagieren. HEKhsK4-Zellen wurden in HEK293-Zell-Medium (s.o.) kultiviert, dem zusätzlich 400 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin zugesetzt worden war. Dadurch wurden die Zellen eliminiert, die das transfizierte Gen durch Mutation verloren hatten.

2.2 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden 36-48 h vor den elektrophysiologischen Experimenten in einer Verdünnung von 1:10 (etwa 200 μl Zellsuspension (s.o.) auf 2 ml Medium) in 35 mm Petrischalen ausgesät. Es wurde darauf geachtet, dass sich kein geschlossener Zellrasen gebildet hatte und die Zellen in ihrer proliferativen Phase gemessen wurden. Bei den Messungen wurden nur Zellen berücksichtigt, die in Form, Größe und Aussehen den typischen HEK-293-Zellen entsprachen und keine Kontakte zu anderen Zellen aufwiesen.

Für die Messung wurde der Zellrasen 3-5 x mit Extrazellulärlösung gespült und anschließend mit 2 ml der Extrazellulärlösung bedeckt. Nach einigen Minuten konnten die eigentlichen Experimente beginnen.

2.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes

Der Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes wird zum einen in einer Übersicht (Abb. 2A), zum anderen detaillierter in der Abbildung 2B gezeigt. Die Messkammer des Patch-Clamp-Messstandes bestand aus einer Petrischale ($\text{\O} 35 \text{ mm}$), in der die HEK293-Zellen vor den Experimenten kultiviert wurden. Die Halterung der Petrischale ermöglichte die Fixierung der Zellen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Wetzlar) und eine gleichzeitige Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung (Temperaturcontroller, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). In der Messkammer befanden sich sowohl die Badelektrode aus chloriertem Feinsilberdraht (Fa. Heraeus, Hanau) als auch die Patchpipette, die aus einer Glaskapillare bestand und mit 10 μl Intrazellulärlösung gefüllt war. Um die für die Patch-Clamp-Messungen gewünschten Über- und

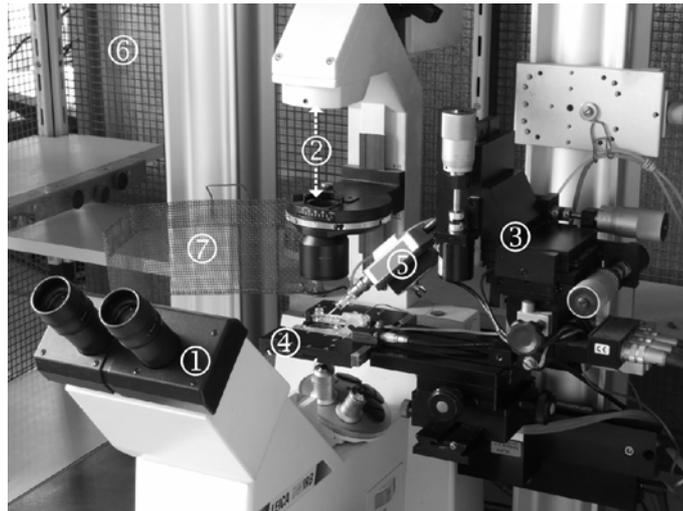


Abbildung 2A: Ansicht eines Patch-Clamp-Messstandes

1: Inverses Phasenkonstrastmikroskop (Leica DM-IRB), **2:** Beleuchtungseinheit mit Kondensator, **3:** Mikromanipulator (Joysticksteuerung nicht abgebildet), **4:** Temperaturkontrollierter Kreuztisch, **5:** Patchpipette, Pipettenhalterung und Vorverstärker, **6:** Gitter des Faraday'schen Käfigs und **7:** weiteres Gitter zum Vorklappen vor dem Kreuztisch, beide zum Schutz vor elektromagnetischen Störeinstrahlungen.



Abbildung 2B: Vergrößerte Ansicht der Messanordnung

1: 35 mm Petrischale mit Zellen („Badkammer“), **2:** Badelektrode aus chloriertem Silber, **3:** Patchpipette, über Befestigung **(4)** direkt mit dem Vorverstärker **(5)** verbunden, **6:** Silikonschlauch, über den ein Über- oder Unterdruck auf die Pipettenlösung gegeben werden kann, **7:** Klemme für die 35 mm Petrischale, **8:** temperaturregulierbarer Kreuztisch mit Aufnahmemöglichkeit für eine 35 mm Petrischale, **9:** Anschluss für den Temperaturcontroller, **10:** Erdungsanschluss des Kreuztisches.

Unterdrücke zu ermöglichen, war die Patchpipette über einen Silikonschlauch mit einer 50 ml Kolbenspritze verbunden. Mit Hilfe eines elektromechanisch

betriebenen Mikromanipulators (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf) wurde per Joystick die Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Die über die in die flüssigkeitsgefüllte Patchpipette hineinragende Ableitelektrode aufgenommenen Ströme wurden über einen externen Vorverstärker in Spannungssignale umgewandelt. Der Hauptverstärker EPC-8 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) prozessierte die Signale und leitete sie über einen Analog-Digital-Wandler an einen PC weiter. Die Darstellung und Speicherung am Computer erfolgte mit Hilfe des Programms Pulse + Pulse Fit v 8.50 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht). Invertmikroskop, Messkammerhalterung und Mikromanipulator wurden von einem Faraday'schen Käfig umgeben und pneumatisch gedämpft gelagert, um elektromagnetische und mechanische Störeffekte so minimal wie möglich zu halten. Ein weiteres Gitter direkt am Kreuztisch, diente als zusätzlicher Schutz vor elektromagnetischen Störeinstrahlungen. Eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich bei Koschinski (2001).

2.4 Herstellung der Glas-Mikropipetten („Patchpipetten“)

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) in einem Horizontal-Puller (Flaming Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA) in einem mehrstufigen Prozess gezogen und anschließend mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert.

2.5 Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik

Während die Patchpipette mit Hilfe eines Mikromanipulators an die Zelle herangeführt wurde, wurde in der Badlösung (Extrazellulärlösung) für die Patchpipette ein elektrischer Widerstand von 5-10 M Ω gemessen. Über ein mit der Patchpipette verbundenes Schlauchsystem wurde noch vor Eintauchen in die Extrazellulärlösung ein leichter Überdruck angelegt, um das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Patchpipette sowie das Anhaften kleiner Partikel an deren Spitze zu verhindern. Nach optisch sichtbarer Eindellung der Zelle durch die an

die Zellmembran angenäherte Pipettenspitze wurde der Überdruck ausgeglichen. Die Membran lagerte sich daraufhin eng an die Pipettenöffnung an, wobei sich der messbare elektrische Widerstand auf über 10 G Ω erhöhte (so genannter „Gigaseal“, Hamill et al. 1981). Nachdem es zur Ausbildung dieses „Giga-Seals“ gekommen war, befand sich die Zelle in einer Cell-Attached-Konfiguration. Durch einen Unterdruck oder einen kurzen Spannungsimpuls war es möglich, die Membran unterhalb der Pipettenöffnung zu durchbrechen und so die Ganzzell-Ableitungskonfiguration (Whole-Cell-Konfiguration) zu erstellen, bei der die Patchpipettenelektrode leitend mit dem Zytoplasma verbunden war. Der Widerstand betrug nun bei den verwendeten Zellen im Mittel etwa 2 G Ω .

2.6 Ionenlösungen

Die für die Patch-Clamp-Experimente verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt. Die Extrazellulärlösungen wurden an der physiologischen Außenseite und die Intrazellulärlösungen an der physiologischen Innenseite der Zellmembran eingesetzt.

Tabelle 1: Extrazellulärlösungen (in mM)

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES	MES	pH
E ₁	140	3	2	2	15	10	-	7,35
E ₁ ²⁻	140	3	-	-	15	10	-	7,35
E ₁ sauer	140	3	2	2	15	-	10	6
E ₁ basisch	140	3	2	2	15	10	-	8

Die Extrazellulärlösungen wurden mit NaOH auf ihren jeweiligen pH-Wert eingestellt, wozu im Fall der auf pH 7,35 eingestellten Puffer etwa 4 mM benötigt wurden. Als Puffersysteme wurden HEPES und MES verwendet. E₁²⁻ ist eine Extrazellulärlösung (E₁) ohne Zugabe der divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺.

Tabelle 2: Intrazellulärlösungen (in mM)

	KGlu	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	HEPES
IBL _{100n}	140	20	2	29,7 µM	0,1	10
I _{1 10B}	140	15	2	-	10	10

Die Intrazellulärlösung wurde mit 0,3 mM KOH auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. Als pH-Puffer wurde HEPES und als Calciumpuffer BAPTA eingesetzt. KGlu= Kaliumglutamat, IBL_{100n}= Intrazellulärlösung, die 100 nM freies Ca²⁺ enthält und durch 0,1 mM BAPTA eine niedrige Ca²⁺-Pufferkapazität hat. I_{1 10B}=nominell calciumfreie Intrazellulärlösung mit 10 mM BAPTA gepuffert.

Die als physiologisch bezeichneten Lösungskombinationen sind durch eine hohe Na⁺-Konzentration in der Extrazellulärlösung und eine ebenso hohe K⁺-Konzentration in der Intrazellulärlösung gekennzeichnet. Die Osmolaritäten der Lösungen wurden mit einem Kryosmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) kontrolliert und betragen gewöhnlich 305-320 mosmol/kg, wobei die Intrazellulärlösungen etwas höher osmolar waren als die Extrazellulärlösungen. Die meisten Experimente wurden bei einer Temperatur von 21°C und einige Versuche bei 10°C bzw. 37°C durchgeführt.

2.7 Korrektur der Liquid-Junction-Potentiale

Kommen zwei Lösungen unterschiedlicher ionaler Zusammensetzung über eine relativ zum Flüssigkeitsvolumen kleine Grenzfläche, die aber unbehinderte Diffusion erlaubt, miteinander in Kontakt, so entwickelt sich ein elektrochemisches Potential: das sogenannte Liquid-Junction Potential. In erster Näherung hängt die Höhe des sich ausbildenden Potentials vom Konzentrationsunterschied und der Ionenbeweglichkeit der unterschiedlichen Ionen der Lösungen ab. Bei Patch-Clamp-Experimenten bildet sich ein solches Potential an der Spitze der Patchpipette aus. Bei den von uns benutzten Lösungskombinationen beträgt dieses Potential etwa 10 mV. In der Praxis wird dieses Potential, zusammen mit allen weiteren existierenden Potentialen, mit Hilfe der Offsetkorrektur auf 0 abgeglichen. Sobald allerdings die Pipettenöffnung beim Sealvorgang mit der selektiv permeablen Zellmembran dicht verschlossen wird, existiert dieses vorher

abgeglichenes Potential nicht mehr, da keine freie Diffusion mehr erfolgen kann. Deswegen ist es gängige Praxis, dieses dann überkorrigierte Potential schon während der Messung durch entsprechend abgeänderte Membranhaltspotentiale („a priori“-Korrektur) oder nach der Messung durch rechnerische Korrektur („a posteriori“-Korrektur) zu berücksichtigen (Sakman & Neher 1995). Ein Spezialfall tritt allerdings bei unselektiv permeablen Poren relativ großer Leitfähigkeit auf. Überwiegt die unselektive Membranleitfähigkeit gegenüber der spezifischen Leitfähigkeit, hat man eine ungehinderte Diffusion. So gleicht die Situation wieder der Anfangssituation ohne Zellmembran und das Liquid-Junction Potential entsteht wieder. Die Größe der Grenzfläche - Pore oder Pipettenspitze - ist hierbei nicht entscheidend. Solange die freie Diffusion aller Lösungsbestandteile nicht behindert wird, wird die Höhe des Liquid-Junction Potentials immer gleich sein. In diesem speziellen Fall darf also keine Korrektur mehr erfolgen. Alle Potentiale in dieser Arbeit wurden diesen Überlegungen folgend entsprechend a posteriori rechnerisch korrigiert bzw. belassen.

2.8. Lagerung und Aufbereitung des Toxins

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, hochgereinigte α -Hly wurde uns von Prof. Dr. S. Bhakdi und Dr. Ivan Walev (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt. Das Toxin wurde im -20°C Gefrierraum verwahrt und für die eigentlichen Experimente im 4°C Kühlschrank gelagert. Versuche haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen ($-20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$) keinen Einfluss auf die Toxinaktivität haben ($n=6$).

Die Ausgangslösung des α -Hlys hatte eine Konzentration von $150\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Um zu ermöglichen, dass die α -Hly-Moleküle als Monomere vorliegen, wurde das Toxin in einer $8\ \text{M}$ Guanidinlösung gelöst. Diese Stocklösung wurde wiederum mit Guanidin-Puffer in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt, so dass eine Konzentration des Toxins von $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ vorlag. Das Toxin wurde dann 1: 40 ($2\ \mu\text{l}$ Toxin in $80\ \mu\text{l}$ Extrazellulärlösung) verdünnt. Die Extrazellulärlösung enthielt $0,5\ \%$ FAF-BSA. Diese Verdünnung wurde dann in die $2000\ \mu\text{l}$ Badlösung appliziert. Somit lag in der Badlösung eine Endkonzentration von $50\ \text{ng}/\text{ml}$ α -Hly vor.

2.9 Substanzliste

2.9.1 BAPTA

1,2-bis (2-amino-phenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure wurde als Calciumpuffer für die Intrazellulärlösungen eingesetzt (Sigma-Aldrich, Steinheim). BAPTA ist ein calciumspezifischer Chelator mit einer geringen Affinität für Mg^{2+} . BAPTA hat ein Molgewicht von 476,4 g .

2.9.2 FAF-BSA

Fettsäurefreies Rinderalbumin (FAF-BSA/Fatty acid free bovine serum albumine) wurde von der Firma Sigma (Produktnummer A028) bezogen. Albumin diente zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für Peptide, z.B. an Gefäßwänden. Dadurch wird verhindert, dass sich z. B. die in sehr geringer Konzentration eingesetzten Toxine unspezifisch an Gefäßwänden anlagern und dies zum Substanzverlust führt. FAF-BSA wurde mittels E_1 -Puffer auf 0,5 % verdünnt. Das fettsäurefreie Albumin hat keine Eigenwirkung auf die Zellen, wohingegen Untersuchungen gezeigt haben, dass übliches BSA (Bovines Serum Albumin) durch enthaltene Fettsäuren eine Wirkung auf Membranströme in Zellen haben kann (Repp et al. 1998).

2.9.3 Fetales Kälberserum

Das verwendete fetale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich) bezogen und sofort nach Erhalt bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Vor der Verwendung wurde es bei $56^{\circ}C$ komplementinaktiviert. Die Gesamtproteinkonzentration betrug 60 mg/ml.

2.9.4 HEPES

4-(2-Hydroxy-Ethyl)-1-Piperazine-ethan-Sulfonsäure) wurde als Puffer zur Einstellung des pH-Wertes bei Extra- und Intrazellulärlösungen eingesetzt (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe). Der Bereich, in dem HEPES sinnvoll als Puffer eingesetzt werden kann, reicht von pH 6,8 bis pH 8,2. HEPES hat ein Molgewicht von 238,3 g .

2.9.5 MES

Morpholino-Ethan-Sulfonsäure (MES) wurde als Puffer zur Einstellung des pH-Wertes bei Extrazellulärlösungen eingesetzt (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg). Der Bereich, in dem MES sinnvoll als Puffer eingesetzt werden kann, reicht von pH 5,5 bis pH 6,7. MES hat ein Molgewicht von 195,2 g.

2.10. Statistische Auswertung und Darstellung

Die statistische Auswertung der Amplitudenhistogramme der Porenströme wurde von Prof. Dr. D. Brockmeier (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen) durchgeführt. Die statistische Auswertung und Darstellung aller anderen Ergebnisse erfolgte computergestützt mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und Prism 3.0. (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean). Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (95 % Konfidenzintervall) ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen

Zur Untersuchung der Porenbildung durch α -Hämolyisin (α -Hly) an der Zellmembran wurden HEK293-Zellen (Human Embrionic Kidney Cells) benutzt. Diese Zelllinie wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Porenbildung durch Listeriolysin O eingesetzt (Repp et al. 2002). HEK293-Zellen zeigen in der Whole-Cell-Konfiguration im Current-Clamp-Modus ein Ruhemembranpotential von $-31 \text{ mV} \pm 2$ ($n=5$, SEM). Eine typische, im Voltage-Clamp-Modus gemessene Strom-Spannungskurve ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Kurve zeigt die Mittelwerte der

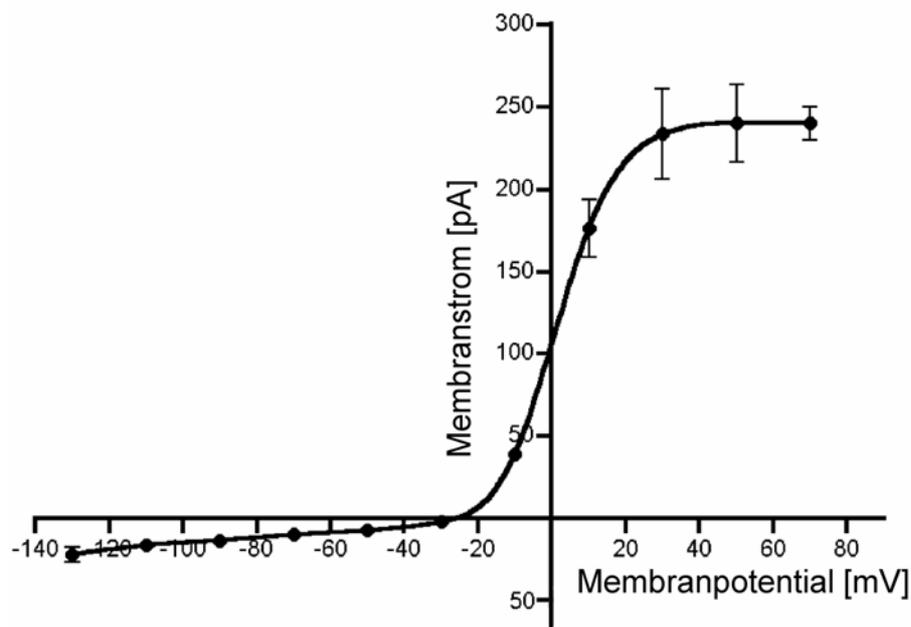


Abbildung 3: Typische Strom-Spannungskurve von HEK293-Zellen. In 20 mV Schritten wurde für jeweils 400 ms eine Spannung von -130 bis +70 mV angelegt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde für jeweils 100 ms auf ein Membranpotential von -50 mV geschaltet. Die Membranstromamplituden wurden im Zeitraum 280-380 ms gemessen und gemittelt. Die Messwerte sind die Mittelwerte \pm SEM aus Messungen an fünf verschiedenen Zellen. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung IBL_{100n} verwendet.

Membranströme von fünf HEK293-Zellen bei verschiedenen Membranpotentialen im Bereich von -130 mV bis +70 mV. Im Bereich von -130 mV bis -50 mV sieht

man einen spannungsunabhängigen, unspezifischen Membranstrom. Ab einem Membranpotential positiver als -30 mV kommt es zur Aktivierung eines verzögert aktivierenden, spannungsabhängigen Kaliumauswärtsstroms (delayed outward rectifier), der, wie frühere Messungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben (Repp et al. 1998), calciumunabhängig ist. In der Literatur wird für HEK293-Zellen zusätzlich ein transients Calciumstrom beschrieben, der bei Membranpotentialen positiver als -40 mV durch Depolarisation aktiviert wird (Berjukow et al. 1996). Unter unseren Messbedingungen konnte dieser Calciumstrom jedoch nicht registriert werden.

Die HEK293-Zellen eignen sich für die Experimente mit porenbildenden Toxinen besonders gut, da bei diesen Zellen bei Membranpotentialen negativer als -30 mV keine endogene Ionenkanalaktivität beobachtet und die Porenbildung somit ungestört von endogenen Ionenkanälen registriert werden kann. Deswegen wurden alle Messungen (soweit nicht anders angegeben) bei einem Membranpotential von -40 mV durchgeführt.

3.2 Charakterisierung der durch α -Hämolysin induzierten Poren

3.2.1 Porenbildung durch α -Hämolysin

Bei den in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten wurde üblicherweise eine physiologische Lösungskombination mit IBL_{100n} intrazellulär und E₁ extrazellulär verwendet. Die Badlösung wurde mittels der temperaturregulierbaren Badkammerhalterung auf 21°C gehalten. Die Abbildung 4 zeigt eine typische Originalregistrierung des Membranstroms einer HEK293-Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration vor und nach der Applikation von 50 ng/ml α -Hly. Vor Toxinapplikation zeigt die Zelle einen konstanten, unspezifischen Membranstrom von etwa -40 pA. Nach Applikation von α -Hly nimmt

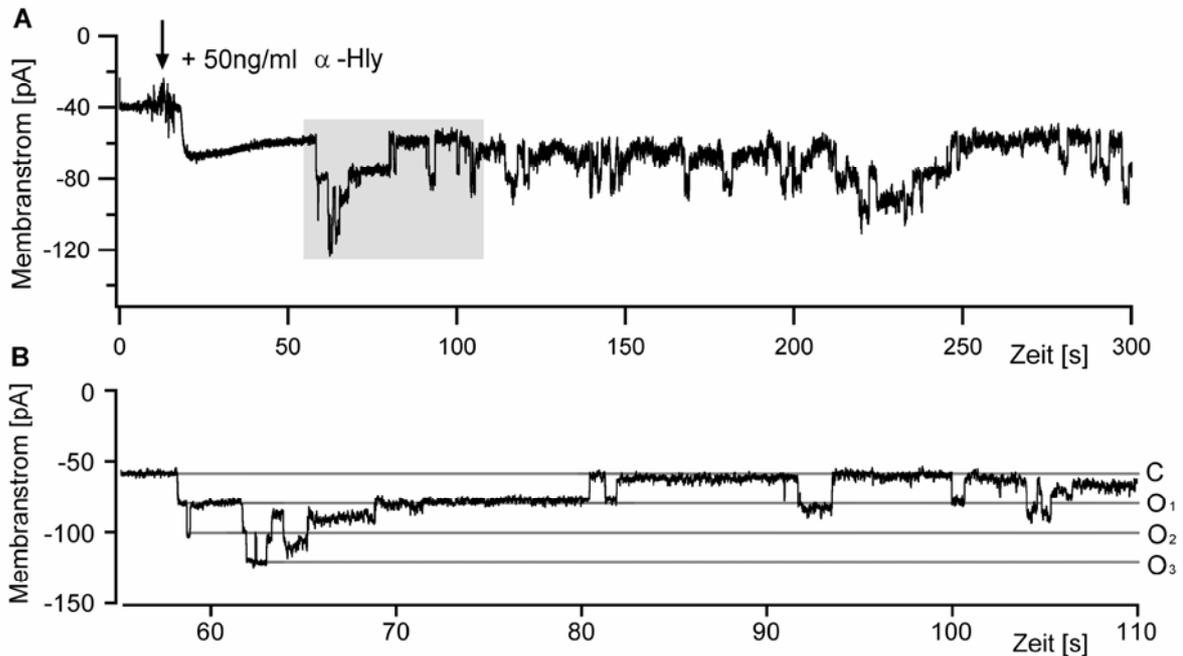


Abbildung 4: Porenbildende Wirkung von α -Hly in der Membran einer HEK293-Zelle, gemessen in der Whole-Cell-Konfiguration. (A) Membranstromregistrierung vor und nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly (Pfeil). Das Membranpotential beträgt -40mV. Nach einer Latenzzeit von etwa 40 s kann die erste Porenöffnung, die sich als negative Membranstromzunahme darstellt, registriert werden. (B) Grau hinterlegter Ausschnitt aus (A) in einer höheren Zeitauflösung. Deutlich ist die sprunghafte Zu- und Abnahme des Porenstroms zu sehen. Hierbei steht C für einen Membranstrom ohne offene Poren, O₁-O₃ für Membranstromamplituden mit ein, zwei oder drei gleichzeitig geöffneten α -Hly-Poren. Extrazellulärlösung E₁, Intrazellulärlösung IBL_{100n}.

der Membranstrom auf etwa -60 pA zu. Diese Zunahme wird allerdings nicht durch das Toxin hervorgerufen, sondern durch das zur Stabilisierung des Toxins in der Toxinlösung enthaltene Guanidin. In Kontrollversuchen konnte dieser Effekt durch eine entsprechende Guanidinlösung allein hervorgerufen werden, ohne dass es anschließend zur Porenbildung kam (5 Experimente). Nach einer etwa 40 s dauernden Latenzzeit, die als die Zeit zwischen Applikation des Toxins und Auftreten der ersten Pore definiert ist, steigt der Membranstrom von -60 pA abrupt auf -80 pA an. Diese Stromzunahme wird durch die Öffnung einer α -Hly-Pore hervorgerufen. Kurz danach öffnet sich eine zweite α -Hly-Pore, die sich aber bereits nach 800 ms wieder schließt. Weitere Porenöffnungen und -schlüsse folgen. Diese erfolgen sprunghaft innerhalb weniger als 10 ms, was in der Abbildung 4B sehr viel besser in einer höheren Zeitauflösung zu sehen ist. Die verschiedenen Amplituden der Porenströme sind durch Linien gekennzeichnet. C steht für einen

Membranstrom ohne geöffnete Pore. Die Linien O₁-O₃ geben die Membranstromamplituden an, bei denen ein, zwei oder drei Poren gleichzeitig geöffnet sind. Die durch α -Hly induzierten Porenströme haben dabei Amplituden mit Werten zwischen 20 und 60 pA in Abhängigkeit von der Anzahl der offenen Poren. In 17 wie in Abbildung 4 gezeigten Experimenten wurde die Latenzzeit zwischen Toxinapplikation und Auftreten der ersten Pore bestimmt. Dabei ergab sich eine mittlere Latenzzeit von $16,2 \pm 3,0$ s (n=17). Diese Messungen zeigten weiterhin, dass sich bei einer α -Hly-Konzentration von 50 ng/ml durchschnittlich $13,8 \pm 1,8$ Poren pro Minute (n=17) gebildet haben. Die über einen längeren Zeitraum von 600 s erfolgten Membranstromregistrierungen ergaben auch, dass sich die Anzahl der Porenöffnungen und der Porenschließungen in einem Gleichgewicht befanden, so dass der Gesamtmembranstrom der Zellen einen Wert von -300 pA nicht überschritt.

Aus Experimenten, wie in Abbildung 4 beispielhaft gezeigt, wurden die Offenzeiten der α -Hly-Poren bestimmt. Dabei wurden nur Porenoffenzeiten mit einer Dauer

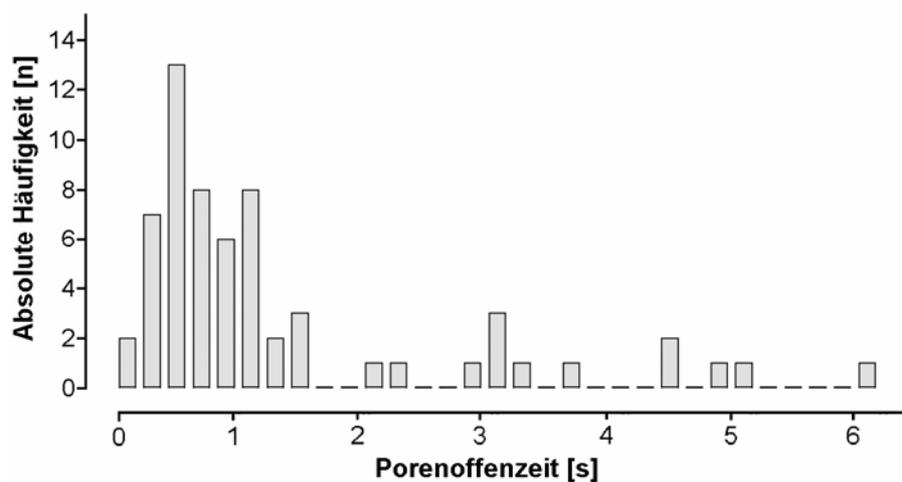


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Porenoffenzeiten der α -Hly-Poren nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly auf HEK293-Zellen. Ausgewertet wurden insgesamt 74 Poren aus 10 Messungen. Die ermittelten Offenzeiten wurden in Gruppen mit einer Klassenbreite von 0,2 s eingeteilt. Alle Daten wurden bei einem Membranpotential von -40 mV (unter physiologischer Lösungskombination E₁/IBL_{100n}) ermittelt.

kürzer als 30 s ausgewertet, da sich zeigte, dass bei längeren Porenoffenzeiten häufig eine Zuordnung der Porenöffnung zum korrespondierenden Porenschluss nicht eindeutig möglich war. Abbildung 5 zeigt die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Offenzeiten, wobei der Übersichtlichkeit wegen nur Porenoffenzeiten von weniger als 6,5 s dargestellt sind. Von den 74 ausgewerteten Porenoffenzeiten zeigten 49 Ereignisse (66 %) Offenzeiten von 0,1 s bis zu 1,6 s. Die mittlere Offenzeit dieser Poren betrug $0,7 \pm 0,3$ s ($n=49$). Die Offenzeiten der restlichen 25 Poren (34 %) verteilten sich gleichmäßig über den gesamten weiteren Zeitbereich bis zu 30 s.

3.2.2 Elementare Porenströme der α -Hämolyisin-Poren

Neben den Porenoffenzeiten ist ein weiteres Grundcharakteristikum von Poren ihre Stromamplitude bzw. ihre Leitfähigkeit. Zur Messung dieser Porenstromamplituden wurde jeweils die Differenz des Membranstroms vor und nach einer Porenöffnung bestimmt. Die Verteilungsmerkmale der gemessenen Porenstromamplituden ($n=218$) wurden über die kumulative Häufigkeitsverteilung bestimmt (Abb. 6A). Dazu wurde die kumulative Häufigkeitsverteilung durch eine Summe von mehreren kumulativen Normalverteilungen beschrieben, deren jeweiliger Mittelwert als ein ganzzahliges Vielfaches einer Grundstromamplitude ermittelt wurde. Die Anpassung dieser kumulativen Normalverteilungen an die beobachteten Werte erfolgte nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate (Gauss 1809). Aus den angepassten kumulativen Normalverteilungen lassen sich Dichtefunktionen ableiten, die zusammen mit dem Ergebnis der Anpassung in Abbildung 6A dargestellt sind. Abbildung 6B zeigt das dazugehörige Amplitudenhistogramm der Porenstromamplituden. Die kumulative Häufigkeitsverteilung wurde mit Hilfe von 6 kumulativen Normalverteilungen angepasst.

Es ergaben sich mehrere Maxima, wobei das erste Maximum der Porenstromamplituden bei $6,1 \pm 2,4$ pA mit einer kumulativen Häufigkeit von 3,2 % ermittelt werden konnte. Diese Porenstromamplitude wurde als elementare Stromamplitude

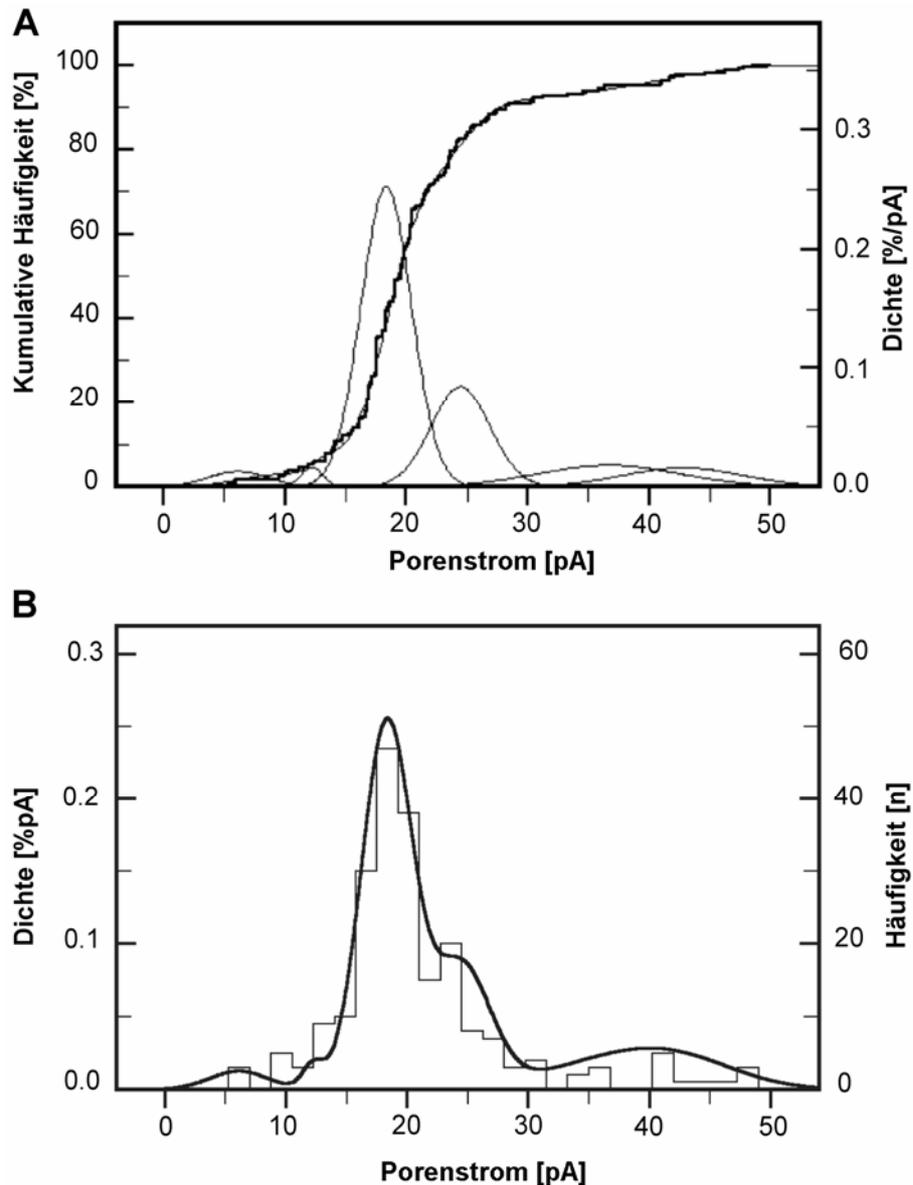


Abbildung 6: Amplitudenverteilung der α -Hly-Porenströme nach Applikation von 50 ng/ml Toxin. Es wurden 218 Porenstromamplituden ausgewertet. **(A)** Kumulative Häufigkeit der Porenstromamplituden (fette Linie) mit Anpassung und Dichtefunktionen (dünne Linie). Abszisse: Porenstromamplituden in pA; linke Ordinate: Kumulative Häufigkeit [%], rechte Ordinate: Dichte [%/pA] der Porenstromamplituden. Aus der Anpassung der kumulativen Häufigkeitsfunktion an die Daten wurden Dichtefunktionen abgeleitet. **(B)** Summe der Dichtefunktionen (durchgezogene Kurve) und klassische Amplitudenhistogrammdarstellung der Porenstromamplituden. Abszisse: Porenstromamplituden in pA; linke Ordinate: Dichte [%/pA] der Porenströme, rechte Ordinate: Häufigkeit [n].

einer „Grundpore“ angesehen. Die Maxima (in Klammern die Häufigkeiten) zeigten sich bei $12,2 \pm 0,9$ pA (4 %), $18,3 \pm 2,0$ pA (63,2 %), $24,4 \pm 2,4$ pA (21,2 %), $36,7 \pm 5,7$ pA (4,5 %) und $42,8 \pm 4,8$ pA (3,9 %). Die häufigste gemessene Porenstromamplitude lag also bei 18,3 pA. Bei einem Membranpotential von -40

mV ergaben sich somit Leitfähigkeiten von etwa 150 pS, 300 pS, 450 pS, 600 pS, 900 pS und 1050 pS. Die Maxima zeigen also Werte, die ganzzahlige Vielfache des Maximums einer „Grundpore“ darstellen.

Das Vorkommen dieser unterschiedlichen Porenstromamplituden lässt sich beispielhaft anhand einer Originalregistrierung zeigen (Abb. 7).

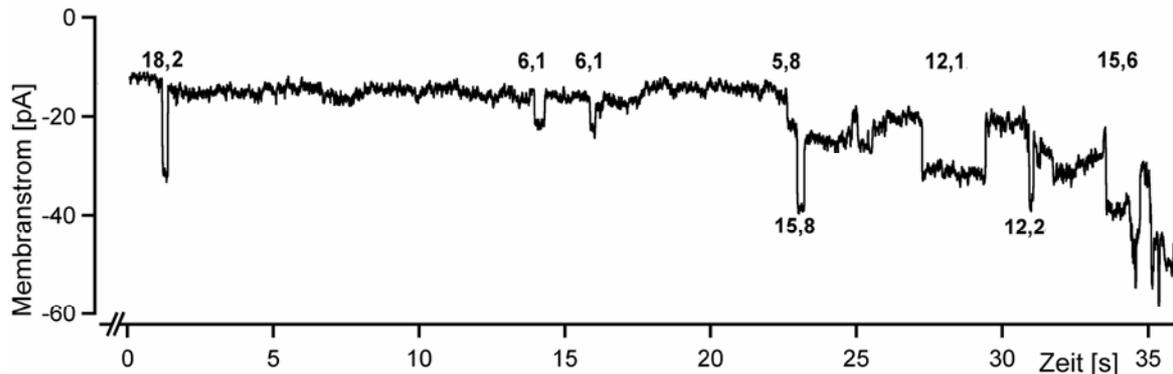


Abbildung 7: Porenströme einer typischen, sich in der Whole-Cell-Konfiguration befindlichen HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly bei einem angelegten Membranpotential von -40 mV. Man sieht Porenstromamplituden von etwa 6 bis 18 pA. Es wurde die physiologische Lösungskombination E_1/IBL_{100n} verwendet.

Zur weiteren Charakterisierung der Porenströme wurden die Stromamplituden bei Porenöffnung mit den Stromamplituden der korrespondierenden Porenschlüsse verglichen ($n=80$). In 66 % ($n=53$) der Fälle wiesen die Porenstromamplituden bei Öffnung der Pore und dem dazugehörigen Porenschluss identische Werte auf, d.h. die Pore verschloss sich in diesen Fällen wieder vollständig. Bei 34 % ($n=27$) der untersuchten Poren unterschieden sich die Porenstromamplituden beim Öffnen von dem dazugehörigen Schluss. Beim Verschließen der Pore wurde eine kleinere Stromamplitude als bei der korrespondierenden Porenstromöffnung registriert. Die Pore verschloss sich offenbar nicht wieder vollständig. Diese Amplitudendifferenz wurde jeweils für jede unvollständig geschlossene Pore prozentual ermittelt. Im Mittel war die Porenstromamplitude dieser Porenschlüsse um 16 % kleiner als die Stromamplitude der dazugehörigen Porenöffnung.

3.2.3 Ionenselektivität der α -Hämolysin Poren

Um zu untersuchen, ob die α -Hly-Poren möglicherweise eine Selektivität für bestimmte Ionen aufweisen, wurde das Umkehrpotential der Porenströme bestimmt. Dazu wurden vor und nach der Porenbildung Strom-Spannungsbeziehungen (I/U-Kurven) aufgenommen. Hierzu wurde in 20 mV-Schritten das Membranpotential für jeweils 50 ms von -120 bis -40 mV verändert und die entsprechenden Membranströme registriert. Auf diese Weise wurden Messungen an 7 verschiedenen Zellen ausgewertet. Durch Subtraktion des vor der Porenbildung gemessenen Membranstroms vom registrierten Membranstrom nach der Porenbildung erhält man den Porenstrom. Um Störungen durch den bei HEK293-Zellen spannungsabhängig aktivierenden Kaliumstroms zu vermeiden, wurden zur Ermittlung des Umkehrpotentials des Porenstroms nur Messwerte bei Membranpotentialen von -120 bis -40 mV herangezogen. In Abbildung 8 ist zu erkennen,

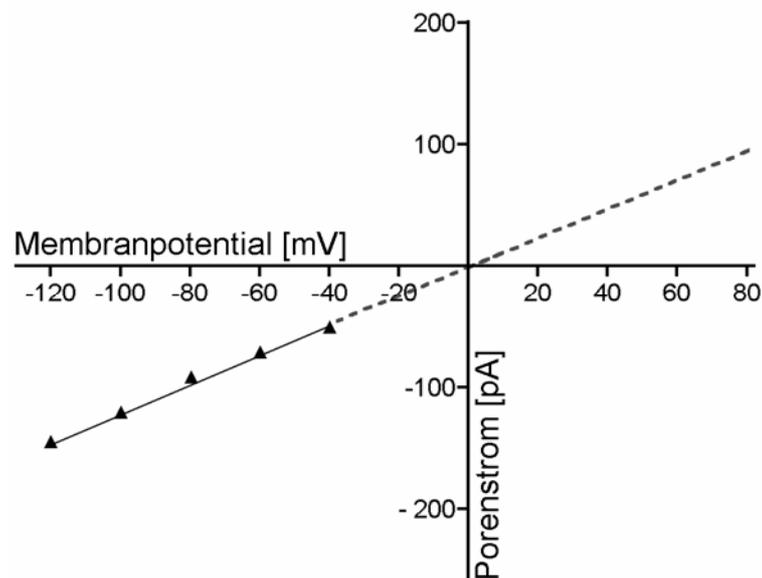


Abbildung 8: Abhängigkeit des α -Hly-induzierten Porenstroms (50 ng/ml) vom Membranpotential. In 20 mV Schritten wurde das Membranpotential für jeweils 50 ms von -120 bis -40 mV verändert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde für jeweils 100 ms auf ein Membranpotential von -50 mV geschaltet. Die Membranstromamplituden wurden im Zeitraum von 35 bis 47,5 ms gemessen und gemittelt. Die Porenströme wurden aus der Differenz von Strom-Spannungsbeziehungen vor und nach Porenbildung aus 7 Messungen ermittelt. Die gestrichelte Linie ist eine lineare Extrapolation der per Regressionsanalyse ermittelten Ausgleichsgeraden (durchgezogene Linie). Der Porenstrom zeigt eine lineare Strom-Spannungsbeziehung mit einem Umkehrpotential von $-3,7 \pm 0,8$ mV.

dass der Strom, der durch die α -Hly-Poren fließt, ein lineares Strom-Spannungs-Verhalten aufweist. Das Umkehrpotential dieses Porenstroms wurde mittels Regressionsanalyse und Extrapolation ermittelt. Es betrug $-3,7 \pm 0,8$ mV ($n=7$). Dieser Wert unterscheidet sich nicht wesentlich von 0. Bei der für diese Messungen verwendeten physiologischen Lösungskombination bedeutet dies, dass die α -Hly-Poren zumindest für monovalente Kationen eine unselektive Permeabilität aufweisen. Die Analyse der Einzelporenströme in Abhängigkeit vom Membranpotential konnte dieses Ergebnis bestätigen. Hierzu wurden die Zellmembranströme bei Membranpotentialen von -20 mV, -40 mV und -60 mV registriert (Abb. 9). Die gemessenen Stromamplituden wurden zunächst als

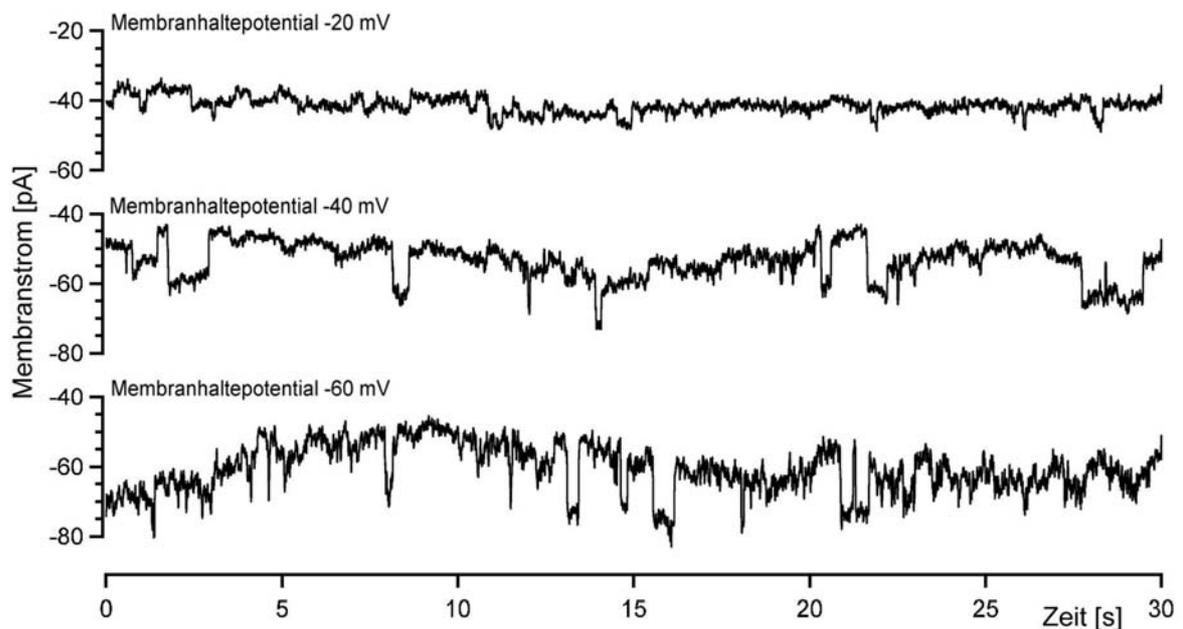


Abbildung 9: Originalregistrierungen der Porenströme einer sich im Whole-Cell-Konfiguration befindlichen HEK293-Zelle bei Membranpotentialen von -20 mV, -40 mV und -60 mV nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly. Als Extrazellulärlösung wurde E_1 , als Intrazellulärlösung IBL_{100n} eingesetzt.

Punktwolken gegen das angelegte Membranpotential dargestellt. Dabei zeigten sich Häufigkeitsmaxima, die gut mit der schon zuvor durchgeführten Porenstromanalyse (Abschnitt 3.2.2) korrelierten. Wiederum fanden sich bei einem Membranpotential von -40 mV Maxima bei ca. 6,0 pA, 13,6 pA und 17,3 pA. Wie in

Abbildung 10 zu sehen ist, zeigen die linearen Extrapolationen der Ausgleichsgeraden durch die jeweils korrespondierenden Mittelwerte der Porenstromamplituden jeweils ein Umkehrpotential bei nahe 0. Das mittlere Umkehrpotential

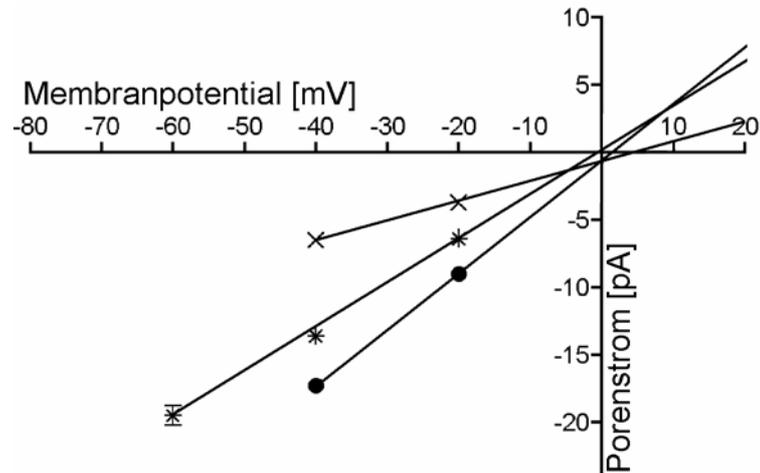


Abbildung 10: Strom-Spannungsbeziehungen von α -Hly-Poren verschiedener Stromamplituden. Bei einem Membranpotential von -40 mV sieht man mittlere Porenstromamplituden von $6,0$ pA (x), $13,6$ pA (*), $17,3$ pA (•). Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3-7 Einzelmessungen, wobei die Fehlerbalken aufgrund der geringen Streuung nur teilweise sichtbar sind.

betrug $1,7 \pm 1,5$ mV ($n=3$), was wiederum für eine unselektive Permeabilität der α -Hly-Poren zumindest bezüglich der monovalenten Kationen spricht. Die aus den Steigungen der Geraden ermittelten Leitfähigkeiten betragen bei einem Membranpotential von -40 mV etwa 150 pS, 340 pS und 433 pS.

Aufgrund der Störungen durch die in HEK293-Zellen spannungsabhängig aktivierenden Kaliumauswärtsströme ließen sich Porenströme bei positiven Membranpotentialen nur sehr schwer analysieren. Deswegen wurde das Messprotokoll abgewandelt. Da die spannungsabhängig aktivierenden Kaliumkanäle bei längerer Depolarisation inaktivieren, wurden die Zellen auf ein Membranpotential von $+40$ mV depolarisiert und zunächst abgewartet, bis der Kaliumauswärtsstrom inaktivierte. Erst danach wurde α -Hly in einer Konzentration von 50 ng/ml hinzugegeben. Auf diese Weise konnte auf den Einsatz von Kaliumkanal-blockierenden Substanzen, wie z.B. TEA, verzichtet werden, welche die Poreneigenschaften eventuell verändert hätten. In Abbildung 11 ist ein entsprechendes Experiment

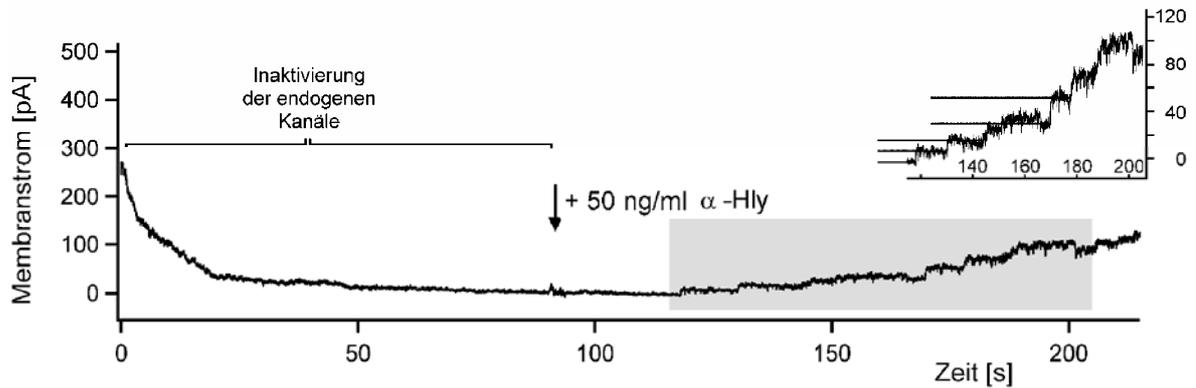


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf des Membranstroms einer sich in der Whole-Cell-Konfiguration befindlichen HEK293-Zelle bei einem Membranpotential von +40 mV. Nach der Inaktivierung des endogenen Kaliumstroms erfolgt die Applikation von 50 ng/ml α -Hly. Der Ausschnitt rechts zeigt in höherer Membranstromauflösung und verkürzter Zeitauflösung den grau hinterlegten Kurvenbereich. Deutlich ist die stufenartige Zunahme des Membranstroms durch die sich öffnenden Poren zu sehen. Extrazellulärlösung E_1 , Intrazellulärlösung IBL_{100n} .

dargestellt. Deutlich sieht man zunächst den im Verlauf von ca. 90 s inaktivierenden Kaliumauswärtsstrom. Nach Zugabe von α -Hly (50 ng/ml) kann nach einer Latenzzeit von etwa 30 s eine stufenartige Zunahme eines Auswärtsstroms registriert werden, wie es für einen Strom durch α -Hly-Poren aufgrund der elektromotorischen Kraft (EMK) zu erwarten ist. Die im Inset der Abbildung 11 zu sehende stufenweise Zunahme des Membranstroms durch α -Hly-induzierte Poren, wird durch starke Fluktuationen des Membranstroms sehr gestört, so dass auf eine genaue Amplitudenanalyse bei positiven Membranpotentialen verzichtet wurde.

Diese Experimente (n=6) zeigen aber, dass auch bei einem positiven Membranpotential α -Hly in die Zellmembran inserieren kann und es zur funktionellen Porenbildung kommt.

3.2.4 Permeabilität der α -Hly-Poren für Calcium

Nachdem eine unselektive Permeabilität der α -Hly-Poren zumindest für monovalente Kationen nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob α -Hly-Poren auch für divalente Kationen, wie z.B. Calciumionen, permeabel sind. Eine solche Calciumpermeabilität wäre insbesondere deswegen wichtig, weil Ca^{2+} als intrazellulärer Messenger in verschiedenste Signalwege eingreift (Berridge et al. 1998). Um nun zeigen zu können, dass Ca^{2+} tatsächlich durch α -Hly-Poren in die Zelle gelangt, wurden HEK293-Zellen verwendet, denen das Gen für einen calciumabhängigen und spannungsunabhängigen Kaliumkanal (hsK4 = human small conductance „Kalium“ channel Nr. 4) stabil transfiziert worden war. Dieser Kaliumkanal, der durch die Peptidtoxine Charybdotoxin und Margatoxin blockierbar ist, wurde bereits detailliert charakterisiert (Decker et al. 1999). HEKhsK4-Zellen hatten sich in unserem Labor schon zur Aufklärung der Calciumpermeabilität von z.B. Listeriolysin O-Poren gut bewährt (Repp et al. 2002). Abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration wird in diesen HEKhsK4-Zellen ein calciumabhängiger, spannungsunabhängiger Kaliumstrom aktiviert. Dieser Kaliumstrom kann sehr gut als messbares Signal für das durch α -Hly-Poren in die Zelle einfließende Ca^{2+} benutzt werden.

Abbildung 12 zeigt eine Originalregistrierung eines entsprechenden Experiments. Bei einem Membranpotential von -40 mV fließt zunächst nur ein sehr geringer Membranstrom von -10 pA. Nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly und einer Latenzzeit von etwa 20 s bildet sich die erste Pore, die als eine sprunghafte, negative Zunahme des Membranstroms zu erkennen ist. Der weitere Membranstromverlauf lässt sich sehr viel besser in einer höheren Zeit- und Stromamplitudenauflösung zeigen (Abb. 12B). Bereits unmittelbar nach der Öffnung der ersten Pore (1) kommt es zur Aktivierung eines calciumabhängigen Kaliumauswärtsstroms (1/O), was sich in einer positiven Zunahme des Membranstroms zeigt. Hier wird deutlich, dass eine enge Kopplung zwischen Porenöffnung und Kaliumkanalaktivierung besteht. Nach dem Porenschluss (1/S) kommt es sofort zu einer Inaktivierung des Kaliumauswärtsstroms. Dies weist darauf hin, dass durch die Schließung der Pore der Einstrom extrazellulären Ca^{2+} in die Zellen beendet

wird. Bei den nächsten Porenöffnungen (2 und 3), die mit einer sehr langen Offenzeit (2 s) einhergehen, kommt es zu keiner Kaliumstromaktivierung. Eine

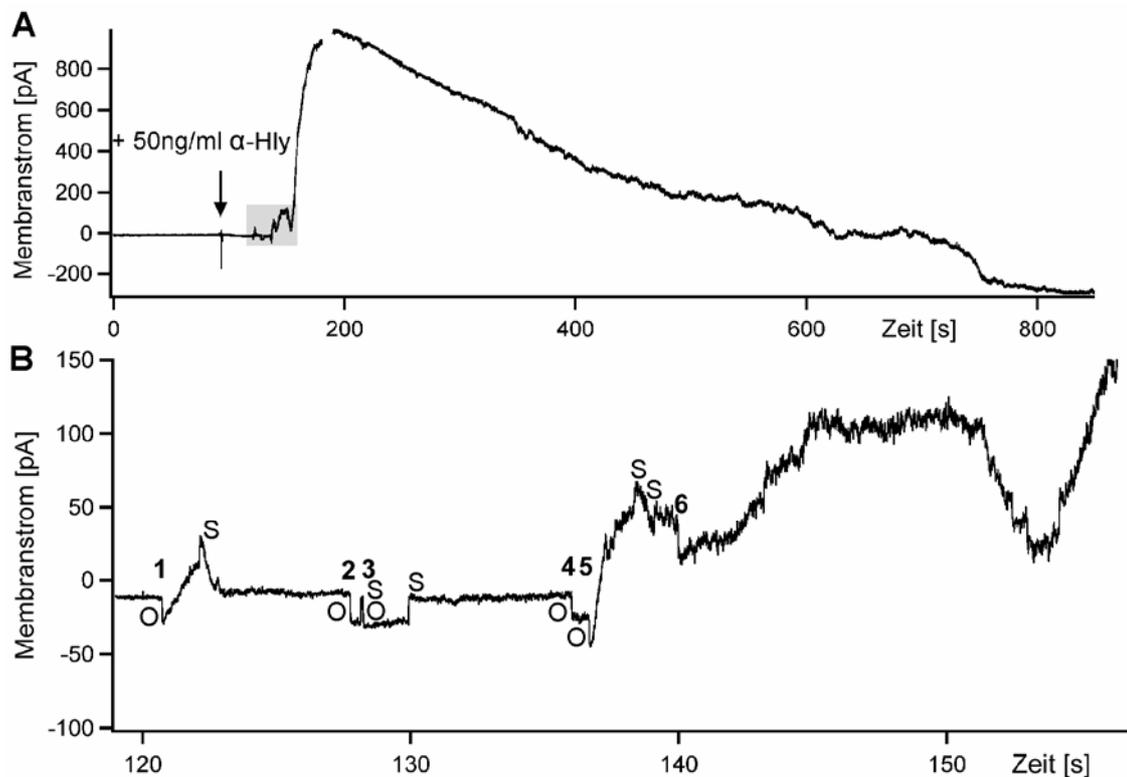


Abbildung 12: (A) Zeitverlauf des Membranstroms einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly und Beginn der Porenbildung mit konsekutiver Aktivierung des calciumabhängigen Kaliumstroms. (B) Vergrößerung des grau hinterlegten Bereichs in einer höheren Zeit- und Amplitudenauflösung. Die Zahlen (1-6) zeigen jeweils die Poren, die Buchstaben (O/S) die Öffnung und Schließung der Poren. Das Membranpotential betrug -40 mV.

Erklärung dafür wäre, dass in der unmittelbaren Umgebung der α -Hly-Pore, durch die Ca^{2+} nach intrazellulär fließt, keine calciumabhängigen Kaliumkanäle in der Zellmembran inseriert sind. Während es bei Pore (4) nach der Porenöffnung ebenfalls zu keiner Aktivierung eines Kaliumstroms kommt, wird bei der Öffnung der Pore (5) sofort eine Aktivierung induziert. Der Verschluss der Pore (4) oder (5) führt dazu, dass der Kaliumauswärtsstrom wieder abnimmt. Die Abnahme des Kaliumstroms wird durch die Öffnung einer neuen α -Hly-Pore (6) unterbrochen und es kommt wieder zu einem Anstieg des Kaliumauswärtsstroms. Danach kommt es zu weiteren Öffnungen und Schließungen von α -Hly-Poren, die jedoch insgesamt zu einer Aktivierung eines calciumabhängigen Kaliumauswärtsstroms

mit hoher Amplitude führt (Abb. 12A). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Inaktivierung des Kaliumstroms und die induzierten α -Hly-Poren verursachen einen negativen Membranstrom. Insgesamt zeigten sich an 5 von 5 untersuchten Zellen entsprechende Effekte, woraus sich schließen lässt, dass die α -Hly-Pore eine Permeabilität nicht nur für die monovalenten Kationen Natrium und Kalium sondern auch für das divalente Kation Calcium aufweist.

3.3 Modulation der Porenbildung durch physiologische Faktoren

3.3.1 Einfluss divalenter Kationen

Nachdem die Grundcharakterisierung der α -Hly-Poren mit der Bestimmung der Offenzeit, Leitfähigkeit und Ionenpermeabilität bzw. Selektivität erfolgt war, sollte nun der Einfluss divalenter Ionen auf die Bildung von α -Hly-Poren untersucht werden. Dies wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert. So wurde z.B. durch Hämolyseversuche an Schafserythrozyten gezeigt, dass divalente Ionen zur Porenbildung bzw. Zellyse erforderlich sind (Ostolaza et al. 1995; Döbereiner et al. 1996), während für die Porenbildung an künstlichen Membranen (Lipid Bilayers) offensichtlich kein Ca^{2+} benötigt wird (Menestrina et al. 1987) bzw. Mg^{2+} hemmend auf die Porenbildung wirkt (Döbereiner et al. 1996).

Um diesen Widerspruch zu klären, wurden Experimente durchgeführt, bei denen zweiwertige Ionen in der Extrazellulärlösung fehlten. Ein Problem bei den Patch-Clamp-Messungen ist, dass es überaus schwer ist, einen „Giga-Seal“ ohne Anwesenheit zweiwertiger Ionen in der Extrazellulärlösung zu erreichen und diesen Membranpatch aufrechtzuerhalten. Nachdem sich zeigte, dass sich bei Anwesenheit von Mg^{2+} als einzigem zweiwertigen Kation keine α -Hly-Poren bilden, wurde dem für diese Experimente benutzten Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Extrazellulärlösung

(E_1^{2-}) wieder 2 mM Mg^{2+} zugesetzt. In Abbildung 13 sind drei repräsentative Membranstromregistrierungen zu sehen. Es kam nach α -Hly- Applikation zunächst

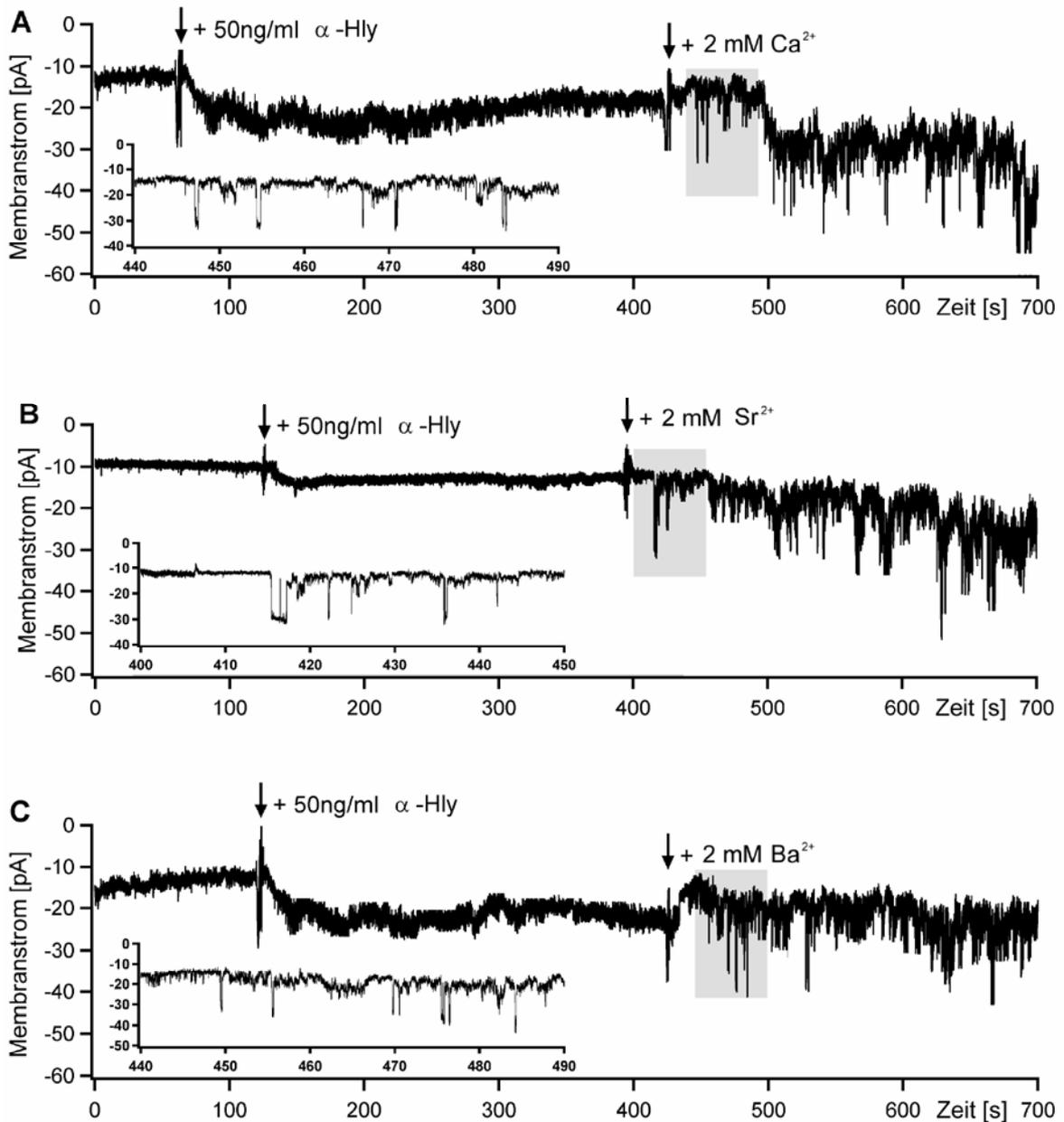


Abbildung 13: Einfluss divalenter Kationen auf die Porenbildung durch α -Hly. Extrazellulär lag eine E_1 -Lösung vor, die zunächst kein Ca^{2+} und Mg^{2+} (E_1^{2-} -Lösung) enthielt, der aber vor den Experimenten Mg^{2+} in einer Konzentration von 2 mM zugesetzt wurde. Nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly (Pfeil) kommt es zu keiner Porenbildung. Erst nach Applikation von 2 mM Ca^{2+} (A), Sr^{2+} (B) oder Ba^{2+} (C) erfolgt eine deutliche Porenbildung durch α -Hly. Als Insetts sind die grau hinterlegten Bereiche der Originalregistrierungen nochmals in höherer Zeitauflösung dargestellt. Das Membranpotential betrug -40 mV.

zu keiner Porenbildung. Wurde jedoch zu einem späteren Zeitpunkt 2 mM Ca^{2+} (Abb. 13A), 2 mM Sr^{2+} (Abb. 13B) oder 2 mM Ba^{2+} (Abb. 13C) zugesetzt, kam es innerhalb von wenigen Sekunden zu einer Porenbildung durch α -Hly. Dies wird in den Insets der Abbildung 13 besonders deutlich. Intrazelluläres Ca^{2+} scheint dabei für die Porenbildung keine Rolle zu spielen, denn auch bei Verwendung der nominell calciumfreien Intrazellulärlösung $I_{1\ 10B}$ bildeten sich mit Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} jeweils α -Hly-Poren (jeweils $n=4$). Eine Analyse der Poren ergab, dass es zu keiner Veränderung der Poreneigenschaften kam. Sowohl die Porenstromamplituden, die Porenoffenzeiten und die durchschnittliche Porenbildungsgeschwindigkeit unterschieden sich nicht signifikant.

3.3.2 Temperaturabhängigkeit

Die bisherigen Experimente in dieser Arbeit wurden bei 21°C durchgeführt. Pathophysiologisch ist jedoch auch der Bereich um 37°C interessant, da α -Hly unter in vivo Bedingungen, z.B. bei Infekten durch *E.coli*, bei dieser Temperatur auf die menschlichen Zellen einwirkt. Aus diesem Grund sollte die Temperaturabhängigkeit der α -Hly-Wirkung untersucht werden.

Als Parameter wurde dabei die Porenbildung/min. genutzt. Für die Experimente wurden HEK293-Zellen mittels der temperaturregulierbaren Badkammerhalterung auf Temperaturen von 10°C, 21°C bzw. 37°C gebracht und dann die porenbildende Wirkung von α -Hly gemessen. Die Abbildung 14 zeigt repräsentative Membranstromregistrierungen bei den drei verschiedenen Temperaturen. Die Zunahme der Porenbildungsgeschwindigkeit mit dem

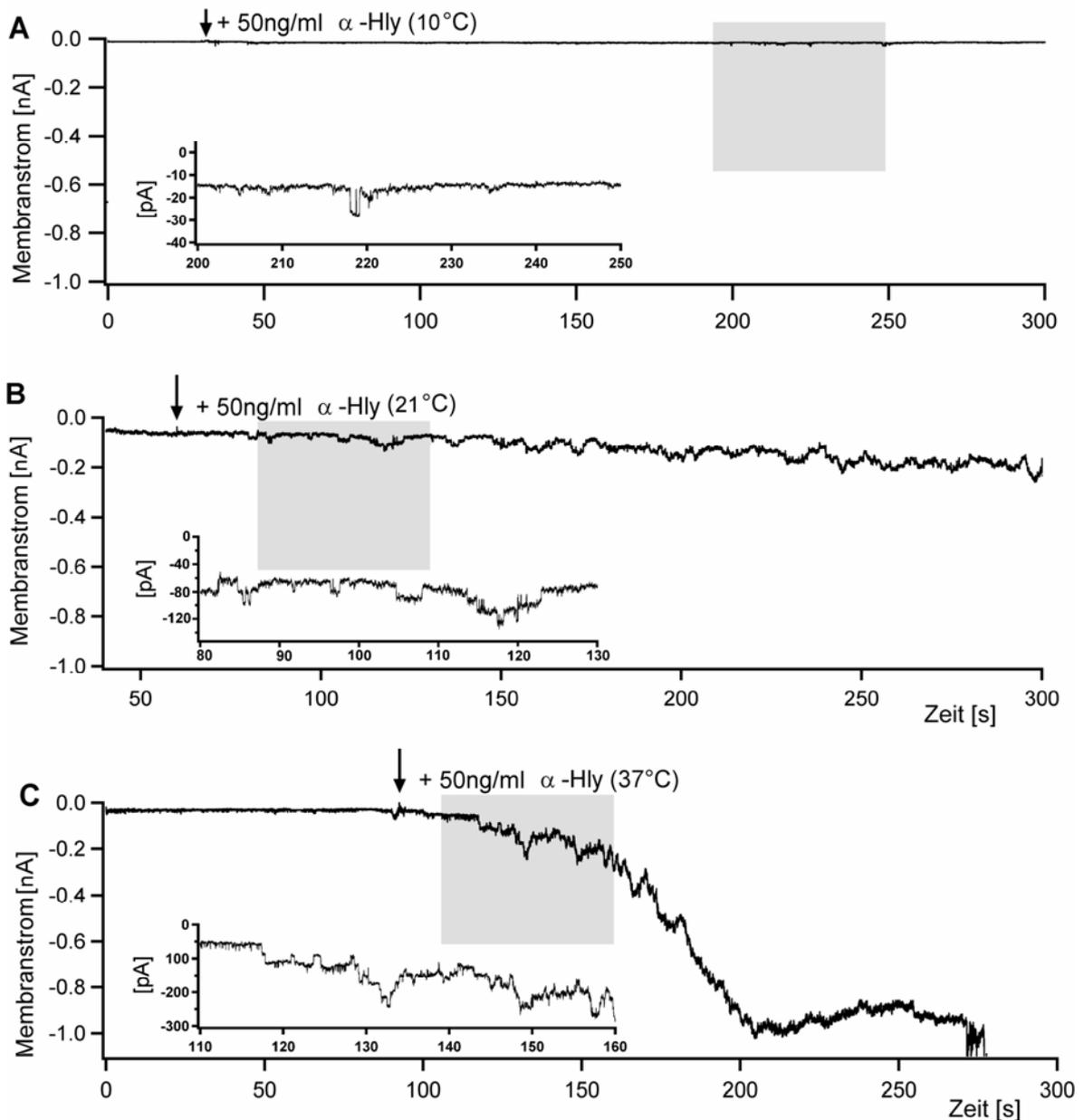


Abbildung 14: Repräsentative Originalregistrierungen der Membranströme verschiedener HEK293-Zellen nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly bei 10°C (A), 21°C (B) und 37°C (C). Abszisse: Zeit in Sekunden. Ordinate: Membranstrom in nA. Die Insets zeigen jeweils die grau hinterlegten Abschnitte der Originalregistrierungen in höherer Zeit- und Amplitudenauflösung. Das Membranpotential betrug -40 mV.

Anstieg der Temperatur ist deutlich zu sehen. In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse dieser Messreihe dargestellt. Die Porenbildungsgeschwindigkeit steigt mit steigender Temperatur hochsignifikant an. Während bei 10°C nur etwa 1,4 Poren/min gebildet werden, liegt die Porenbildungsgeschwindigkeit bei 21°C

bereits bei 14 Poren/min und verdoppelt sich auf 28 Poren/min, wenn die Temperatur auf 37°C erhöht wird. Im Bereich von 10°C bis 37°C zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Porenbildungsgeschwindigkeit von der Temperatur.

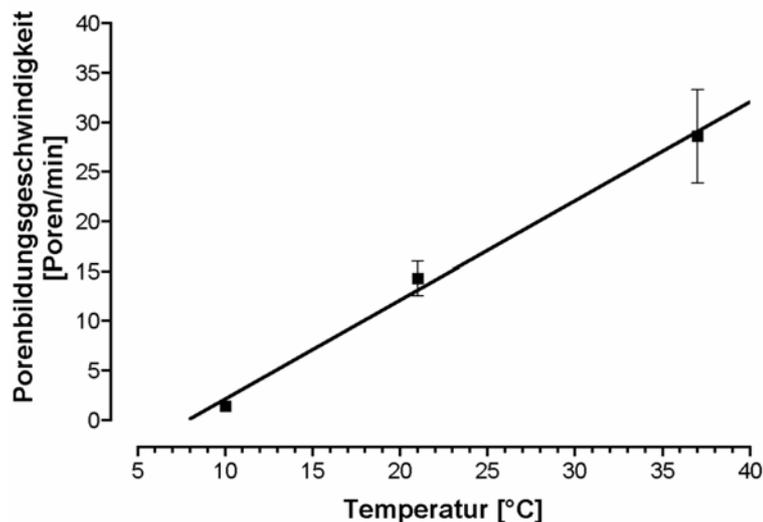


Abbildung 15: Temperaturabhängigkeit der porenbildenden Wirkung von α -Hly in einer Konzentration von 50 ng/ml. Ordinate: Porenbildungsgeschwindigkeit/min, Abszisse: Temperatur Anzahl der untersuchten Zellen: n=5 (10°C), n=11 (21°C), n=5 (37°C). Das Membranpotential betrug -40 mV.

3.3.3 Einfluss des pH-Wertes

Ein weiterer, pathophysiologisch relevanter Parameter für die Wirkung von porenbildenden Toxinen ist der pH-Wert. So konnte schon gezeigt werden, dass die Aktivität von Listeriolysin (Bittenbring 2006) oder Streptolysin O (Jacobus 2006) im sauren Milieu, wie es z.B. im Rahmen von Entzündungen auftritt, deutlich verstärkt wird. Da für die pH-Abhängigkeit des α -Hly bislang nur Daten unter artifiziellen Bedingungen an Lipid Bilayers vorlagen (Ropele & Menestrina 1989), sollte hier nun verifiziert werden, ob eine Erniedrigung oder Erhöhung des pH-Wertes die porenbildende Wirkung von α -Hly an Zellmembranen beeinflusst. Es wurden Messungen bei pH-Werten von 6,0, 7,35 und 8,0 durchgeführt, da noch niedrigere bzw. höhere pH-Werte zu Schädigungen der HEK293-Zellen führten. Zunächst wurden die Zellen in Extrazellulärlösung, die auf pH 6,0, 7,5 bzw. 8,0 eingestellt worden war, für 10 min. an die entsprechende pH-Bedingung adaptiert. Erst

danach wurde mit den Patch-Clamp-Versuchen begonnen und α -Hly in einer Konzentration von 50 ng/ml appliziert. Repräsentative Originalregistrierungen dieser Messreihe sind in Abbildung 16 zu sehen. Deutlich ist zu erkennen, dass die

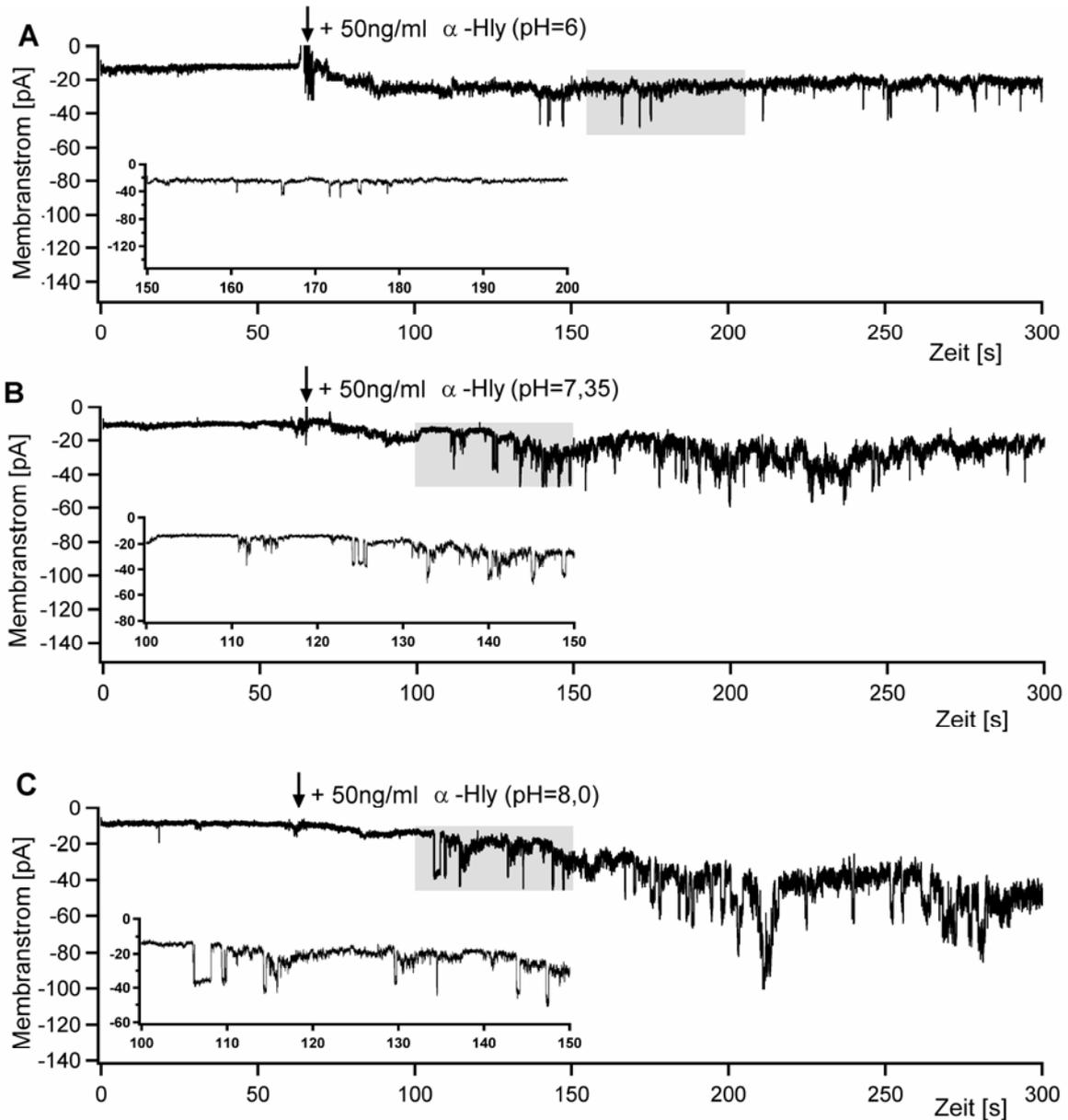


Abbildung 16: Membranströme von HEK293-Zellen nach Applikation von 50 ng/ml α -Hly bei verschiedenen pH-Werten des Extrazellulärmediums: pH: 6,0 (A), pH: 7,35 (B), pH: 8,0 (C). Die Insets zeigen jeweils die Vergrößerung der jeweils grau hinterlegten Abschnitte der Originalregistrierungen in einer höheren Zeitauflösung. Das Membranhaltepotential betrug jeweils -40 mV.

porenbildende Wirkung des α -Hly mit zunehmender Basizität der Extrazellulärlösung steigt. Die Auswertung der Membranregistrierungen zeigt für den pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 einen signifikanten Anstieg der Porenbildungsgeschwindigkeit mit steigendem pH-Wert (Abb. 17A).

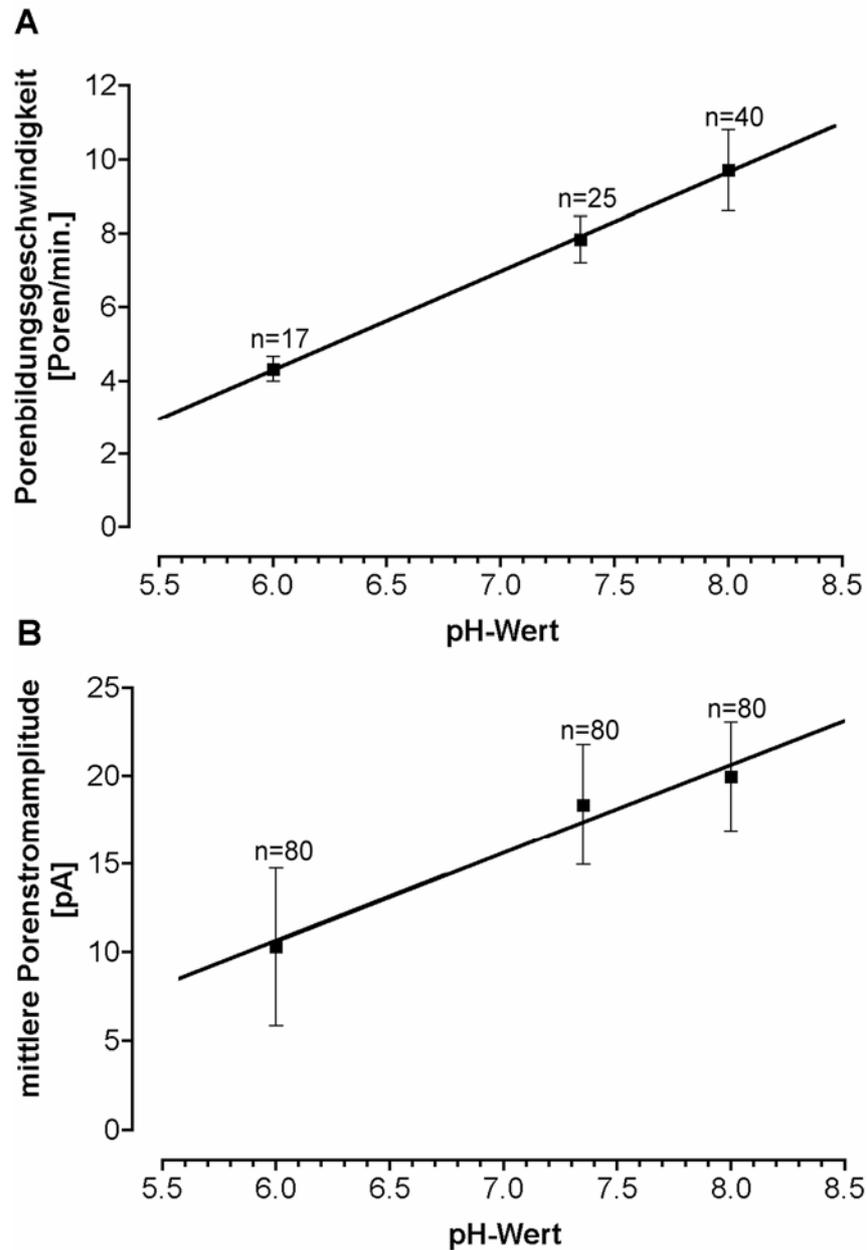


Abbildung 17: pH-Abhängigkeit der porenbildenden Wirkung von α -Hly. Die Porenbildungsgeschwindigkeit pro Minute (**A**) und der mittlere Porenstrom (**B**) wurden in Abhängigkeit des pH-Werts der Extrazellulärlösung untersucht. Das Membranpotential betrug -40 mV, die α -Hly-Konzentration betrug 50 ng/ml.

Bei einer Absenkung des pH-Wertes von 7,35 auf den pH-Wert 6,0 wird die Porenbildungsgeschwindigkeit auf die Hälfte verringert. Auffallend war, dass sich auch die mittlere Porenstromamplitude signifikant mit dem pH-Wert veränderte (Abb.17B). Während sich die mittlere Porenstromamplitude bei einer Änderung des pH-Werts von 7,35 auf 8,0 nur geringfügig von $18,3 \pm 3,4$ pA (n=80) auf $19,9 \pm 3,1$ pA (n=80) erhöhte, kam es bei einer Absenkung des pH-Werts auf 6,0 zu einer signifikanten Abnahme der mittleren Porenstromamplitude auf einen Wert von $10,3 \pm 4,4$ pA (n=80).

4 Diskussion

α -Hämolysin (α -Hly) von *Escherichia coli* ist ein Mitglied der RTX (Repeats in Toxin)-Familie und wird von uropathogenen *E.coli* Stämmen produziert (Welch et al. 1981). Seine porenbildenden Eigenschaften wurden elektrophysiologisch bisher fast ausschließlich an künstlichen Lipidmembranen (Benz et al. 1989), sowie an Makrophagen charakterisiert (Menestrina et al. 1996). Bei den Experimenten an Makrophagen wurden allerdings lediglich die Leitfähigkeit und die Ionenselektivität der α -Hly-Poren bestimmt (Menestrina et al. 1996). In der hier vorliegenden Arbeit sollten neben der Charakterisierung der Poreneigenschaften noch weitere physiologisch relevante Parameter, wie Temperatur, pH-Wert, sowie die Bedeutung zweiwertiger Kationen auf die porenbildende Wirkung von α -Hly untersucht werden. Im Gegensatz zu den von Menestrina et al. (1996) eingesetzten sehr hohen und zur Zelllyse führenden Toxinkonzentrationen, sollte in dieser Arbeit die Porenbildung durch α -Hly unter möglichst physiologischen Bedingungen an Zellmembranen untersucht werden. Dazu wurden von uns humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet. Diese HEK293-Zellen sind einerseits ein aus pathophysiologischer Sicht sinnvolles Zellsystem für die Charakterisierung des Effekts eines Toxins uropathogener Bakterien und andererseits aufgrund ihrer geringen endogenen Ionenkanalaktivität sehr gut für die Untersuchung porenbildender Toxine mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik geeignet. Diese Zellen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur Charakterisierung der porenbildenden Eigenschaften von Listeriolysin O (Repp 2002), Pneumolysin (Schramm 2004) und Streptolysin O (Jacobus 2006) eingesetzt.

Wurden die HEK293-Zellen einer Konzentration von 50 ng/ml α -Hly ausgesetzt, bildeten sich innerhalb weniger Sekunden die ersten Poren. Die Latenzzeit, d.h. die Zeitspanne von der Applikation bis zur ersten Porenbildung, betrug im Mittel 16 s. Im weiteren Verlauf der Toxinwirkung bildeten sich etwa 14 Poren/min. Die Analyse der Porenstromamplituden der durch α -Hly gebildeten Poren zeigte eine mehrgipflige Verteilung mit Maxima bei etwa 6, 12, 18, 24, 36 und 42 pA bei einem

Membranpotential von -40 mV. Diese Verteilung legt die Hypothese nahe, dass es sich bei der „6 pA-Pore“ um die „Grundpore“ handelt und die anderen Maxima ganzzahlige Vielfache dieser elementaren Porenstromamplitude darstellen. Die für die „ α -Hly-Grundpore“ ermittelte Leitfähigkeit betrug 150 pS. Neben dieser α -Hly-Grundpore trat eine „18 pA Pore“ mit einer Leitfähigkeit von 450 pS am häufigsten auf (63 %). Diese Leitfähigkeiten korrelieren gut mit Ergebnissen aus bereits vorliegenden Leitfähigkeitsanalysen. So fanden Benz et al. (1989) für α -Hly-Poren an Lipid Bilayers eine Leitfähigkeit von 500 pS. Dagegen zeigt der Vergleich mit anderen in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Toxinen, dass die Leitfähigkeiten der jeweiligen Grundporen deutlich differieren können. So wurde für die Grundpore von Streptolysin O eine Leitfähigkeit von 425 pS (Jacobus 2006), für Listeriolysin O 500 pS gemessen (Repp et al. 2002), während für Pneumolysin die Leitfähigkeit der kleinsten Pore 680 pS betrug (Schramm 2004). Die α -Hly-Grundpore zeigt von allen bislang von unserer Arbeitsgruppe untersuchten Toxinen mit ca. 150 pS die geringste Leitfähigkeit. Wie α -Hly zeigen aber auch Listeriolysin O und Pneumolysin eine Mehrgipfligkeit in der Verteilung ihrer Porenstromamplitude (Repp et al. 2003; Schramm 2004). Diese Mehrgipfligkeit konnte bei Streptolysin O bei niedrigen Toxinkonzentrationen nicht beobachtet werden (Jacobus 2006). Erst bei höheren Toxinkonzentrationen konnte auch bei Streptolysin O weitere ganzzahlige Vielfache einer Grundpore registriert werden. Bei diesen ganzzahligen Vielfachen der Grundporen könnte es sich möglicherweise um das synchrone Öffnen und Schließen von kooperativ gekoppelten Porenkomplexen, sog. „Cluster“ handeln, die aus 2, 3, 4, 6 und 7 α -Hly-Grundporen bestehen. Ein solches Verhalten ist z.B. für Chloridkanäle schon beschrieben worden (Larsen et al. 1996). Hier konnte gezeigt werden, dass solche synchronen Öffnungen und Schließungen tatsächlich durch in Gruppen zusammengelagerte Chloridkanäle hervorgerufen werden. Die häufigste Form (63 %) unserer registrierten Porenstromamplituden entspräche dann einem Cluster bestehend aus 3 Grundporen mit einer Porenstromamplitude von 18 pA und einer Gesamtleitfähigkeit von 450 pS.

Im Unterschied zu der von uns an lebenden Zellen beobachteten Verteilung der Porenstromamplituden von einer kleinsten Grundpore bis zur beobachteten „Maximalpore“, lässt sich eine solche Verteilung an künstlichen Lipidmembranen

nicht feststellen. So zeigten in den Arbeiten von Benz et al. (1989) und Menestrina et al. (1996) alle Porenströme jeweils die gleiche Amplitude mit einer mittleren Porenstromamplitude von 10 pA bei einem Membranpotential von +20 mV, was mit der erwähnten Leitfähigkeit von 500 pS ebenfalls einem Cluster aus 3 synchron arbeitenden Grundporen entspräche. Bis auf die dort erwähnten „flickering mini-channels“, die als „pre-open states“ gedeutet wurden, fanden sich keine Hinweise auf kleinere oder größere Porenstromamplituden, die auf Clustern mit mehr oder weniger Grundporen hindeuten würden. Dieser Unterschied lässt sich allerdings durchaus mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der benutzten Membranen erklären. So ist es leicht vorstellbar, dass in homogenen, künstlichen Lipid Bilayers hauptsächlich eine möglicherweise energetisch begünstigte Clusterkomposition von 3 Grundporen vorkommt, während in Zellmembranen möglicherweise durch Interaktion mit integralen Membranmolekülen oder durch die räumlich unterschiedliche Membranzusammensetzung auch andere Cluster vorkommen können.

Auffällig ist, dass die Bildung der funktionellen α -Hly-Pore im Vergleich zu anderen in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Toxinen besonders schnell vor sich geht. Während z.B. für Streptolysin O (Jacobus 2006) oder Listeriolysin O (Butler 2005) bei vergleichbaren sublytischen Toxinkonzentrationen die Latenzzeiten im Bereich mehrerer Minuten liegen, beträgt die mittlere Latenzzeit für die α -Hly-Porenbildung nur 16 s. Da die Diffusionsstrecken aufgrund der gleich gewählten Bedingungen identisch waren, muss dieser Unterschied bei der Insertion in die Membran bzw. der Assoziation der Einzelmoleküle zum funktionellen Porenkomplex oder Cluster zu suchen sein. Ein Hinweis darauf, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt tatsächlich in der Zusammenlagerung zur funktionellen Pore zu suchen ist, könnte der im Vergleich zu den anderen Toxinen relativ niedrige Hill-Koeffizient von 1,8 für α -Hly sein (Uenver 2007). Dieser lässt darauf schließen, dass sich bei der Bildung der α -Hly-Pore mindestens 2 Moleküle zusammenlagern müssen. Für Listeriolysin O bzw. Streptolysin O lässt sich aus dem jeweiligen Hill-Koeffizient ableiten, dass hier mindestens 3 (Listeriolysin O) bzw. 4 (Streptolysin O) Moleküle an der Porenbildung beteiligt sind. Unklar ist allerdings, inwieweit sich der Hill-Koeffizient sich auf die Anzahl der Moleküle, die sich zu einer funktionellen

Pore zusammenlagern müssen oder auf die Anzahl der Grundporen, die einen funktionellen Cluster bilden, bezieht. Die Annahme einer oligomeren, funktionellen α -Hly-Pore wird aber unter anderem auch durch die Tatsache gestützt, dass andere bakterielle Toxine tatsächlich aus mehreren Monomeren zusammengesetzt sind (Song et al. 1996; Tilly et al. 2005).

Neben der kurzen Latenzzeit unterschied sich auch Schließungsverhalten der α -Hly-Poren deutlich von allen anderen in unserer Arbeitsgruppe bereits untersuchten Toxinen. Während bei Listeriolysin O, Pneumolysin und Streptolysin O schnelle und langsame Abnahmen des Porenstroms registriert wurden, kam es bei α -Hly-induzierten Poren ausschließlich zu einer schnellen Abnahme des Porenstroms, vergleichbar mit dem Schließungsverhalten endogener Ionenkanäle. Diese schnelle Abnahme betrug weniger als 10 ms. Denkbar ist, dass das schnelle, abrupte Schließungsverhalten durch eine schnelle Konformationsänderung der α -Hly-Pore bedingt ist oder dass die Dissoziation von einem oder mehreren α -Hly-Molekülen einer oligomeren α -Hly-Pore zu dieser sprunghaften Porenstromabnahme führt. Endocytoseprozesse hingegen erscheinen aufgrund der schlagartigen Abnahme des Porenstroms für das "Schließen" der α -Hly-Poren weniger wahrscheinlich zu sein

Zur weiteren Charakterisierung der α -Hly-Pore wurde die durchschnittliche Porenoffenzeit untersucht. Diese Analyse zeigte eine deutliche Häufung der Offenzeiten im Bereich unter 2 s, was auch gut mit Untersuchungen an Lipid Bilayers übereinstimmt. Benz et al. (1989) zeigten, dass die α -Hly-Pore eine mittlere Lebensdauer von etwa 2 s aufweist. In unseren Experimenten blieben etwa 2/3 aller Poren maximal 1,6 s geöffnet, wobei die mittlere Porenoffenzeit dieser Poren 0,7 s betrug. Das restliche Drittel der Poren zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Offenzeiten im Bereich von mehr als 1,6 s bis 30 s. Solche langen Porenöffnungen konnten auch schon für Listeriolysin O (Repp et al. 2002), Pneumolysin (Schramm 2004) und Streptolysin O (Jacobus 2006) beobachtet werden.

Bei der Analyse der Porenströme zeigte sich, dass nur etwa 2/3 der Poren wieder vollständig geschlossen werden, während bei etwa 1/3 der Porenschlüsse ca.

16 % der Stromamplitude übrig blieben. Diese unvollständigen Porenschlüsse könnten einen Hinweis auf das Vorhandensein von „Sublevels“ der Poren, die hier im offenen Zustand verbleiben, darstellen. Für die Annahme solcher teilgeöffneter oder teilgeschlossener Porenzustände sprechen neben unseren Daten auch Hinweise aus der Literatur. So konnten Benz et al. (1989) an Lipid Bilayers bzw. Menestrina et al. (1996) an Makrophagen neben der Bildung der eigentlichen Poren zusätzlich kleine Stromfluktuationen, die als Sublevels oder „Minichannels“ angesehen wurden, beobachten. Diese Stromfluktuationen durch teilgeöffnete Poren betrugen etwa 10-15 % der Gesamtstromamplitude, was ebenfalls etwa in der Größenordnung der von uns gefundenen Sublevels liegt.

Leider war es durch die bei positiven Membranpotentialen zunehmende Aktivität der endogenen Kanäle der verwendeten Zellen nicht möglich, zusätzlich den Einfluss des Membranpotentials auf die Leitfähigkeit der α -Hly-Poren, also ihre Spannungsabhängigkeit zu überprüfen. Allerdings lässt sich aufgrund der durchgeführten Experimente immerhin der Schluss ziehen, dass zumindest die Insertion der Toxinmoleküle in die Membran grundsätzlich nicht vom Membranpotential der Zellen abhängig ist, da α -Hly auch bei dauerhafter Depolarisation auf ein Membranpotential von + 40 mV funktionelle Poren in der Zellmembran bildet.

In Bezug auf die Ionenselektivität der α -Hly-Poren konnten die schon früher an Lipid Bilayers gewonnenen Daten auch für die in Zellmembranen gebildeten Poren bestätigt werden. Aufgrund des Umkehrpotentials des Gesamtmembranporenstroms sowie der Umkehrpotentiale der Einzelporenströme, die bei den verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen jeweils nahe 0 lagen, lässt sich bestätigen, dass die α -Hly-Poren auch in Zellmembranen eine unselektive Permeabilität zumindest für Natrium- und Kaliumionen zeigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Poren auch eine Permeabilität für das divalente Kation Ca^{2+} aufweisen. So zeigte sich eine enge zeitliche Korrelation zwischen Porenöffnung und der Aktivierung calciumabhängiger, spannungsunabhängiger Kaliumkanäle. Der hierzu notwendige Calciuminflux kann dabei aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen nicht durch spannungsabhängig aktivierende Calciumkanäle stattgefunden haben, sondern muss direkt durch die geöffneten α -Hly-

Poren erfolgt sein. Dieses Ergebnis konnte durch neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch mit Hilfe der Calcium-Imaging-Technik bestätigt werden (Koschinski et al. 2006).

In dieser Arbeit konnten weitere physiologische Faktoren identifiziert werden, die für die Porenbildung essentiell sind bzw. sie modulieren können. Ein Faktor, der in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ist der Einfluss divalenter Ionen auf die Porenbildung. Die vorliegenden Experimente zeigten, dass es bei alleiniger Anwesenheit von Mg^{2+} in der Extrazellulärlösung nicht zu einer Porenbildung durch α -Hly kommt. Essentiell für die Porenbildung ist die Anwesenheit von Ca^{2+} in der Extrazellulärlösung. Dieses Ca^{2+} kann auch durch die divalenten Erdalkalitionen wie Ba^{2+} und Sr^{2+} substituiert werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Publikationen an Lipid Bilayers (Menestrina et al. 1987), aber in Übereinstimmung mit neueren Ergebnissen an Schafserythrozyten und künstlichen Membranen (Ostolaza et al. 1995; Döbereiner et al. 1996).

Die Porenbildung wird ebenfalls von der Temperatur beeinflusst. So konnte hier erstmals elektrophysiologisch gezeigt werden, dass die Porenbildung durch α -Hly ein stark temperaturabhängiger Prozess ist. Gegenüber den Messungen bei 21°C (Standard-Messbedingung) bildeten sich bei 37°C doppelt so viele Poren pro Zeiteinheit. Dieser signifikanten Aktivitätssteigerung liegt höchstwahrscheinlich die Adaption des Toxins an die physiologische Umgebung des Bakteriums zugrunde. Die Optimierung des Toxins an den Lebensraum der Bakterien erklärt auch die Aktivitätsänderung des Toxins mit dem pH-Wert. Ropele et al. (1989) zeigten an Lipid Bilayers, dass α -Hly bei basischem pH-Wert eine höhere Leitfähigkeit aufweist als bei saurem pH-Wert. In den vorliegenden Experimenten kam es auch an Zellmembranen bei Absenkung des physiologischen pH-Wertes von 7,35 auf 6,0 zu einer signifikanten Aktivitätsminderung des α -Hlys, während eine Alkalisierung des Milieus von 7,35 auf 8,0 zu einer Steigerung der porenbildenden Wirkung führte. Die Änderung der mittleren Porenstromamplitude könnte dadurch zustande kommen, dass sich pH-abhängig mehr oder weniger Grundporen zu Clustern zusammenlagern und sich dadurch die mittlere Porenstromamplitude von 18 pA unter physiologischen Bedingungen auf im Mittel 10 pA bei pH 6,0 bzw. ca. 20 pA

bei pH 8,0 verschiebt. Wir konnten weiterhin zeigen, dass neben der Porenstromamplitude auch die Porenbildungsgeschwindigkeit signifikant durch eine Alkalisierung des Milieus erhöht wird. Diese Steigerung der biologischen Aktivität bei basischem pH-Wert ist ein deutlicher Unterschied zu anderen, in unserer Arbeitsgruppe untersuchten porenbildenden Toxinen wie z.B. Listeriolysin O (Bittenbring 2006) und Streptolysin O (Jacobus 2006). Diese Toxine zeigen ein umgekehrtes Verhalten mit Aktivitätssteigerung (Listeriolysin O) bzw. Verkürzung der Latenzzeit (Streptolysin O) bei Absenkung des pH-Werts von 7,35 auf 5,9. Dieses gegensätzliche Verhalten ließe sich ebenfalls aus der evolutionären Optimierung der Toxine der entsprechenden Bakterien an ihren Lebensbereich erklären. So ist es sinnvoll, dass z.B. Listerien, die mit Hilfe ihres Toxins die lysosomale Membran durchbrechen müssen, ein für das saure Milieu der Lysosomen optimiertes Toxin sezernieren. Umgekehrt ist die erhöhte porenbildende Wirkung des α -HlyS im alkalischen Milieu für die den alkalischen Bereich des Darms besiedelnden *E.coli*-Bakterien von Vorteil. Ähnliche Anpassungen von Bakterien an ihre Umwelt konnten z.B. für *EHEC* (*enterohämorrhagisches Escherichia coli*) an Lipid Bilayers gezeigt werden (Schmidt et al. 1996). Hier zeigte sich ebenfalls eine im alkalischen zunehmende Aktivität der Bakterien.

Im Unterschied zu Experimenten an Lipid Bilayers (Benz et al. 1989) konnten wir zeigen, dass es offenbar eine Grundpore von 6 pA, mit einer Leitfähigkeit von 150 pS gibt. Daneben gibt es ganzzahlig Vielfache dieser Grundpore, wobei eine Leitfähigkeit von 450 pS, entsprechend möglicherweise einem Cluster aus 3 Grundporen, am häufigsten auftritt. Insbesondere das Ergebnis, dass die porenbildende Wirkung des Toxins durch Absenkung des pH-Werts und der Körpertemperatur reduziert werden kann, stellt eine wichtige Erkenntnis dar, die möglicherweise sogar klinische Relevanz im Rahmen der Sepsistherapie erlangen könnte. Zusätzlich konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch die α -Hly-Poren extrazelluläre Calciumionen in die Zellen gelangen können. Dieser Einstrom durch die α -Hly-Pore führt zu wiederholten Calciumkonzentrationsschwankungen im Zytosol, sog. „Calciumspikes“, die in der Literatur auch häufig als Calciumoszillationen bezeichnet werden und für eine Vielzahl zellulärer Reaktionen von Zytokinausschüttung bis hin zur Apoptose verantwortlich sein sollen. Ähnliche

intrazelluläre „Calciumspikes“, die durch calciumpermeable Toxinporen induziert werden, konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits für Listeriolysin O gezeigt werden (Pamukçi 2007). Welche Rolle diese „Calciumspikes“ durch das Einwirken des Toxins α -Hly in bezug auf das Schicksal der Zellen, insbesondere auch im Infektionsgeschehen oder auch der Entwicklung der Sepsis spielen, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

α -Haemolysin (α -Hly), ein porenbildendes Toxin aus der Gruppe der RTX-Toxine, ist ein essentieller Virulenzfaktor des humanpathogenen, gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli*. Es kann lebensbedrohliche Infektionen wie Cholezystitis, hämorrhagische Kolitis, hämolytisch-urämisches Syndrom, Sepsis und Meningitis verursachen. Auf zellulärer Ebene zeigt α -Hly ein breites Spektrum von Wirkungen auf Blut- und Körperzellen. Es verändert die Genexpression sublytisch betroffener Zellen, induziert unter anderem so die Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren, verursacht Apoptose oder Nekrose und führt in hohen Konzentrationen zur Lyse der Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnten zum Teil erstmalig mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik grundlegende Eigenschaften der Porenbildung durch α -Hly an Zellmembranen kernhaltiger Zellen beobachtet und analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Applikation von α -Hly auf HEK293-Zellen innerhalb einer, verglichen mit anderen Toxinen, auffallend kurzen Latenzzeit zur Porenbildung kommt. Die Porenbildung durch α -Hly war transienter Natur und die Poren wechselten zwischen geöffneten und geschlossenen Zuständen. Die Porenöffnungen und -schlüsse erfolgten schlagartig, schnell und betrug weniger als 10 ms. Es konnte eine elementare Grundpore mit einer Leitfähigkeit von 150 pS identifiziert werden. Die Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass α -Hly in der Zellmembran Porencluster bildet, die sich synchron öffnen und schließen können. Die durch α -Hly induzierten Poren waren unselektiv permeabel zumindest für monovalente Kationen wie Kalium und Natrium. Weiterhin konnte erstmals elektrophysiologisch gezeigt werden, dass auch Ca^{2+} durch die α -Hly-Poren in die Zellen gelangen kann. Die porenbildende Wirkung von α -Hly war von der extrazellulären Anwesenheit von Ca^{2+} abhängig, wobei Ca^{2+} durch Sr^{2+} und Ba^{2+} substituiert werden konnte. Physiologische Faktoren wie Temperatur oder pH-Wert der Extrazellulärlösung hatten einen starken Einfluss auf die porenbildende Wirkung von α -Hly. Die Temperatursenkung und der Ausgleich einer metabolischen Alkalose scheinen daher effektive Maßnahmen in der Therapie generalisierter *E.coli*-Infekte zu sein.

6 Summary

α -Hemolysin (α -Hly), a pore-forming Toxine of the RTX-Family, is an essential virulence factor of the humanpathogen, Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. It causes life-threatening infections such as cholecystitis, hemolytic-uraemic syndrome, sepsis and meningitis. On the cellular level α -Hly displays a wide range of effects on red blood and systemic cells, modifies the genexpression of sublytically affected cells, induces the production and the release of inflammatoric mediators, causes apoptosis or necrosis and leads in higher concentrations to lysis of the cells.

Partly for the first time we observed and analysed in the present work by means of Patch-Clamp-Technique elementary features of the pore-formation via α -Hly within the cell membrane of nucleated target cells. Compared to other toxines α -Hly-induced pore-formation occurred with a striking short latency after toxin application. Pore-formation by α -Hly was transient and the pores switched between open and closed states. Pore opening and closing were very fast and took less than 10 ms. An elementary pore with the conductance of 150 pS was identified. From our data it may be presumed, that α -Hly formes pore-clusters which are able to open and close synchronously. The α -Hly-pores were non selectively permeable at least for monovalent cations such as potassium and sodium. Furthermore it was shown for the first time electrophysiologically that even Ca^{2+} passes through the pores into the cells. The pore-forming effect of α -Hly depended on the presence of a extracellular Ca^{2+} , whereas Ca^{2+} could be substituted with Ba^{2+} or Sr^{2+} . Physiological factors such as temperature and the pH-value of the extracellular solution had a strong influence on the pore-forming effect of α -Hly. The decrease of the temperature and the adjustment of a metabolic alkalosis seem to be effective tools in the therapy of a generalized *E.coli*-infect.

7 Literaturverzeichnis

- Benz R, Schmid A, Wagner W & Goebel W (1989) Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* 57:887-895
- Berjukow S, Doring F, Froschmayr M, Grabner M, Glossmann H & Hering S (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Br J Pharmacol* 118:748-754
- Berridge MJ, Bootman MD & Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* 395:645-648
- Bhakdi S, Muhly M, Korom S & Schmidt G (1990) Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* 85:1746-1753
- Bhakdi S & Martin E (1991) Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 59:2955-2962
- Bittenbring J (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin O-induzierten Membranporen. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen.
- Boehm DF, Welch RA & Snyder IS (1990) Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun* 58:1959-1964
- Brockmeier D (1991) HOEGIP-PC: An interactive program package for the evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data. User Manual. Internal Report, Hoechst AG
- Butler S (2005) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Blockade von Listeriolysin von *Listeria monocytogenes* und chromosomaler Punktmutanten induzierten Membranporen in humanen embryonalen

Nierenzellen gebildeten Poren. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen.

Cavalieri SJ, Bohach GA & Snyder IS (1984) Escherichia coli alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. Microbiol Rev 48:326-343

Decker K (1999) Aktivierung eines calciumabhängigen, spannungsabhängigen Kaliumkanals in Mäusefibroblasten durch die onkogene Rezeptor- Tyrosinkinase des Katzensarkomvirus. Dissertation im Fachbereich Physik der Justus-Liebig- Universität Gießen.

Döbereiner A, Schmid A, Ludwig A, Goebel W & Benz R (1996) The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by Escherichia coli alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. Eur J Biochem 240:454-460

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

Felmlee T, Pellett S & Welch RA (1985) Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin. J Bacteriol 163:94-105

Gauss CF (1809) Theoria motus corporum coelestium in sectionibus conicis solem ambientium. Lib II, Sect III, Hamburgi Sumtibus, Frid. Perthes et I H Besser

Goebel W & Hedgpeth J (1982) Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of Escherichia coli. J Bacteriol 151:1290-1298

Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Exley GE, Warner C & Fissore R (2002) Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. Biology Of Reproduction 66:1828-1837

- Grimminger F, Walmrath D, Birkemeyer RG, Bhakdi S & Seeger W (1990) Leukotriene and hydroxyeicosatetraenoic acid generation elicited by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *Infect Immun* 58:2659-2663
- Grimminger F, Sibelius U, Bhakdi S, Suttorp N & Seeger W (1991) *Escherichia coli* hemolysin is a potent inductor of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J Clin Invest* 88:1531-1539
- Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N & Seeger W (1997) Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159:1909-1196
- Hahn H & Bockemühl J (2004) Enterobakterien. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag, 5. Auflage, Kapitel 5: 236-248
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100
- Hof H & Dörries R (2000) *Escherichia coli*. *Mikrobiologie, MLP-Duale Reihe*, 3. Auflage, Kapitel 2: 387-390
- Herold G (2006) Wichtige Infektionskrankheiten: Infektiöse Durchfallerkrankungen. *Innere Medizin*, Herausgeber Herold G, Kapitel 11: 765-768
- Issartel JP, Koronakis V & Hughes C (1991) Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 351:759-761
- Jacobus B (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische sowie pathophysiologische Beeinflussung der durch Streptolysin O gebildeten Poren. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Jonas D, Schultheis B, Klas C, Krammer PH & Bhakdi S (1993) Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect Immun* 61:1715-1721
- Kayser FH & Böttger EC (2005) Bakterien als Krankheitserreger: *Escherichia coli*. *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag, 11. Auflage, Kapitel 5:306-308
- Keane WF, Welch R, Gekker G & Peterson PK (1987) Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol* 126:350-357
- König B, König W, Scheffer J, Hacker J & Goebel W (1986) Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. *Infect Immun* 54:886-892
- König B, Schonfeld W, Scheffer J & König W (1990) Signal transduction in human platelets and inflammatory mediator release induced by genetically cloned hemolysin-positive and -negative *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 58:1591-1599.
- König B & König W (1993) The role of the phosphatidylinositol turnover in 12-hydroxyeicosatetraenoic acid generation from human platelets by *Escherichia coli* alpha-haemolysin, thrombin and fluoride. *Immunology* 80:633-639
- Koschinski A (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. Dissertation im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig- Universität Gießen.
- Koschinski A, Repp H, Uenver B, Dreyer F, Brockmeier D, Valeva A, Bhakdi S & Walev I (2006) Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells - the pore is on its own. *Faseb J* 20:973-975

- Larsen EH, Price EM, Gabriel SE, Stutts MJ & Boucher RC (1996) Clusters of Cl-channels in CFTR-expressing Sf9 cells switch spontaneously between slow and fast gating modes. *Pflugers Arch* 432: 528-537
- Ludwig A & Goebel W (1987) *Escherichia coli* hemolysin. Guidebook to Protein Toxins and Their Use in Cell Biology. Hrsg.: Rappuli R & Montecucco C. Oxford University Press 18-20
- Ludwig A, Jarchau T, Benz R & Goebel W (1988) The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet* 214:553-561
- Ludwig A, Schmid A, Benz R & Goebel W (1991) Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 226:198-208
- Menestrina G, Mackman N, Holland IB & Bhakdi S (1987) *Escherichia coli* hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 905:109-117
- Menestrina G, Pederzolli C, Dalla Serra M, Bregante M & Gambale F (1996) Permeability increase induced by *escherichia coli* hemolysin a in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J Membr Biol* 149:113-121
- Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H & Prevost G (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 552:54-60
- Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockatell CV, Jones BD & Warren JW (1990) Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* 58:1281-1289

- Ostolaza H, Soloaga A & Goni FM (1995) The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Eur J Biochem* 228:39-44
- Pamukçi Z (2007) Elektrophysiologische Untersuchungen zur porenbildenden Wirkung von Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* in Membranen von Mäusefibroblasten und menschlichen Nierenzellen. Dissertation eingereicht im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen.
- 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, Pamukçi 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
- Ropele M & Menestrina G (1989) Electrical properties and molecular architecture of the channel formed by *Escherichia coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biochim et Biophys Acta* 985:8-18
- Sakman B & Neher E (1995) Single Channel Recording. Second Edition, Plenum Press, New York
- Schmidt H, Maier E, Karch H & Benz R (1996) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem* 241:594-601
- Schramm P (2004) Elektrophysiologische Charakterisierung und pharmakologische Beeinflussung von durch Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae* gebildete Poren. Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen.

- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H & Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal α -Hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866
- Stanley P, Packman LC, Koronakis V & Hughes C (1994) Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266:1992-1996
- Suttorp N, Floer B, Schnittler H, Seeger W & Bhakdi S (1990) Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 58:3796-3801
- Tilly SJ, Orlova EV, Gilbert RJC, Andrew PW & Saibil HR (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121: 247-256
- Uenver B (2007) Pharmakologische Modulation der durch α -Hämolysin von *Escherichia coli* an HEK293-Zellen gebildeten Poren. Dissertation eingereicht im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen.
- Wagner W, Vogel M & Goebel W (1983) Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J Bacteriol* 154:200-210
- Wandersman C & Delepelaire P (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4776-4780
- Welch RA, Dellinger EP, Minshew B & Falkow S (1981) Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* 294:665-667

8 Danksagung

Zunächst möchte ich ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer danken. Ich bin glücklich und sehr stolz bei ihm meine Arbeit absolviert haben zu dürfen. Seine Energie und Optimismus waren beeindruckend und ansteckend. Er hat sich stets Zeit für meine Anliegen genommen und hatte viel Geduld mit mir.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Andreas Koschinski, ohne den es diese Arbeit wohl nie gegeben hätte. Sein unermüdliches Engagement, seine fachliche Kompetenz und sein Enthusiasmus haben mich zutiefst beeindruckt. Er hat mich als Ansprechpartner vom ersten bis zum letzten Tag begleitet, mir mit großer Leidenschaft die Patch-Clamp-Technik nahe gebracht und mir unermüdlich bei der Durchführung und Auswertung der Experimente geholfen.

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

Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Bariş Uenver und Anke Bennert für die schöne, sehr angenehme Zeit im Labor und die Hilfe in der Arbeitsgruppe.

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

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

Mein ganz besonderer Dank geht an Christoffer Krug, der durch sein Vertrauen und seine Hilfsbereitschaft einen großen Teil dieser Arbeit erst möglich machte und an Paul Gebelein, der meinen Blick auf das wirklich Wichtige lenkte.

Meinen Eltern Ján und Ghallia bin ich sehr dankbar für die unermüdliche moralische Unterstützung, Motivation und den unerschütterlichen Glauben in alles, was ich bisher verfolgt habe. Ohne Ihre Großzügigkeit und Liebe wäre nichts von alledem möglich gewesen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadia Kičová
Geburtsdatum: 27.09.1976
Geburtsort: Königgrätz, Tschechische Republik

Hochschulausbildung

Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen	04/1999–04/2006
Physikum	08/2001
1. Staatsexamen	08/2002
2. Staatsexamen	04/2005
3. Staatsexamen	04/2006
Approbation	05/2006

Promotionsarbeit

Thema: „Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Alpha-Haemolysin von *Escherichia coli* induzierten Membranporen in humanen embryonalen Nierenzellen“ seit 01/2003

Studienbegleitende Tätigkeiten

Nacht- und Sitzwache, Universitätsklinikum Gießen	09/2000-05/2000
Mitarbeiterin im Schlaf-Apnoe-Center, Universitätsklinikum, Gießen	09/2002-12/2002
OP-Bereitsschaftsdienst in der Allgemein- und Unfallchirurgie, Klinikum Bad Hersfeld	04/2005-04/2006

Ausbildung

Ausbildung zur Pharmazeutisch-
Technischen Assistentin (PTA),
Rheinische Lehrakademie Köln 08/1996-03/1999

Examen (PTA) 03/1999

Schulbildung

Arnold-von-Wied Grundschule,
Bonn 08/1983 – 09/1985

Markt-Grundschule,
Bonn 09/1985 – 08/1987

Erzbischöfliches St.Adelheid Gymnasium,
Bonn 09/1987 – 06/1996

Abitur 06/1996

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

Gießen, den

Nadia Kičová